

RAFAŁ OLSZANECKI

**ROLA OKSYGENAZY
HEMOWEJ W REGULOWANIU
PROCESÓW APOPTOZY**

Badania na modelach uszkodzenia nerek
w przebiegu nadciśnienia,
ostrej niewydolności nerek i cukrzycy

Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego

RECENZENT WYDAWNICZY

Prof. dr hab. med. Włodzimierz Buczko

PROJEKT OKŁADKI

Dorota Heliasz

REDAKTOR

Dorota Węgierska

KOREKTOR

Katarzyna Jagiela

SKŁAD I ŁAMANIE

Hanna Wiechecka

© Copyright by Rafał Olszanecki & Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
Wydanie I, Kraków 2008
All rights reserved

ISBN 978-83-233-2522-2

www.wuj.pl

Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
Redakcja: ul. Michałowskiego 9/2, 31-126 Kraków
tel. 012-631-18-81, tel./fax 012-631-18-83
Dystrybucja: ul. Wrocławska 53, 30-011 Kraków
tel. 012-631-01-97, tel./fax 012-631-01-98
tel. kom. 0506-006-674, e-mail: sprzedaz@wuj.pl
Konto: PEKAO SA O/Kraków, nr 62 1060 0076 0000 3200 0047 8769

SPIS TREŚCI

SYMBOLE I SKRÓTY UŻYWANE W PRACY.....	7
WPROWADZENIE	9
1. WSTĘP.....	11
1.1. Hem i oksygenaza hemowa.....	11
1.2. Apoptoza	19
1.3. Ostre i przewlekłe uszkodzenie nerek.....	23
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY.....	25
3. MATERIAŁ I METODY	27
3.1. Zwierzęta laboratoryjne	27
3.2. Modele badawcze i protokoły eksperymentów	28
3.3. Materiał do badań.....	30
3.4. Techniki biologii molekularnej, metody histologiczne oraz biochemiczne	30
3.5. Analiza statystyczna	33
4. WYNIKI.....	35
4.1. Model nadciśnienia naczyniowo-nerkowego 2K1C	35
4.1.1. Ekspresja HO w nerce w modelu 2K1C	35
4.1.2. Wpływ HO na rozwój nadciśnienia i uszkodzenia nerek w modelu 2K1C	35
4.1.3. Wpływ HO na stres oksydacyjny i ekspresję COX-2 w nerce w modelu 2K1C.....	42
4.1.4. Wpływ HO na występowanie apoptozy w nerce w modelu 2K1C.....	42
4.1.5. Wpływ HO na białka regulujące procesy apoptozy w nerce w modelu 2K1C..	42
4.2. Model ostrej niewydolności nerek	50
4.2.1. Ekspresja HO w nerce.....	50
4.2.2. HO a poziom wolnego hemu i nasilenie stresu oksydacyjnego w nerce	52
4.2.3. HO a biochemiczne wykładniki rozwoju niewydolności nerek.....	53
4.2.4. Wpływ HO na procesy apoptozy w nerce w modelu ostrej niewydolności nerek.....	53
4.3. Model cukrzycy.....	58
4.3.1. Ekspresja HO oraz wybranych białek pro- i antyapoptotycznych w nerkach ...	58
4.3.2. Aktywność oksydazy cytochromu c oraz wytwarzanie wolnych rodników tlenowych przez frakcję mitochondrialną homogenatów nerek	58
4.3.3. Aktywność kaspaz w homogenatach nerek.....	61

5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	63
6. DYSKUSJA.....	65
7. WNIOSKI.....	73
8. STRESZCZENIE.....	75
9. ABSTRACT.....	77
PIŚMIENNICTWO.....	79

SYMBOLE I SKRÓTY UŻYWANE W PRACY

2K1C	– <i>2 kidney 1 clip</i>
3-NT	– 3-nitrotyrozyna
AIF	– <i>apoptosis inducing factor</i>
ALAS	– syntaza kwasu δ -aminolewulinowego
AP-1	– czynnik transkrypcyjny <i>activator protein-1</i>
Apaf-1	– <i>apoptotic protease activating factor</i>
ATM	– <i>ataxia teleangiectasia-mutated</i>
Bcl	– <i>B cell leukemia/lymphoma-2</i>
CoPP	– protoporfiryna kobaltowa
COX	– cyklooksigenaza (<i>cyclooxygenase</i>)
Cyt IV	– podjednostka IV oksydazy cytochromu c
Cyt c	– cytochrom c
DIABLO	– <i>direct IAP binding protein with low PI</i>
FasL	– <i>Fas ligand</i>
GM-CSF	– <i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HO	– oksygenaza hemowa (<i>heme oxygenase</i>)
IAP	– <i>inhibitors of apoptosis proteins</i>
IL	– <i>interleukin</i>
JNK	– <i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i>
LSN-RHO-1-AS	– wektor retrowirusowy z genem HO-1 w orientacji „antysens”
LXSN	– „pusty” wektor retrowirusowy
MAPK	– <i>mitogen activated protein kinase</i>
MIP-1	– <i>macrophage inflammatory protein</i>
NF κ B	– czynnik transkrypcyjny <i>nuclear factor kappa B</i>
NOS	– syntaza tlenku azotu (<i>nitric oxide synthase</i>)
O ₂ ⁻	– anion ponadtlenkowy
ONN	– ostra niewydolność nerek
PARP	– <i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>

PI3K	– <i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>
PTP	– <i>permeability transition pore</i>
ROS	– reaktywne formy tlenu (<i>reactive oxygen species</i>)
Smac	– <i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SnMP	– <i>mezoporfiryna cynowa</i>
SnPP	– <i>protoporfiryna cynowa</i>
STZ	– <i>streptozotocyna</i>
TGF- β	– <i>tumor growth factor β</i>
TNF- α	– <i>tumor necrosis factor α</i>
TNFR	– <i>tumor necrosis factor receptor</i>
TUNEL	– <i>TdT-mediated dUTP nick end-labeling</i>
VDAC	– <i>voltage-dependent anion channel</i>
ZnPP	– <i>protoporfiryna cynkowa</i>

WPROWADZENIE

Zainteresowanie tlenkiem węgla (CO), znanym od 1968 roku enzymem rozkładającym hem i wytwarzającym tlenek węgla (CO), wzrosło po odkryciu w latach osiemdziesiątych XX wieku pierwszego „gazowego” mediatora – tlenku azotu (NO). Okazało się wtedy, że rola HO nie ogranicza się jedynie do kontroli poziomu wolnego hemu w komórce, a rozliczne działania biologiczne produktów rozkładu hemu – CO, bilirubiny i żelaza – zapewniły HO główną rolę wśród endogennych układów chroniących komórki przed uszkodzeniem.

Jak dotychczas, większość badań dotyczy szeroko rozumianego działania przeciwpalnego HO. W piśmiennictwie obecne są także prace, oparte głównie na badaniach *in vitro*, ogólnie opisujące pobudzające lub hamujące (w zależności od szczegółów modelu badawczego) oddziaływanie szlaku HO na zachodzenie procesów apoptozy. Oryginalność niniejszej pracy polega na tym, że skupia się ona na badaniach prowadzonych *in vivo* (analizie uszkodzenia nerek w trzech różnych, zwierzęcych modelach schorzeń, będących poważnymi problemami w praktyce klinicznej), a także przedstawia molekularne mechanizmy wpływu oksygenazy hemowej na procesy regulujące apoptozę.

Praca niniejsza jest częściowo oparta na następujących artykułach:

1. Olszanecki R., Rezzani R., Omura S., Stec D.E., Rodella L., Botros .F, Goodman A.I., Drummond G., Abraham N.G. Genetic suppression of HO-1 exacerbates renal damage: Reversed by an increase in the anti-apoptotic signaling pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007; 292:F148–157.

2. Botros F.T., Olszanecki R., Prieto-Carrasquero M.C., Goodman A.I., Navar L.G., Abraham N.G. Induction of heme oxygenase-1 in renovascular hypertension is associated with inhibition of apoptosis. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 2007; 53(4):51–60.

3. Goodman A.I., Olszanecki R., Yang L.M., Quan S., Li M., Omura S., Stec D.E., Abraham N.G. Heme oxygenase-1 protects against radiocontrast-induced acute kidney injury by regulating anti-apoptotic proteins. *Kidney Int.* 2007; 72(8):945–953.

1. WSTĘP

1.1. Hem i oksygenaza hemowa

Charakterystyczną cechą porfiryn – cyklicznych związków, zbudowanych z 4 pierścieni pirolowych połączonych mostkami metinowymi – jest łatwe tworzenie kompleksów z metalami [238]. Metaloporfiryny, ze względu na łatwe wchodzenie w reakcje utleniania i redukcji oraz korzystne własności elektrochemiczne, umożliwiają wiele podstawowych reakcji metabolicznych i są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie [238]. Najważniejsze w fizjologii ssaków jest połączenie porfiryny z żelazem – hem. Swe funkcje fizjologiczne hem pełni po połączeniu z właściwymi białkami, i to od struktury składnika białkowego zależy sposób wykorzystania hemu w konkretnych hemoproteinach [89]. W przypadku hemoglobiny i mioglobiny jest to przenoszenie i magazynowanie tlenu dwucząsteczkowego; w przypadku cytochromów – transport elektronów, w wypadku zaś enzymów, takich jak syntaza tlenu azotu (NOS), cyklooksygenaza (COX), katalaza czy różne peroksydazy, niezbędne uczestnictwo w reakcjach utleniania/redukcji odpowiednich substratów.

Hem syntetyzowany jest we wszystkich komórkach jądrazstych. Porfirynewy szkielet hemu powstaje z glicyny i sukcylokoenzymu A, w skomplikowanym cyklu reakcji zapoczątkowanym w mitochondriach przez syntazę kwasu δ -aminolewulinowego (ALAS), prowadzonym następnie w cytoplazmie, a ukończonym na powrót w mitochondriach [282]. Na ostatnim etapie syntezy hemu, w układ porfirynewy, przy udziale enzymu – ferrochelatazy, wbudowywane jest żelazo. Hem może być także importowany do komórki z zewnątrz przy udziale błonowego transportera [441]. Jako związek lipofilny, hem dość łatwo dyfunduje pomiędzy organellami wewnątrz komórki, jednak pula wolnego (niezwiązanego z białkami) hemu jest w komórce bardzo niewielka [325]. Niemal w całości jest on wbudowywany do hemoprotein lub wiązany przez białka – magazyny (hemopeksynę, HBP23) [180, 279]. Komórka „obchodzi się” z hemem bardzo ostrożnie, ponieważ wolny hem jest niezwykle toksyczny – wybitnie nasila powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS), działa prozapalnie, uszkodza błony lipidowe i cytoszkielet komórki [33, 184, 344, 414], dlatego nie tylko powstawanie, lecz i rozkład hemu jest ściśle regulowany [282].

W pewnych warunkach, po zadziałaniu czynników stresowych, na skutek uwolnienia hemu z hemoprotein, w komórce może dojść do podwyższenia stężenia wolnego

hemu (rys. 1). Rozkład hemu determinowany jest przez aktywność HO (EC 1.14.99.3) (rys. 1).

Oksygenaza hemowa (HO) opisana została w 1968 roku przez Tenhunen i wsp. [398]. Trzeba jednak dodać, że już dużo wcześniej pojawiały się informacje dotyczące poszczególnych etapów procesu degradacji hemu – zaobserwowano np., że rozkład hemoglobiny *in vivo* wiąże się z powstawaniem CO [75, 365, 366].

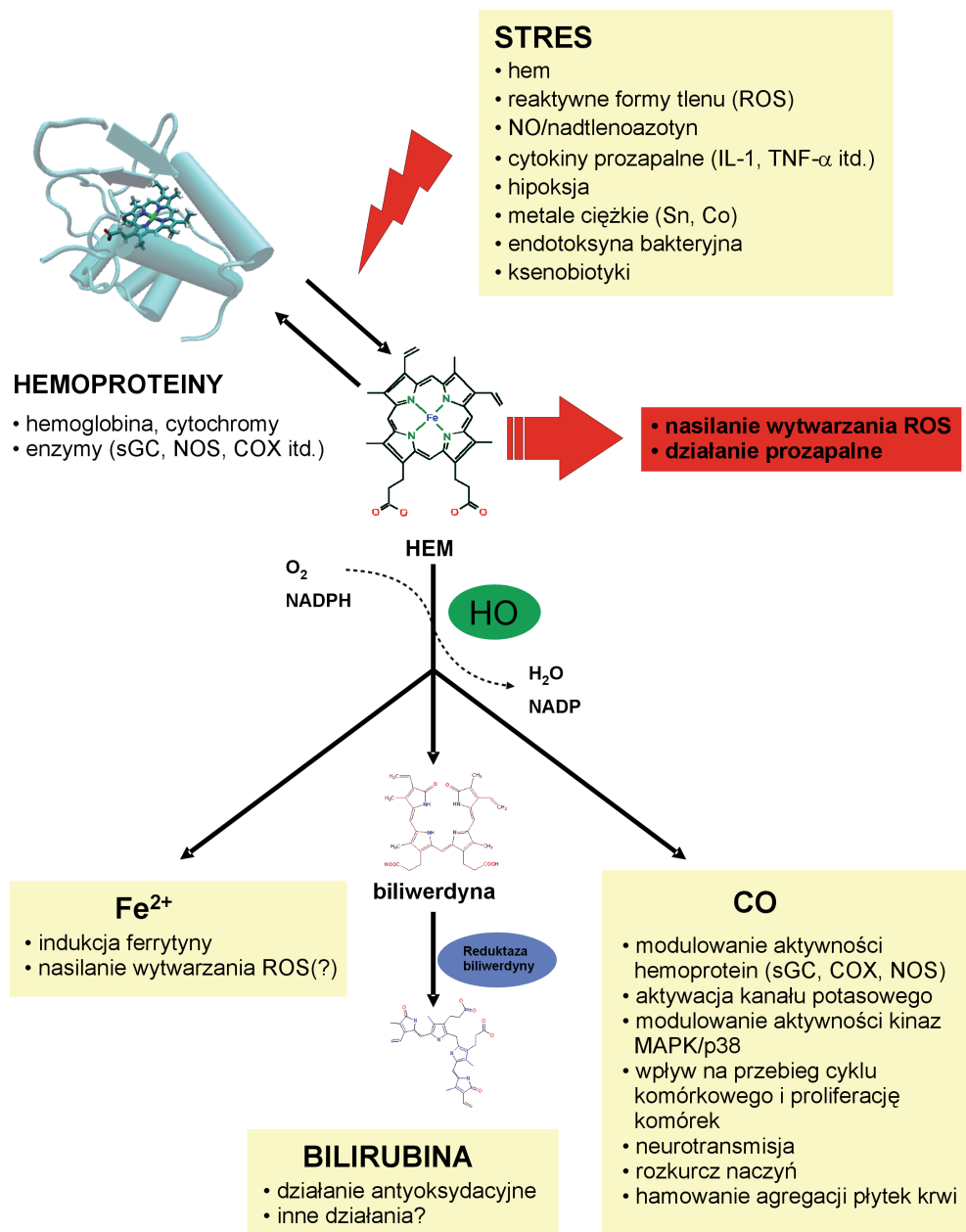
HO utlenia hem do biliwerdyny, CO oraz żelaza na stopniu utlenienia +2 (Fe^{2+}) (rys. 1). Utlenienie jednej cząsteczki hemu wymaga 3 moli tlenu oraz 1 mola NADPH (lub NADH), dostarczonego przez współpracujący enzym – reduktazę NADPH:cytochrom p450 (EC. 1.6.2.4) [297, 398, 411, 453]. Ciekawym aspektem reakcji HO jest to, że hem, wiążąc się z enzymem, działa zarówno jako substrat, jak i kofaktor [398]. Syntetyczne metaloporfiryny – protoporfiryny: kobaltowa (CoPP), cynowa (SnPP), cynkowa i manganowa (ZnPP, MnPP), oraz mezoporfiryny cynowa i chromowa (SnMP, CrMP) mogą działać jako kompetycyjne inhibitory aktywności HO, zwłaszcza zastosowane *in vitro*. CoPP zastosowana *in vivo* jest silnym induktorem aktywności HO.

Uwolnione z hemu żelazo jest natychmiast wiązane przez ferrytynę, tlenek węgla swobodnie dyfunduje, hydrofilna biliwerdyna zaś zredukowana jest przez reduktazę biliwerdyny (BVR) (EC.1.3.1.24) do lipofilnej bilirubiny. Większość metod pomiaru aktywności HO opiera się właśnie na spektrofotometrycznej ocenie tempa powstawania bilirubiny w próbce w obecności nadmiaru substratów, kofaktorów oraz BVR [345].

HO występuje w dwóch izoformach: HO-1 (~32 kDa) oraz HO-2 (~36 kDa), wykazujących u człowieka 88% homologii sekwencji aminokwasów. Izoformy te są produktami odrębnych genów *ho-1* oraz *ho-2* [80, 254, 406, 407]. Aktywniejsza izoforma HO-1 jest enzymem **indukowalnym** i w stanie fizjologii w większych ilościach występuje jedynie w tkankach i narządach zaangażowanych w tworzenie i usuwanie erytrocytów (śledziona, komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby, szpik kostny) [306, 398]. Poziom HO-1 w śledzionie, wątrobie i nerkach silnie wzrasta w czasie hemolizy [321, 322]. Indukcja transkrypcji HO-1 może zachodzić praktycznie we wszystkich komórkach jądrzastych w odpowiedzi na niezwykle szeroką gamę bodźców uszkadzających, ogólnie kwalifikowanych jako stres komórkowy. Izoforma HO-2 jest enzymem **konstytutywnym** – stale obecnym i aktywnym w komórkach (jej aktywność jest ok. 3 razy mniejsza niż HO-1). Największy poziom HO-2 występuje w jądrach, mózgu (zarówno neuronach, jak i gleju), wątrobie, ścianie jelit i naczyń krwionośnych (zarówno w śródbłonku, jak i mięśniach gładkich) [250, 407, 456]. Opisana w 1997 roku izoforma HO-3 [262], o nikłej aktywności enzymatycznej i nieznanym roli, w świetle ostatnich badań nie znajduje potwierdzenia jako odrębne genetycznie białko [160].

Wewnątrz komórek zarówno HO-1, jak i HO-2 występują głównie we frakcji mikrosomalnej (siateczka śródplazmatyczna), w której mogą tworzyć kompleksy białkowe z reduktazą NADPH:cytochrom p450 oraz reduktazą biliwerdyny. Obie izoformy HO posiadają hydrofobowe domeny blisko C-końca, sugerujące zakotwiczenie w błonach [178, 360]. Wykazano obecność obu izoform na otoczce jądrowej [236, 248], a także na błonie komórkowej, gdzie izoforma HO-1 kolokalizuje się z kaweoliną-1, która może pełnić rolę inhibitora aktywności HO [203]. Ostatnio podnosi się możliwość występowania HO-1 w mitochondriach [76, 98, 343].

Zastanawiająca jest złożoność, wszechobecność w organizmie oraz rozpowszechnienie w przyrodzie enzymów rozkładających metaloporfiryny – obecność białek przypo-



Rys. 1. Miejsce oksygenazy hemowej (HO) w metabolizmie hemu. Szczegóły w tekście

minających budową i aktywnością HO-1 wykazano u niższych zwierząt, roślin, grzybów, a nawet bakterii [28, 226, 267, 280, 313, 334, 429, 435, 459]. Kluczem do odpowiedzi na pytanie, dlaczego ewolucja tak skutecznie zachowała ten szlak metaboliczny, są pełnione przez HO i produkty jej reakcji role biologiczne, daleko wykraczające poza regulowanie poziomu hemu w komórce.

U bakterii i grzybów białka podobne do HO-1 służą do pozyskiwania żelaza z hemoprotein otoczenia, u roślin biorą udział w syntezie ważnych barwników – fitochromów, fitochromobilin oraz fikobilin [127].

U ssaków **role szlaku HO** są bardzo zróżnicowane, a ich analiza musi uwzględniać dwa główne aspekty:

- usuwanie hemu (zarówno udział w fizjologicznym metabolizmie hemoprotein, jak i rozkład nadmiaru wolnego hemu w stanach patologicznych);
- działania produktów reakcji – Fe^{2+} , bilirubiny i CO.

W fizjologicznym metabolizmie hemoglobiny pierwszoplanową rolę odgrywa HO-1 zlokalizowana w narządach zaangażowanych w rozkład i powstawanie erytrocytów. Jej ilość przyrasta w warunkach zwiększonego rozpadu czerwonych krwinek. Rozkład hemu uwalniającego się w dużo mniejszych ilościach, fizjologicznie w każdej komórce, z innych niż hemoglobina hemoprotein komórkowych „obsługuje” konstytutywna HO-2. W wypadku szeroko rozumianego stresu komórkowego (zob. dalej) w rozkładzie hemu większą rolę zaczyna odgrywać wyindukowana HO-1. Ciekawym aspektem usuwania hemu przez izoformy HO jest możliwość regulowania dostępności hemu w komórkach, a przez to aktywności niektórych ważnych enzymów o budowie hemoprotein. Wykazano regulowanie aktywności COX i NADPH oksydazy przez HO-1 w komórkach śródbłonna i makrofagach [151, 391].

Prawdziwe zainteresowanie szlakiem HO wzrosło wtedy, gdy zwrócono uwagę na możliwe działania biologiczne produktów rozkładu hemu, a zwłaszcza CO i bilirubiny (rys. 1). Przy założeniu, że w warunkach fizjologicznych za ich powstawanie odpowiada wytwarzająca względnie niewielkie ilości konstytutywna HO-2, w patologicznych zaś dominuje aktywniejsza HO-1, role produktów degradacji hemu w tych dwóch sytuacjach są odmienne. Należy również dodać, że w przypadku niskiej, konstytutywnej aktywności HO produktem, który – jak się okazało – ma największe działania biologiczne, jest CO. W sytuacjach patologicznych, kiedy tempo rozkładu hemu wzrasta, duże znaczenie biologiczne uzyskują wszystkie produkty reakcji HO.

Konstytutywne wytwarzanie CO odgrywa największą rolę w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, układzie rozrodczym oraz w ścianie naczyń krwionośnych.

Ogólnie, molekularnym celem CO jest hem licznych hemoprotein (łącznie z nim, CO moduluje aktywność COX, NOS, katalazy, cykazy guanylanowej) oraz reszty histydyny niektórych białek (np. kanałów potasowych BK_{Ca}) [343].

W neurofizjologii CO „awansował” do rangi drugiego obok NO najważniejszego neuroprzekaźnika „gazowego” [przegląd zob. 250, 367, 442]. Udowodniono jego powstawanie (zależne głównie od HO-2) we wszystkich strukturach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego [116] oraz udział w tak podstawowych zjawiskach, jak regulacja funkcji osi podwzgórze-przysadka [256], kontrola rytmu dobowego [19], przewodzenie bodźców bólowych [237], termoregulacja [115], uczenie się i pamięć [377]; wykazano udział CO w neurotransmisji NANC [457] (np. w zjawisku ejakulacji [53] czy regulacji perystaltyki przewodu pokarmowego [299]).

W układzie rozrodczym CO odgrywa rolę w regulacji spermatogenezy [252] oraz funkcji jajników [12]. Bardzo ciekawa i nie do końca poznana (może obejmować regulację funkcji łożyska i wzrastania płodu) jest rola szlaku HO w ciąży [przegląd zob. 442].

Wiele uwagi poświęcono naczyniorozkurczowemu działaniu CO, które po raz pierwszy obserwowali McGrath i Smith: podanie egzogenego CO wywołało rozkurcz tętnicy wieńcowej szczura [263]. Egzogeny CO wywołuje rozkurcz niezależny od obecności śródbłonna [422] – zależy on od pobudzania cykazy guanylanowej do produkcji cGMP [384] oraz otwierania kanałów potasowych BK_{Ca} [424] w mięśniach gładkich naczyń. Naczyniorozkurczowe działanie endogenego CO wykazano, stosując metaloporfiryny – inhibitory aktywności HO, które podnosiły ciśnienie w modelu izolowanej, perfundowanej wątroby [387] oraz kurczyły tętniczki zaopatrujące mięsień smukły [213]. Obecnie wiadomo, że fenomen rozkurczu naczyń w odpowiedzi na CO dotyczy niemal wszystkich łożysk naczyniowych i ma znaczenie w niektórych stanach patologicznych (marskość wątroby, krwotok podpajeczynówkowy). Udział CO w wazoregulacji, w stanie fizjologii oraz w niektórych schorzeniach układu sercowo-naczyniowego jest jednak stale przedmiotem kontrowersji [31, 257, 292, 422].

Z pewnością największe zainteresowanie budzi **indukowalny szlak HO**, zależny od pojawiania się w komórkach izoformy HO-1. Dziwi jednak fakt, że praktycznie wszystkie jądrzaste komórki odpowiadają indukcją tego enzymu na niezwykle szeroką gamę bodźców, które ogólnie możemy opisać jako stresowe [przegląd zob. 343]. Wymieniając tylko najważniejsze, można zaliczyć do nich:

- reaktywne formy tlenu (H_2O_2 , jon ponadtlenkowy, naświetlanie UVA) [201];
- lipopolisacharyd bakteryjny (LPS) i cytokiny prozapalne (IL-1, TNF- α) [56, 399];
- czynniki wzrostu (TGF- β) [221];
- tlenek azotu i nadtlenoazotyn [52, 65];
- hiperoksję oraz hipoksję [92, 228];
- produkty utleniania biomolekuł (utlenione LDL, glikowane białka) [177, 448];
- substancje zmniejszające stężenie zredukowanych grup –SH w komórce [16];
- metale ciężkie w postaci ich soli (Co, Sn, Cd, Zn) [253];
- metaloporfiryny [352];
- niektóre endogenne lipidy (prostaglandyny serii J) [210];
- polifenole pochodzenia roślinnego (kurkumina, rezweratrol, karnozol) [188, 278].

Chociaż jest to wciąż przedmiotem sporów, tak duża grupa bodźców wykorzystuje kilka podstawowych, wspólnych dróg indukcji HO-1. Przypuszczalnie większość bodźców powoduje pewien rodzaj „uniwersalnego” stresu komórkowego, w którym hem, luźno związany z niektórymi hemoproteinami, może zostać uwolniony do cytoplazmy i indukować HO-1 [418]. Część powoduje obniżenie ilości zredukowanego glutationu w komórce (substancje zmniejszające ilość grup –SH, ROS, metale ciężkie, prostaglandyny J), inne nasilają wewnątrzkomórkowe wytwarzanie reaktywnych form tlenu (hiperoksja) lub działają przez swoiste czynniki transkrypcyjne (np. cytokiny przez czynnik NF κ B i AP-1; polifenole przez czynnik Nrf-2, inne ksenobiotyki przez receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów PPAR) [4, 216, 343].

Odpowiedź na pytanie, dlaczego natura wyposażyła komórki w tak uniwersalną zdolność do indukcji enzymu rozkładającego hem, leży w analizie właściwości biologicznych produktów reakcji HO – ich działania mają na celu odwrócenie skutków już zaistniałego stresu komórkowego oraz ochronę przed następnym uszkodzeniem.

W czasie rozkładu hemu przez HO-1 uwolnione zostają duże ilości Fe^{2+} , bilirubiny i CO.

Żelazo, jako potencjalnie toksyczne (może nasilać wytwarzanie ROS na drodze reakcji Fentona [261]), wbudowywane jest natychmiast do ferrytyny, której indukcja towarzyszy zazwyczaj indukcji HO-1 [54, 110]. Wykazano również, że indukcja HO-1 idzie w parze z pojawieniem się ATP-azy, aktywnie transportującej Fe^{2+} na zewnątrz komórki, co prawdopodobnie przeciwdziała przeładowaniu transferyny żelazem i zapobiega toksycznemu działaniu wolnego Fe^{2+} [25]. Ostatnio zaproponowano, że w niektórych rodzajach komórek (hodowane komórki chłoniaka) Fe^{2+} uwolnione przez HO-1 może (prawdopodobnie przez delikatne zwiększenie wewnątrzkomórkowego powstawania ROS) aktywować czynnik transkrypcyjny NF κ B, co powoduje zahamowanie apoptozy [67]. Należy jednak podkreślić, że dotychczas opublikowane prace nie wyjaśniły jednoznacznie wpływu HO na procesy apoptozy, wskazując na przeciwapoptotyczne lub proapoptotyczne, w zależności od rodzaju komórek, działanie CO (zob. dalej).

Bezpośrednim produktem reakcji HO jest zielony, hydrofilny barwnik – biliwerdyna, która przekształcana jest szybko do żółtej, lipofilnej bilirubiny w reakcji katalizowanej przez reduktazę biliwerdyny (BVR) (rys. 1). Podobnie jak CO, **bilirubina** przez długi czas uważana była za szkodliwy odpad procesu degradacji hemu. Dobrze opisano jej działanie neurotoksyczne, zależne od odkładania się barwnika w fosfolipidach ośrodkowego układu nerwowego [70, 395] (farmakologiczne hamowanie HO za pomocą metaloporfiryn jest ciekawą kliniczną alternatywą tradycyjnych metod leczenia hiperbilirubinemii wcześniaków [192]). Potencjalnie korzystne właściwości „zmiatania” reaktywnych form tlenu przez bilirubinę poznane zostały już w latach siedemdziesiątych XX wieku [376]. W serii doświadczeń Stoker i wsp. udowodnili bardzo skuteczne, antyoksydacyjne działanie bilirubiny *in vitro* [379–381, 383] oraz zasugerowali takie jej działanie *in vivo* [383]. Bilirubina reaguje z większością znanych ROS, także z wytwarzanym przez neutrofile podchlorynem [382], nadtlenoazotynem i tlenkiem azotu [194, 255]. W czasie reakcji może zostać utleniona z powrotem do biliwerdyny (jak się sugeruje, BVR odpowiedzialna byłaby wtedy za cykl odzyskiwania bilirubiny) [24]. W doświadczeniach *in vitro* bilirubina zapobiega utlenianiu makromolekuł (lipidów i białek) [293, 294], a także chroni hodowane neurony oraz komórki HeLa przed uszkodzeniem i apoptozą spowodowanymi przez H_2O_2 [24, 101]. Wydaje się, że za działania biologiczne barwników żółciowych odpowiada głównie właściwość zmiatania ROS, chociaż ostatnio wskazano także na możliwość innego, niż antyoksydacyjne, mechanizmu działania bilirubiny i biliwerdyny – uczestnictwo w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów [251]. Ochronne i przeciwzapalne działanie bilirubiny i biliwerdyny obserwowano *in vitro* (bilirubina zapobiegała zapalnej aktywacji hodowanych komórek śródbłonna przez TNF- α [197]) oraz *in vivo* – zmniejszała ona uszkodzenie wątroby spowodowane lipopolisacharydem bakteryjnym [425], ograniczała reakcję zapalną w modelu zwłóknienia płuc spowodowanego bleomycyną [421], zmniejszała uszkodzenie serca i nerek po ich niedokrwieniu i reperfuzji [7, 71] oraz zapobiegała reakcji odrzucania przeszczepu serca i nerek [283, 446]. Rozkwit badań podstawowych nad biologiczną aktywnością barwników żółciowych, wykazanie ochronnego działania łagodnej hiperbilirubinemii u zwierząt (szczury szczepów „Gunn” i „Eizai”) [92, 207], a także zidentyfikowanie jej jako czynnika zapobiegającego chorobie niedokrwiennej serca u ludzi [47, 356] spowodowały zainteresowanie użyciem bilirubiny i biliwerdyny w celach terapeutycznych [343].

Najwięcej uwagi poświęcono badaniom **biologicznej roli CO**. Dobowa produkcja CO w organizmie człowieka oceniana jest na ok. 350–400 mikromoli [442]. Podobnie jak bilirubina, CO uważany był przez długi czas za toksyczny odpad metaboliczny. Toksyczność, obserwowana przy zatruciu egzogennym CO, zależy od jego zdolności do wiązania się z hemem hemoprotein, a szczególnie hemoglobiny (powinowactwo CO do hemoglobiny jest ok. 250 razy większe niż powinowactwo tlenu dwucząsteczkowego) i powodowania uogólnionej hipoksji szybko prowadzącej do śmierci [378]. Stosunkowo późno rozpoczęte badania nad działaniem mniejszych, wytwarzanych w organizmie ilości CO przyniosły wiele niezwykle ciekawych informacji [przegląd zob. 442]. U podstaw biologicznego działania CO leży przede wszystkim jego zdolność do wiązania się z hemem hemoprotein i modulowania ich funkcji (wybrane, najważniejsze działania zebrano poniżej).

Hemoproteina	Efekt wiązania CO	Piśmiennictwo
Hemoglobina i mioglobina	hamowanie	74, 123
Syntaza tlenu azotu (NOS)	hamowanie	403
Cyklaza guanylanowa (sGC)	stymulacja	384
Cyklooksygenaza (COX)	hamowanie	11
Cytochrom p450	hamowanie	114
Oksydaza cytochromu c	hamowanie	437
Katalaza	hamowanie	174
NADPH oksydaza	hamowanie	79
Dioksygenaza tryptofanu	hamowanie	317

Badania molekularnych mechanizmów działania CO sugerują pobudzenie trzech głównych szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału: aktywację sGC prowadzącą do wzrostu stężenia cGMP, stymulację (czy bezpośrednią – jest to wciąż przedmiotem dyskusji) kinaz MAPK oraz otwarcie kanału potasowego BK_{ca} (poprzez wiązanie się z resztami histydy białka kanału). W przypadku konkretnego efektu fizjologicznego udział poszczególnych mechanizmów może być różny (jedna z dróg zwykle dominuje).

Jak wspomniano powyżej, pobudzenie przez CO sGC mięśni gładkich powoduje ich rozkurcz, obserwowany zarówno w łożysku naczyniowym [423], jak też w oskrzelach [58]. W pewnych łożyskach naczyniowych (tętniczki zaopatrujące mięsień smukły, tętnica ogonowa szczura, tętniczki zaopatrujące oponę miękką, krążenie mózgowe) dominować może rozkurcz niezależny od cGMP, spowodowany otwarciem BK_{ca} [181, 233, 423, 458].

Najwięcej zainteresowania budzi przeciwwzajemne działanie CO, a także jego wpływ na przebieg cyklu komórkowego i procesy apoptozy.

Przeciwwzajemne działanie zarówno egzo-, jak i endogennego CO obserwowano *in vitro* oraz w zwierzęcych modelach zapalenia [305, 418].

Zarówno indukcja HO-1, jak też egzogenny CO zmniejsza produkcję TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF oraz MIP-1 β w makrofagach stymulowanych przez LPS [343]. Co więcej, w tym samym modelu CO zwiększa wytwarzanie cytokiny przeciwwzajemnej – IL-10 [343] (z kolei IL-10 działa poprzez indukowanie HO-1 [230]). Jak się wydaje, w wypadku wpływu na TNF- α , IL-1 β oraz MIP-1 β , działanie CO zależy od pobudzania szlaku

kinazy p38 MAPK [93, 332], w przypadku zmniejszenia wytwarzania IL-6 do działania CO wymagana jest czynna kinaza JNK [275], wpływ zaś na wytwarzanie GM-CSF (obserwowany także w hodowanych komórkach mięśni gładkich oskrzeli HASMC) zależy częściowo od cGMP, a częściowo od zahamowania, grającego pierwszoplanową rolę w reakcjach zapalnych, czynnika transkrypcyjnego NF κ B [350, 372]. Zarówno indukcja HO-1, jak też egzogeny CO zmniejsza ekspresję zapalnych molekuł adhezyjnych na hodowanych komórkach śródbłonna [368, 417].

Tlenek węgla hamuje proliferację komórek zapalnych oraz mięśni gładkich naczyń (istotne w rozwoju nadciśnienia czy miażdżycy) i oskrzeli (istotne w rozwoju astmy). Skomplikowany mechanizm wpływu CO na procesy mnożenia się i wzrostu komórek mięśni gładkich obejmuje cGMP-zależne pobudzenie kinazy p38 MAPK, w wyniku którego dochodzi do indukcji inhibitora progresji cyklu p21^{Waf1/Cip1} oraz hamowania kluczowego dla postępu cyklu czynnika transkrypcyjnego E2F [273, 274]; ostatnio wykrywa się także inne mechanizmy tego ważnego wpływu CO na mięśniówkę gładką [390]. Antyproliferacyjny wpływ CO obserwowano w zwierzęcym modelu restenozy po uszkodzeniu balonem tętnicy szyjnej [307]. Indukcję inhibitora p21^{Waf1/Cip1} przez CO wykazano także w hodowanych limfocytach T [371].

W kilku pracach donoszono zarówno o pro-, jak i antyapoptotycznym działaniu CO. Hamowanie apoptozy przez CO opisano na modelu stymulowanych przez TNF- α hodowanych fibroblastów [315] oraz komórek śródbłonna [51]. W przypadku komórek śródbłonna działanie CO zależało od kinazy p38 MAPK oraz wiązało się z pobudzeniem czynnika transkrypcyjnego NF κ B [51]. Należy dodać, że wpływ CO na procesy apoptozy jest wciąż przedmiotem kontrowersji. Wykazano proapoptotyczne działanie CO na komórki śródbłonna [400]; w komórkach T linii Jurkat CO aktywował kaspazy oraz hamował antyapoptotyczne białko Bcl-x1 [373]. Wiadomo również, że wysokie stężenia CO wywołują apoptozę komórek nerwowych mózgu [318].

Pomimo kontrowersji co do szczegółów mechanizmów działania produktów reakcji HO, nie ma wątpliwości, że aktywacja tego szlaku metabolicznego oferuje potężne działanie ochronne [przegląd zob. 343], obserwowane w zwierzęcych modelach schorzeń zapalnych [393], jak wstrząs septyczny [305], astma [63] i odrzucanie przeszczepu [198, 320, 353], czy sercowo-naczyniowych, jak zawał mięśnia sercowego [242, 333], miażdżycy [179, 451], niektóre postaci nadciśnienia tętniczego [292] i uszkodzenie związane z niedokrwieniem i reperfuzją [283]. Ochronne znaczenie szlaku HO podkreślają dane pochodzące z badań nad zwierzętami transgenicznymi z wyłączonymi genami HO-1 lub HO-2 [141, 301, 327, 451] oraz kliniczny opis niedoboru genetycznego HO-1 u człowieka [209, 300, 443]. Nie dziwią więc próby terapeutycznego wykorzystania CO: w postaci związków uwalniających CO („CO-donorów” [277]) lub indukowania HO-1 (metaloporfiryny, polifenole roślinne [1]). Projektowaniu leków musi towarzyszyć jednak głębsze zrozumienie mechanizmów ochronnego działania szlaku HO. Wciąż nie są jasne mechanizmy wpływu HO na procesy programowanej śmierci komórki – apoptozy, a właśnie nadmierna apoptoza może odgrywać ważną rolę w wymienionych wyżej schorzeniach. Co więcej, szlak HO i apoptoza wydają się z sobą ściśle związane – niemal wszystkie bodźce indukujące HO-1 mogą również spowodować programowaną śmierć komórki.

1.2. Apoptoza

Rozróżnienie pomiędzy gwałtownym, wywołanym działaniem silnych czynników uszkadzających, rozpadem komórki a ściśle zaprogramowanym i kontrolowanym jej umieraniem wprowadził w 1972 roku Kerr, nazywając pierwszy proces nekrozą, drugi zaś apoptozą (*apoptosis* – gr. opadanie liści z drzew) [200]. Już wcześniej jednak zauważono, że w czasie różnicowania i rozwoju organizmu zachodzi kontrolowana eliminacja niepotrzebnych komórek, wprowadzając pojęcie programowanej śmierci komórki [244]. Obecnie wiadomo, że absolutny rozdział pomiędzy nekrozą a apoptozą nie jest do końca prawdziwy, a komórki, w zależności od rodzaju bodźców i ich nasilenia, mogą umierać na kilka różnych, czasem wykorzystujących wspólne mechanizmy sposobów [20, 21, 50, 81, 186]; obecnie sugeruje się również istnienie programowanej nekrozy [42]. Niemniej nadal uznaje się za prawdziwy klasyczny opis morfologiczny, podkreślający różnicę pomiędzy nekrozą a apoptozą [217]. W przypadku nekrozy, na skutek całkowitego załamania się metabolizmu energetycznego i braku funkcjonowania błony komórkowej, komórka „puchnie”, następuje masywna aktywacja proteaz, przerwanie błony komórkowej, a zawartość cytoplazmy wylewa się do otoczenia, powodując lokalną reakcję zapalną. W wypadku apoptozy komórka kurczy się i oddziela od otaczających struktur, DNA ulega fragmentacji, chromatyna ulega kondensacji i zgromadzeniu pod błoną jądrową, a degradacja cytoszkieletu powoduje obkurczanie się jądra i cytoplazmy z ich fragmentacją i formowaniem się pęcherzyków zawierających fragmenty struktur komórkowych (*zeiosis*). Resztki komórki apoptotycznej ulegają niezapalnej fagocytozie.

Fenomen programowanej śmierci jest obecny niemal w całym świecie żywym: w królestwie zwierząt i roślin [369, 404]. Obserwowano go także u drożdży [130], a nawet u niektórych bakterii [14]. Co więcej, przynajmniej w świecie zwierzęcym, molekularne mechanizmy apoptozy wykazują duże podobieństwa [217, 259, 447].

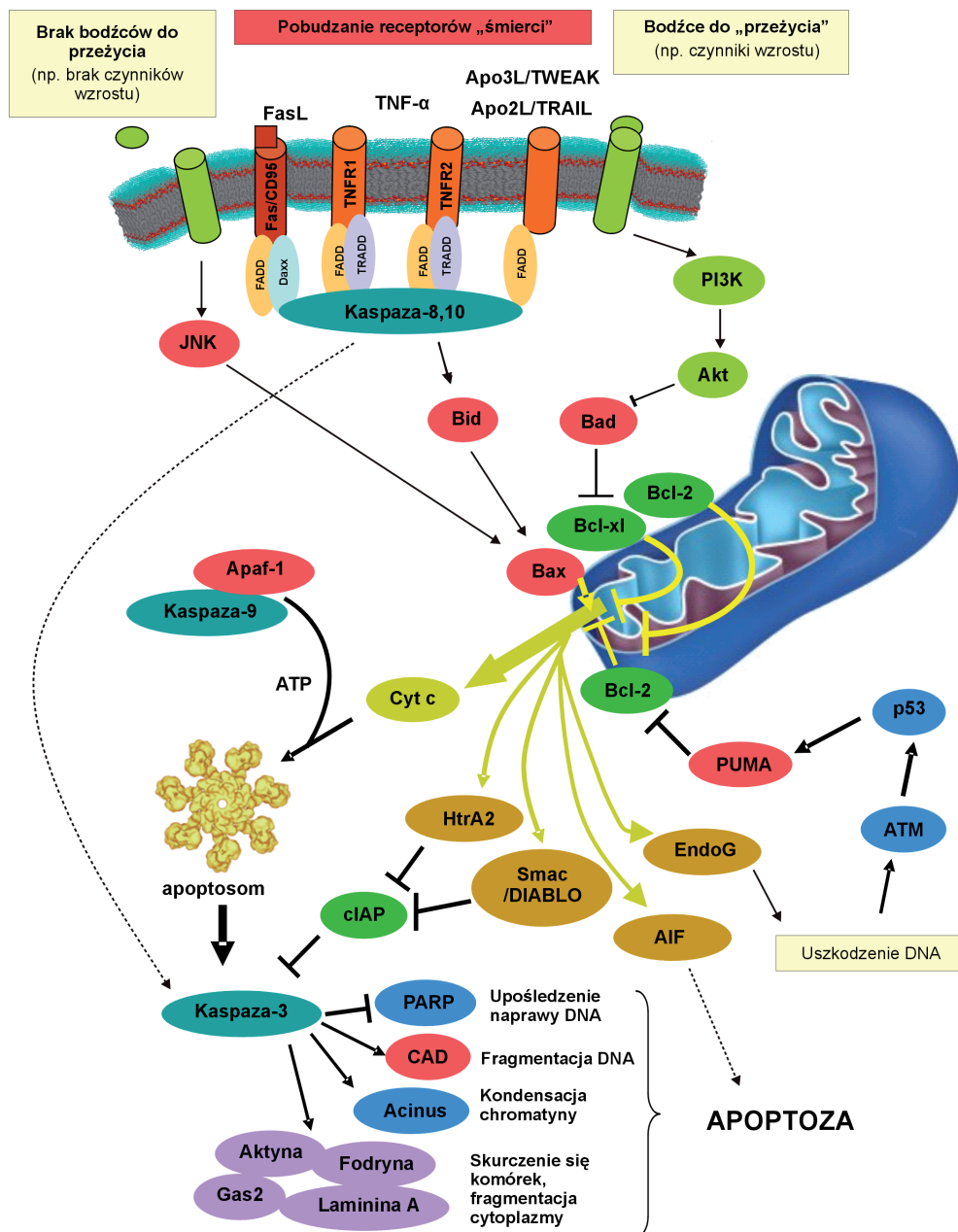
Dokładne omówienie oszałamiającej złożonością maszynarii molekularnej, „obsługującej” apoptozę, daleko wykracza poza ramy niniejszej pracy (szczegóły Czytelnik znajdzie w wielu artykułach poglądowych: 13, 21, 35, 66, 73, 102, 147, 152, 168, 185, 186, 206, 217, 259, 462) – zostaną więc krótko omówione jedynie najważniejsze (w świetle obecnej wiedzy i w kontekście tematu pracy) szlaki i mechanizmy.

Apoptoza może zostać zainicjowana i przebiegać na kilku różnych drogach, z których najważniejsze to: szlak zewnątrzpochodny zależny od pobudzenia tzw. receptorów śmierci (głównie receptory dla TNF- α) oraz szlak wewnątrzpochodny, w którym największe znaczenie odgrywają mitochondria (szlak mitochondrialny) (rys. 2). Oprócz tych dwóch głównych dróg znaleziono dodatkowe, inicjowane z zewnątrz (szlak zależny od granzy mu B i perforyny) oraz z wewnątrz komórki (szlak związany z zaburzeniem czynności siateczki śródplazmatycznej) [50, 189]. Apoptozę może nasilać deprywacja bodźców wzrostowych, a hamować – działanie czynników wzrostu (rys. 2). O tym, na jakiej drodze będzie zachodzić apoptoza, decyduje charakter uszkodzenia i rodzaj komórek na nie odpowiadający. Ogólnie, szlak zewnątrzpochodny aktywowany jest przez bodźce zapalne i preferowany w układzie immunologicznym. Do aktywacji drogi wewnątrzpochodnej dochodzi w wyniku przeładowania cytoplazmy wolnym Ca²⁺, wzrostu w komórce wytwarzania ROS, wykrytego przez komórkę poważnego uszkodzenia DNA, czy zaburzeń regulacji cyklu komórkowego.

Rodzina proteaz cysteinowych – kaspaz, odgrywa podstawową rolę w przebiegu obu szlaków apoptozy [36, 170, 316, 341, 349, 359]. Obecne w komórce jako zymogeny (prokaspazy) mogą zostać aktywowane przez receptorowe kompleksy białkowe związane z pobudzonymi „receptorami śmierci” drogi zewnątrzpochothanej (kaspaza-8, kaspaza-10) lub przez kompleks białka Apaf-1 i cytochromu c, uwolnionego z mitochondriów na drodze wewnątrzpochothanej (kaspaza-9) (rys. 2). Oba szlaki doprowadzają do aktywacji kaspazy-3, która sama, lub aktywując kolejne białka, nieodwracalnie doprowadza do fragmentacji DNA, zmian w jądrze komórkowym i zaburzeń cytoszkieletu, które prowadzą do opisanych wcześniej zmian morfologicznych (rys. 2). Kaspazy aktywowane podczas zapoczątkowywania szlaków apoptozy (kaspaza-2, -8, -9, -10) nazywa się czasem „inicjującymi”, kaspazy zaś bezpośrednio realizujące program śmierci komórki – „wykonawczymi” (kaspaza-3, -6, -7) [170]. Opisano także zachodzenie apoptozy (głównie szlaku wewnątrzpochothanej) bez udziału kaspaz, zależne od uwolnienia z mitochondriów czynnika AIF (*apoptosis inducing factor*) oraz endonukleazy G, degradującej DNA [50].

Centralne miejsce w **wewnątrzpochothanej szlaku apoptozy** zajmują mitochondria [17, 45, 162, 260, 340, 363, 438] i to nie tylko dlatego, że w pewnych warunkach mogą być źródłem proapoptotycznych ROS [302, 385, 402], lecz przede wszystkim dlatego, że mogą uwalniać do cytoplazmy białkowe czynniki aktywujące apoptozę (rys. 2). Wszystkie czynniki wywołujące apoptozę doprowadzają do upośledzenia funkcji mitochondriów, objawiającego się spadkiem potencjału błonowego $\Delta\Psi$. Wydaje się, że istotną rolę w „powiadomieniu” mitochondriów np. o uszkodzeniu DNA odgrywa białko p53, wraz z kinazą ATM stojące na straży integralności genomu i prawidłowego postępu cyklu komórkowego [109, 129, 445]. Kluczowym zdarzeniem na wewnątrzkomórkowym szlaku apoptozy jest wzrost przepuszczalności błon mitochondrialnych i uwolnienie do cytozolu z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów szeregu białek – potężnych stymulatorów apoptozy [215]. Spośród nich najważniejsze to cytochrom c, białko Smac/DIABLO, Omi/Htr A2, AIF, endonukleaza G i prokaspazy-2, -3 i -9. Chociaż istnieją kontrowersje co do dokładnego mechanizmu uwalniania tych białek z mitochondriów [215], z pewnością w procesie tym uczestniczy megakanal – PTP (*permeability transition pore*), zlokalizowany w miejscu zetknięcia się zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrium. W formowaniu się PTP, od strony błony wewnętrznej uczestniczy translokaza nukleotydów adeninowych (ANT – *adenine nucleotide translocator*), po stronie błony zewnętrznej zaś poryna VDAC (*voltage dependent anion channel*). Oprócz tych dwóch w skład kompleksu PTP wchodzi również inne białka (obwodowy receptor dla benzodiazepin, heksokinaza, kinazy glicerolowe, kinazy kreatynowe, cyklofilina D). Z PTP wiążą się również białka regulatorowe rodziny Bcl-2 (zob. dalej) [17, 208]. PTP ma średnicę 2–3 nm i może przepuszczać cząsteczki o masie nawet 1,5 kDa. Uwolniony do cytozolu cytochrom c wiąże się z białkiem Apaf-1. Powstały kompleks po oligomeryzacji, związaniu i aktywacji prokaspazy-9 nazywany jest apoptosomem (a ze względu na swą promienistą symetrię – „kołem śmierci”). Apoptosom silnie aktywuje „wykonawczą” kaspazę-3 (rys. 2).

Apoptoza jest procesem regulowanym. Istnieje kilka grup białek zaangażowanych w kontrolę (zarówno hamowanie, jak i nasilanie) mechanizmów programowanej śmierci komórki. Najlepiej poznanymi regulatorami apoptozy są białka rodziny Bcl-2 odkryte w hodowanych komórkach chłoniaka (*B cell leukemia/lymphoma-2*). Główna rola tych



Rys. 2. Schematyczne ujęcie podstawowych szlaków apoptozy. Szczegóły w tekście

białek to modulowanie uwalniania z mitochondriów czynników proapoptotycznych [112, 205]. W licznej rodzinie Bcl-2 można wyróżnić grupę białek hamujących apoptozę (np. Bcl-2, Bcl-xl) oraz grupę białek proapoptotycznych (np. Bax, Bak, Bid, Bad). Role poszczególnych białek są dość zróżnicowane. Proapoptotyczne białko Bax uczestniczy w zwiększaniu przepuszczalności mitochondriów, oddziałując z PTP i/lub formując po oligomeryzacji pory w błonie zewnętrznej [112]. Antyapoptotyczne białka Bcl-2 i Bcl-xl (zlokalizowane na zewnętrznej błonie mitochondrialnej i otoczce jądrowej) wiążą się z białkami proapoptotycznymi i zapobiegają destabilizacji mitochondriów. Wydaje się, że Bcl-2 i Bcl-xl mogą również bezpośrednio hamować kaspazy [386]. Pobudzane na drodze receptorowej białko Bid uczestniczy w zwiększaniu przepuszczalności mitochondriów, funkcjonuje więc jako przełączenie pomiędzy zewnątrz- a wewnątrzpochodnym szlakiem apoptozy (rys. 2) [148, 386]. Równowaga pomiędzy białkami pro- i antyapoptotycznymi jest zaburzana, kiedy działają bodźce uszkadzające komórki – dochodzi wtedy do indukcji białek proapoptotycznych i rozhamowania ich działania [205].

Wiele innych białek bierze udział w regulowaniu procesów apoptozy: ważną grupą inhibitorów apoptozy są białka IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) [349]; hamują one aktywność kaspaz. Szlaki apoptozy modulowane są także przez białka szoku cieplnego (HSP) [30, 349]. Co ciekawe, oksygenaza hemowa, chociaż nie pełni funkcji HSP, była początkowo zaliczana do grupy białek szoku cieplnego [201].

Białka biorące udział w apoptozie mogą być fosforylowane (a także podlegać innym modyfikacjom) przez kinazy uczestniczące w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów. Znana jest antyapoptotyczna rola kinaz PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) oraz kinazy Akt (*protein kinase B*) [68, 128, 370, 401].

Obecność tak skomplikowanej maszynerii zapewniającej prawidłowy przebieg śmierci komórki wskazuje na bardzo istotną biologiczną rolę zjawiska programowanej śmierci komórki. Apoptoza bierze udział w morfogenezie w życiu zarodkowym [102, 232], jest podstawową drogą eliminowania komórek w czasie różnicowania i dojrzewania w organizmie dojrzałym (np. tymocyty w grasicy, neurony w dojrzewającym mózgu [29, 247]), jest wreszcie podstawowym mechanizmem usuwania komórek „zepsutych” (z uszkodzonym DNA, niezdolnych do prawidłowego i kontrolowanego wzrostu) lub komórek, które zakończyły swą „misję” biologiczną (granulocyty, inne komórki układu immunologicznego). Nie dziwi więc fakt, że upośledzenie apoptozy (np. mutacje białek proapoptotycznych) przyczynia się do powstawania nowotworów [57, 78, 220, 357, 361, 420, 455]. Należy również podkreślić, że apoptoza to główny mechanizm śmierci komórek nowotworowych poddanych działaniu chemioterapeutyków, a jej upośledzenie może przesądzać o niepowodzeniu terapii przeciwnowotworowej [249, 324]. Uszkodzenie mechanizmów śmierci i eliminacji komórek układu immunologicznego może również odgrywać rolę w rozwoju schorzeń autoimmunizacyjnych [266, 291, 328].

Jednakże nadmiernie nasiloną apoptozą jest istotnym czynnikiem w patogenezie wielu schorzeń, w tym również przewlekłych chorób „cywilizacyjnych”. Stopniowo odkrywa się udział tego zjawiska w rozwoju miażdżycy [222, 269], nadciśnienia [124] i cukrzycy [229]. Modulowanie procesów apoptozy mogłoby więc reprezentować nowe podejście do leczenia tych schorzeń.

1.3. Ostre i przewlekłe uszkodzenie nerek

Nerka, z uwagi na mnogość pełnionych funkcji, jest narządem podstawowym dla zachowania homeostazy. Pogorszenie czynności nerek, oprócz nieprawidłowości gospodarki wodno-elektrolitowej, powoduje m.in. zaburzenia funkcjonowania układu endokrynnego oraz układu krążenia i hemostazy [167, 312]. Zarówno ostra, jak i przewlekła niewydolność nerek, a zwłaszcza jej postać schyłkowa stanowią wciąż bardzo ważny i trudny problem kliniczny, przed którym stają lekarze różnych specjalności [154, 167, 212, 225, 234, 271, 312]. Pomimo pewnych postępów w zrozumieniu patogenezы i wciąż udoskonalanych strategii terapeutycznych, współczesna medycyna nie oferuje definitywnego leczenia tych stanów [187, 211, 212]. Bez wątpienia do powstania nowych, skutecznych leków może przyczynić się lepsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za ostre i przewlekłe uszkodzenie nerek.

Nie wchodząc w zawilóci terminologii klinicznej (Amerykańskie Towarzystwo Nefrologiczne sugeruje zastąpienie terminu „ostra niewydolność nerek” określeniem „ostre uszkodzenie nerek” [5, 412]), ostra niewydolność nerek oznacza nagłe (czasokres minut – dni) zmniejszenie się filtracji kłębuszkowej, spowodowane przyczynami klasyfikowanymi tradycyjnie jako „przednerkowe” (prerenalne), „zanerkowe” (postrenalne) i „nerkowe” [167]. Niewydolność „przednerkowa” rozwija się w odpowiedzi na spadek przepływu krwi przez nerki (hipowolemia, hipotensja, niewydolność serca), przy braku lub niewielkim zaburzeniu ich mikrostruktury. Z kolei uszkodzenie „zanerkowe” spowodowane jest uniemożliwieniem odpływu moczu (kamica dróg moczowych, ucisk moczowodów) i charakteryzuje się wodonerczem z poszerzeniem układu kielichowego nerek i spłaszczeniem brodawek nerkowych. W niewydolności spowodowanej przyczynami „nerkowymi” najważniejszą rolę odgrywa uszkodzenie struktury narządu: kłębuszków, cewek, naczyń krwionośnych lub mięszu nerek.

Niewydolność „nerkowa” jest patofizjologicznie najważniejszym i najczęstszym rodzajem ostrego uszkodzenia nerek [5]. Prowadzi do niej przewlekające się niedokrwienie (wiodą do niego wszystkie przyczyny uszkodzenia „przednerkowego”), a także działanie substancji nefrotoksycznych (np. środki kontrastowe), uszkodzenie naczyń (zakrzepica, *vasculitis*) czy schorzenia kłębuszków nerkowych [5, 167]. Należy podkreślić, że pomimo różnorodnych przyczyn mechanizmy i obraz patologiczny ostrego „nerkowego” uszkodzenia nerek są bardzo podobne [97].

W obrazie mikroskopowym najbardziej typowo występuje poszerzenie kanalików bliższych oraz spłaszczenie i uszkodzenie rąbka szczoteczkowego komórek nabłonka w kanalikach bliższych. Obecny jest ubytek komórek nabłonka kanalików bliższych i dalszych z obecnymi tam obszarami nekrozy (głównie w zewnętrznym obszarze rdzenia nerek), apoptozy i regeneracji. W cewkach pojawiają się wałeczki, a naczynia okołocewkowe charakteryzują się uszkodzeniem komórek śródbłonka i akumulacją leukocytów [5, 96, 97].

Wydaje się, że osiowe dla rozwoju ostrego „nerkowego” uszkodzenia nerek są pierwotne zaburzenia struktury i funkcji komórek cewek nerkowych, nasilane przez zmiany hemodynamiczne (skurcz naczyń i niedokrwienie rdzenia nerek), uszkodzenie naczyń oraz pojawiającą się odpowiedź zapalną (uszkodzenie śródbłonka naczyń, akumulacja komórek zapalnych ze wzmózoną produkcją cytokin) [5, 27, 38, 40, 97, 223]. W komór-

kach cewek dochodzi do upośledzenia metabolizmu tlenowego, nagromadzenia produktów rozkładu ATP (AMP, hipoksantyna, ksantyna), zaburzeń gospodarki jonami wapnia (wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{++}) i zwiększonego powstawania reaktywnych form tlenu [97]. W takich warunkach dochodzi do dysfunkcji cytoszkieletu komórek nabłonka cewek, rozszczelnienia się połączeń pomiędzy komórkami i zahamowania Na , K -ATPazy odpowiadającej za resorpcję Na^+ .

Ostatnie badania sugerują, że istotną rolę w rozwoju ostrego uszkodzenia nerek odgrywa dysfunkcja mitochondriów komórek nabłonka cewek oraz związana z nią ich nasilona apoptoza [37, 39, 84, 90, 95, 96, 113, 153, 196, 410]. Badania te podkreślają również ważną dla przywrócenia funkcji nerek rolę stosunkowo szybko pojawiającej się regeneracji komórek nabłonka cewek [5, 39, 95–97, 239, 241, 309, 310].

Co ciekawe, wydaje się, że pomimo odmiennych przyczyn (głównie nadciśnienie i cukrzyca), obrazu morfologicznego (dominuje raczej postępujące uszkodzenie kłębuszków nerkowych i zwłóknienie mięszu) oraz mniejszej intensywności procesu, podobne mechanizmy mogą także odpowiadać za postęp przewlekłej niewydolności nerek [27, 138, 153, 154, 225, 234, 265, 270, 271, 342, 351, 354, 358, 444]. Także i w tym przypadku dochodzi do niedotlenienia rdzenia nerki, uszkodzenia nabłonka cewek oraz tkanki śródmiąższowej, a w przebiegu tych zjawisk dużą rolę odgrywa nasilona apoptoza, uszkodzenie naczyń i reakcja zapalna [135, 227, 270, 284, 285, 358, 408, 444, 454].

Analiza mechanizmów ostrego i przewlekłego uszkodzenia nerek pozwala scharakteryzować cechy najbardziej pożądanej interwencji terapeutycznej: zapobieganie niedotlenieniu rdzenia nerek i skurczowi naczyń, hamowanie apoptozy komórek nabłonka cewek i śródbłonka naczyń oraz tłumienie reakcji zapalnej. Takie działania może wykazywać szlak oksygenazy hemowej, a jego naśladowanie, np. poprzez farmakologiczną indukcję HO-1, mogłoby stanowić nową strategię zapobiegania i leczenia niewydolności nerek.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Nerki są szczególnym narządem w etiopatogenezie takich schorzeń, jak nadciśnienie i cukrzyca [119, 122, 136, 173, 243, 336, 463]. Jednocześnie w fizjopatologii nerek ważną rolę odgrywa szlak HO, a szczególnie właściwości ochronne izoformy HO-1 [3, 166, 286].

Wykazano, że w nerkach, w przebiegu schorzeń przewlekłych – nadciśnienia i cukrzycy, a także w czasie ich niedokrwienia i rozwoju ostrej niewydolności, dużą rolę odgrywa nadmiernie nasilona apoptoza [37, 90, 106, 133, 348]. Co ciekawe, we wszystkich wymienionych schorzeniach wykryto w nerkach indukcję HO-1, wskazując na jej działanie ochronne [7, 9, 10, 362, 392]. Wydaje się więc, że nerki są idealnym narządem do zbadania interakcji pomiędzy szlakiem HO a mechanizmami programowanej śmierci komórki oraz oceny, czy za korzystne własności szlaku HO może odpowiadać hamowanie apoptozy.

Celem pracy jest zbadanie mechanizmów oddziaływania szlaku HO na procesy apoptozy w trzech różnych modelach uszkodzenia nerek:

- modelu nadciśnienia naczyniowo-nerkowego 2K1C (*2 Kidney 1 Clip*);
- modelu ostrej niewydolności nerek spowodowanej podaniem środka kontrastowego (ONN);
- modelu cukrzycy spowodowanej podaniem streptozotocyny (STZ).

Rozwój zmian patologicznych w nerce po zaciśnięciu tętnicy nerkowej w modelu 2K1C oraz po podaniu środka kontrastowego w modelu ONN odpowiada obrazowi ostrego uszkodzenia nerek. Oba modele są dobrze opisane i wiernie oddają mechanizmy uszkodzenia obserwowane w praktyce klinicznej: zmniejszenie przepływu krwi przez nerki, niedotlenienie (zwłaszcza rdzenia nerki), zwiększone powstawanie reaktywnych form tlenu, uszkodzenie nabłonka cewek i kanalików nerkowych oraz wtórną aktywację endokrynnych mechanizmów kompensacyjnych (zwiększone powstawanie angiotensyny II) [23, 94, 137, 150, 164, 165, 169, 224, 268, 272].

Model cukrzycy typu I, polegający na zniszczeniu wysepek trzustkowych podaniem streptozotocyny, jest szeroko stosowany w badaniach nad mechanizmami przewlekłego uszkodzenia nerek [32, 60, 125, 245, 347, 427, 430].

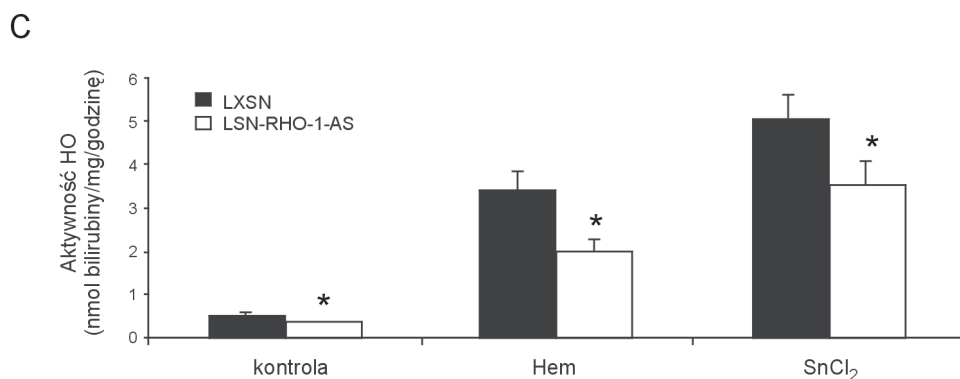
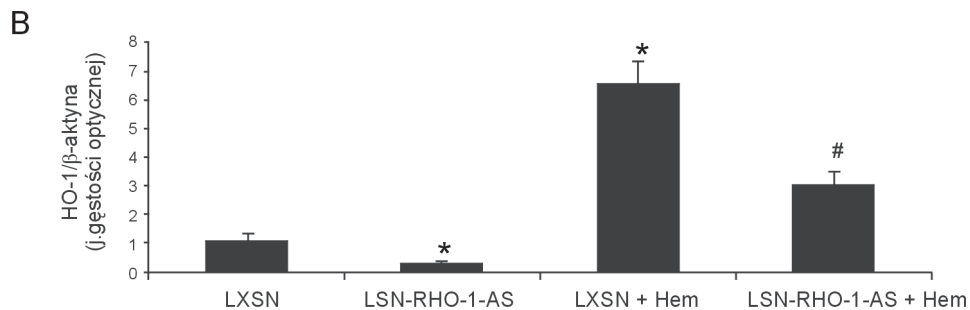
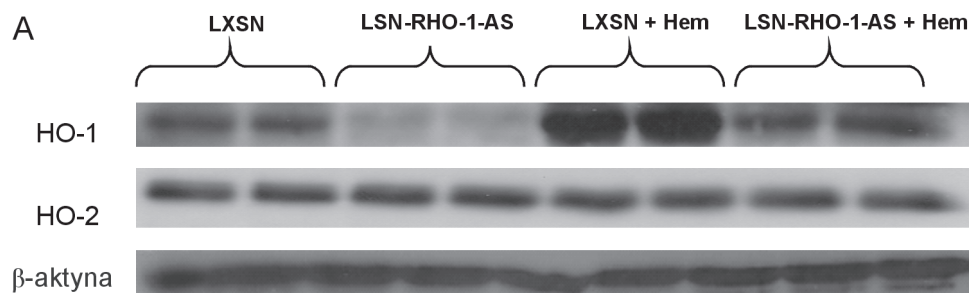
Poznanie mechanizmów wpływu HO na układy wykonawcze i regulatorowe apoptozy w wyżej wymienionych modelach mogłoby rzucić nowe światło na szczegóły ochronnego działania szlaku HO i dać podstawy do projektowania nowych leków nefroprotekcyjnych.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Zwierzęta laboratoryjne

Wszystkie eksperymenty na zwierzętach zostały oparte na wytycznych publikowanych przez Narodowe Instytuty Zdrowia (NIH, 2006). Zwierzęta pochodziły z Charles River Laboratories (Wilmington, USA). W badaniach używano szczurów Sprague-Dawley (SD) (**model 2K1C, model cukrzycy**) o masie 200–250 gramów oraz samców szczurów Sabra (szczep wyprowadzony ze szczepu Wistar) o masie 260–380 gramów (**model ONN**). Zwierzęta aklimatyzowały się przed eksperymentami przez 4–5 dni. Szczury miały wolny dostęp do wody, przebywały w cyklu oświetlenia/ciemności 12 godzin/12 godzin, w klimatyzowanych pomieszczeniach, w temperaturze 21°C.

Transgeniczne szczury z ekspresją HO-1 w orientacji „antysens” uzyskane zostały zgodnie z metodyką opisaną w piśmiennictwie [330]. Do eksperymentu włączono potomstwo 9 samic szczurów SD (ok. 80 sztuk) trzymany w warunkach hodowli „za barierą” (*pathogen-free*). Do uzyskania modelu upośledzonej ekspresji HO-1 używano osesków męskich (ok. 50% potomstwa), którym zagęszczony wektor retrowirusowy zawierający gen szczurzej HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS, 3–5 x 10⁹ cfu/ml) oraz jako kontrolę wektor „pusty” (LXSN) [330] wstrzykiwano do lewej komory serca w 5. oraz 12. dniu życia. Po wstrzyknięciu oseski wracały do matek. W 21. dniu życia zwierzęta przenoszono do osobnych klatek. W celu potwierdzenia skuteczności procedury, po ukończeniu 1. miesiąca życia, u 3 losowo wybranych zwierząt zmierzono ekspresję HO-1 oraz HO-2, jak również aktywność HO w homogenacie aort, w warunkach podstawowych oraz po użyciu typowych, chemicznych induktorów HO-1 (hem oraz SnCl₂, 1 mg/100 g masy ciała, *i.p.*) (rys. 3). Podanie wektora zawierającego gen szczurzej HO-1 w orientacji „antysens” nie wpływało na ekspresję HO-2, natomiast poziom białka HO-1, jak i aktywność HO były istotnie niższe w grupie zwierząt LSN-RHO-1-AS, zarówno w warunkach podstawowych, jak i po użyciu typowych, chemicznych induktorów HO-1 (rys. 3). Należy podkreślić, że szczury, którym podano wektor LSN-RHO-1-AS, zachowały, chociaż słabszą niż zwierzęta LXSN, zdolność do indukcji HO-1 w odpowiedzi na typowe bodźce chemiczne (rys. 3).



* $p < 0,05$ względem grupy LXSN; # $p < 0,05$ względem grupy LXSN + Hem
Liczebność w każdej z grup $n = 3$

Rys. 3. **(A)** – ekspresja HO-1 oraz HO-2 w aorcji szczurów miesiąc po wstrzyknięciu „pustego” wektora (LXSN) oraz wektora z genem HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS); **(B)** – densytometria prążków z panelu A; **(C)** – porównanie aktywności HO w homogenatach aort

Według *Olszanecki et al.* [301]

3.2. Modele badawcze i protokoły eksperymentów

Model nadciśnienia naczyniowo-nerkowego 2K1C [43, 301] uzyskiwano poprzez niecałkowite (pozostawiona szczelina: 0,25 mm) zamknięcie srebrną U-zapinką lewej

tętnicy nerkowej 12–13-tygodniowych samców szczurów SD (350–370 g). Zabieg wykonywano w znieczuleniu pentobarbitem (50 mg/kg m.c., *i.p.*). Po zabiegu zwierzęta wracały do swoich klatek. Kontrolę stanowiły zwierzęta *sham-operated*, które przechodziły „pozorowaną” procedurę polegającą na otwarciu i zamknięciu jamy otrzewnej. Ciśnienie tętnicze mierzono na tętnicy ogonowej za pomocą sfigmomanometru u spokojnego zwierzęcia niepoddanego anestezji. Na ostatnią dobę przed pobraniem nerek szczury umieszczano w klatkach metabolicznych (Nalge Co., USA) w celu pobrania moczu. W 21. dniu po operacji szczury uśmiercano, pobierano krew (w obecności EDTA) oraz nerki: zarówno nerkę po stronie tętnicy zaciśniętej, jak i po stronie „zdrowej”.

Protokół doświadczeń w modelu 2K1C polegał na zbadaniu 5 grup zwierząt ($n = 6$ każda): A) szczury po wstrzyknięciu „pustego” wektora, poddane operacji pozorowanej (LXSN kontrola), B) szczury po wstrzyknięciu „pustego” wektora, poddane zaciśnięciu tętnicy nerkowej (LXSN 2K1C), C) szczury po wstrzyknięciu wektora z genem HO-1 w orientacji „antysens” poddane operacji pozorowanej (LSN-RHO-1-AS kontrola), D) szczury po wstrzyknięciu wektora z genem HO-1 w orientacji „antysens” poddane operacji zaciśnięcia tętnicy nerkowej (LSN-RHO-1-AS 2K1C) oraz E) szczury po wstrzyknięciu wektora z genem HO-1 w orientacji „antysens” z zaciśniętą tętnicą nerkową, którym podawano chemiczny induktor HO-1, protoporfirynę kobaltową (CoPP, 5 mg/100 g, podskórnym, raz na tydzień przez 3 tygodnie) (LSN-RHO-1-AS 2K1C+CoPP).

Model cukrzycy uzyskano poprzez jednorazowe, dootrzewnowe podanie 3-miesięcznym szczurom rasy Sprague-Dawley steptozotocyny (STZ, Sigma, USA) zawieszanej w buforze cytrynianowym o pH 4,5 [431]. W ciągu 3–5 dni po wstrzyknięciu STZ glikemia u szczurów rosła do ok. 475 ± 65 mg/dl. Aby utrzymać glikemię (mierzoną testami paskowymi we krwi z nacięcia na ogonie) poniżej 300 mg/dl, szczurom podawano insulinę (3 x w tygodniu *neutral protamine Hagedorn* [NPH], 2–3 U/300 g m.c.). Do badań wybrano szczury z rozwiniętą cukrzycą (3 miesiące po podaniu STZ).

Protokół doświadczeń w modelu cukrzycy polegał na zbadaniu 4 grup zwierząt ($n = 6$ każda): A) szczury po wstrzyknięciu „pustego” wektora (LXSN kontrola), B) szczury po wstrzyknięciu „pustego” wektora oraz STZ (LXSN STZ), C) szczury po wstrzyknięciu wektora z genem HO-1 w orientacji „antysens” oraz STZ (LSN-RHO-1-AS STZ), a także D) szczury po wstrzyknięciu wektora z genem HO-1 w orientacji „antysens” oraz STZ, które przed ukończeniem eksperymentów otrzymywały CoPP (5 mg/100 g, podskórnym, raz na tydzień przez 3 tygodnie).

Model ostrej niewydolności nerek (ONN) [142] uzyskano w następujący sposób: szczury, samce szczepu Sabra, na 21 dni przed podaniem środka kontrastowego poddawano jednostronnej nefrektomii. Na 7 dni przed podaniem środka kontrastowego zwierzęta karmiono dietą niskosodową, stosując raz dziennie furosemid (2 mg/kg, *i.p.*). Wskutek tych procedur dobowe wydalanie sodu spadało z 1118 ± 105 mEq (szczury na normalnej diecie) do 278 ± 32 mEq. U szczurów w lekkim znieczuleniu pentobarbitem (50 mg/kg) zakładano polietylenowy cewnik do tętnicy udowej, a jego koniec wypuszczano na skórę karku zwierzęcia (cewnik służył do podania środka kontrastowego oraz pobierania próbek krwi). Na godzinę przed podaniem środka kontrastowego hamowano produkcję prostaglandyn w nerkach, podając zwierzętom 10 mg/kg indometacyny. Jodowy środek kontrastowy (kwas jotalamowy, 60% *Angio-Conray*, Mallinckrodt, Inc., USA) podawano przez ok. 2 minuty w dawce 8 ml/kg m.c. (2,9 g jodu organicznego/kg

m.c.). Kontrolę dla grupy otrzymującej kwas jotalamowy stanowiły zwierzęta poddane jednostronnej nefrektomii, na diecie niskosodowej oraz po podaniu indometacyny. Po zabiegu szczury trzymane były w klatkach metabolicznych (Nalge Co., Rochester, USA) z wolnym dostępem do karmy oraz wody pitnej. Codziennie pobierano krew i zbierano mocz. Nerki pobierano po 48 godzinach.

Protokół doświadczeń w modelu ONN polegał na zbadaniu 4 grup zwierząt ($n = 6$ każda): A) szczury poddane nefrektomii, diecie niskosodowej oraz po iniekcji indometacyny (kontrola), B) szczury po iniekcji kwasu jotalamowego (ONN), C) szczury, które przed podaniem środka kontrastowego otrzymywały CoPP (5 mg/100 g, podskórnice, raz na tydzień przez 3 tygodnie) (ONN + CoPP) oraz D) szczury, które przed podaniem środka kontrastowego otrzymywały inhibitor aktywności HO, mezoporfirynę cynową (SnMP, 5 mg/100 g, podskórnice, raz na tydzień przez 3 tygodnie) (ONN + SnMP).

3.3. Materiał do badań

Materiał stanowiły nerki pobrane od zwierząt w głębokim uśpieniu (pentobarbital 200 mg/kg m.c., *i.p.*). Po wycięciu w całości nerki ważono i zamrażano w ciekłym azocie. W przypadku modelu ONN z pobranych nerek izolowano warstwę korową oraz rdzeń. Całe nerki (model nadciśnienia 2K1C oraz cukrzycy) lub część korową i rdzeń (model ONN) ucierano w ciekłym azocie w mózdzierzu, a powstały proszek homogenizowano w odpowiednich buforach (zob. metody Western blot oraz pomiar aktywności kaspaz); do dalszych analiz używano nadsącza z wirowania homogenatu w 4°C przy 10 000 x g przez 10 minut.

W wybranych przypadkach metodą wirowania różnicowego [337] z homogenatu nerek uzyskiwano frakcję mitochondrialną oraz cytozolową.

3.4. Techniki biologii molekularnej, metody histologiczne oraz biochemiczne

Pomiar ekspresji białek metodą Western blot

Zamrożone w ciekłym azocie nerki, po roztarciu w mózdzierzu homogenizowano w buforze TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) zawierającym 0,25 M sacharozę, 0,5% Nonidet P-40, 10 mM EDTA, koktajl inhibitorów proteaz (Sigma, USA) oraz mieszaninę inhibitorów fosfataz (Pierce Biotechnology). Stężenie białka w próbkach oznaczane było metodą Bradford (Bio-Rad, USA). Przygotowane próbki nakładano na żel poliakrylamidowy (7–15%) i rozdzielano w procesie elektroforezy SDS-PAGE (Mini-Protean III, Bio-Rad, USA). Następnie białka transferowano na membrany PVDF lub nitrocelulozową (Immobilon-P lub Hybond-ECL, Amersham Pharmacia Biotech, USA), używając systemu *semi-dry transfer system* (Bio-Rad, USA). Membrany blokowano przez 24 godziny w 4°C w 5% odtłuszczonym mleku lub odczynniku blokującym dla detekcji fosfoprotein (Zymed, USA). Następnie membrany inkubowano w temperatu-

rze pokojowej ze swoistymi przeciwciałami pierwotnymi (szczegóły – zob. poniżej), a następnie z przeciwciałami wtórnymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (HRP). Membrany po odpłukaniu przeciwciał wtórnych ponownie inkubowano z przeciwciałami przeciw β -aktywie. Świecenie prążków rejestrowano na kliszy fotograficznej (Amersham Pharmacia Biotech, USA), a wynik analizowano za pomocą programu graficznego Scion Image (Scion Corporation, USA).

Przeciwciało przeciw	Rozcieńczenie/czas inkubacji	Źródło
HO-1	1:1000 / 1 godzina	Stressgen Biotechnologies Corp., Kanada
HO-2	1:1000 / 1 godzina	Stressgen Biotechnologies Corp., Kanada
COX-2	1:1000 / 1 godzina	Cayman Chemical Co., USA
3-NT	1:1000 / 2,5 godziny	Cayman Chemical Co., USA
Apaf-1	1:1000 / 2,5 godziny	Cell Signaling Technology Inc., USA
Bcl- xl	1:1000 / 2,5 godziny	Cell Signaling Technology Inc., USA
Bcl-2	1:1000 / 2,5 godziny	Cell Signaling Technology Inc., USA
Bax	1:1000 / 2,5 godziny	Cell Signaling Technology Inc., USA
Akt	1:1000 / 2,5 godziny	Cell Signaling Technology Inc., USA
Fosfo-Akt (SER473)	1:500 / 2,5 godziny	Cell Signaling Technology Inc., USA
Cyt c	1:3000 / 1 godzina	Invitrogen, USA
Cyt IV	1:3000 / 1 godzina	Invitrogen, USA
VDAC-1	1:1000 / 2,5 godziny	Cell Signaling Technology Inc., USA
Beta-actin	1:5000 / 1 godzina	Sigma, USA

Techniki histologiczne oraz immunohistochemiczne

Nerki utrwalano w paraformaldehynie nasyconym cynkiem [329]. Skrawki deparafinizowano w ksylenu i alkoholu, przemywano i inkubowano przez 30 minut w 3% H_2O_2 w metanolu w celu zablokowania endogennej aktywności peroksydazowej. W celu blokowania nieswoistych miejsc wiązania skrawki przemywano i inkubowano w rozcieńczonym osoczu przez 30 minut oraz w mieszaninie awidyny i biotyny przez 15 minut. Następnie preparaty inkubowane były z monoklonalnym przeciwciałem przeciw HO-1 (1:200, Stressgen Biotechnologies, Kanada) przez noc w temperaturze pokojowej, płukane i inkubowane przez 30 minut z biotynylowanym przeciwciałem wtórnym. Na skrawki na 2 minuty aplikowano roztwór substratów dla peroksydazy (DAB DAKO, USA). Preparaty były barwione hematoksyliną-eozyną, a następnie zamykane w celu analizy mikroskopowej.

W barwieniu immunocytochemicznym metodą pozatopieniową z użyciem złota korzystano z pomocy laboratorium mikroskopii elektronowej Zakładu Biologii Komórki New York Medical College.

Pomiar apoptozy metodą TUNEL w tkance

Wizualizację jąder komórek apoptotycznych przeprowadzono metodą TUNEL w preparatach histologicznych testem TdT-FragEL™ DNA fragmentation detection kit

(Calbiochem, USA), zgodnie z instrukcją producenta. Liczbę jader apoptotycznych zliczano jako procent ogólnej liczby jader komórkowych w 10 losowo wybranych polach preparatu przy powiększeniu 200 x.

Pomiar aktywności kaspaz

Aktywność kaspazy-3, kaspazy-8 oraz kaspazy-9 oceniano przy użyciu testów kolorymetrycznych ApoTarget (BioSource International, USA) zgodnie z instrukcją producenta. W skrócie, tkankę homogenizowano w buforze (Tris, pH 7,4, zawierający detergent), homogenat odwirowywano 10 000 x g przez 5 minut w 4°C, a w nadsączu mierzone stężenie białka metodą Bradford. Próbkę zawierającą 200–300 mikrogramów białka inkubowano w ciemności, przez 24 godziny, ze swoistymi dla poszczególnych kaspaz substratami (DEVD-*p*NA dla kaspazy-3, IEDT-*p*NA dla kaspazy-8 oraz LEHD-*p*NA dla kaspazy-9) w temperaturze 37°C. Rozwój reakcji mierzono przyrostem absorbancji przy długości fali 405 nm. Jako kontrolę stosowano próbki niezawierające substratów odszczepiających barwnik. Aktywność kaspaz wyrażano w jednostkach absorbancji (OD 405 nm) na miligram białka.

Pomiar stężenia reniny w osoczu (2K1C)

Stężenie reniny mierzone było metodą radioimmunologiczną (RIA) przy użyciu komercyjnego zestawu (Perkin Elmer Life Science, USA). W skrócie, próbki osocza rozmrażano na lodzie, rozcieńczano buforem maleinianowym (pH 6,0) oraz inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C z substratem dla reniny (osocze pobrane od szczurów 48 godzin po nefrektomii) w obecności dimerkaprolu i 8-hydroksychinoliny. W próbce mierzono przyrost stężenia angiotensyny I (ng/ml/godzinę).

Pomiar stężenia kreatyniny

Stężenie kreatyniny w osoczu oraz w moczu oznaczano przy użyciu komercyjnego zestawu nr 555A (Sigma, USA), zgodnie z zaleceniami producenta.

Pomiar aktywności HO oraz oznaczanie poziomu hemu w tkance

Nerki homogenizowano w buforze TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) zawierającym 0,25 M sacharozę. Homogenaty wirowano przy 10 000 x g przez 10 minut w 4°C. Supernatantu używano do pomiaru aktywności HO. Stosowano metodę polegającą na ekstrakcji chloroformem z próbki (inkubowanej z mieszkanką substratów i kofaktorów HO: heminą, NADP, glukozo-6-fosforanem, dehydrogenazą glukozo-6-fosforanu, mikrosomami z wątroby szczura) bilirubiny, której stężenie mierzono spektrofotometrycznie (Spectrophotometer Lambda 2, Perkin Elmer, Norwalk, USA), używając różnicy absorbancji 460–530 nm oraz współczynnika ekstynkcji 40 mM⁻¹cm⁻¹ [2]. Zawartość hemu w tkance mierzono metodą powstawania hemochromogenu pirydyny, używając różnicy absorbancji 557–530 nm oraz współczynnika ekstynkcji 20,7 mM⁻¹cm⁻¹.

Pomiar wytwarzania anionu ponadtlenkowego

Wytwarzanie anionu ponadtlenkowego (O₂⁻) mierzono dwiema metodami: metodą redukcji ferricytochromu c oraz luminometrycznie. Homogenaty nerek do czasu badania zamrażane były w -80°C. W przypadku pomiaru metodą z ferricytochromem c homogenaty (10–20 mg białka) inkubowane były w 0,5 ml buforu Krebsa-Hanseleita, zawie-

rającego 80 μM cytochromu c oraz 2 mM NaN_3 . Po godzinie inkubacji w temperaturze 37°C zbierano supernatant, a ilość zredukowanego cytochromu c wyliczano z różnicy absorbancji 550–468 nm, stosując współczynnik ekstynkcji 0,0245. Wytwarzanie anionu nadtlenkowego przedstawiano jako mikromole O_2^- /miligram białka.

W metodzie luminometrycznej wytwarzanie O_2^- mierzono przy użyciu 10 μM lucygeniny i licznika Beckman LS6500 [18]. Aktywność przedstawiano jako liczbę impulsów (CPM) na minutę na mg białka.

Pomiar aktywności oksydazy cytochromu c

Aktywność oksydazy cytochromu c we frakcjach mitochondrialnych nerek mierzono spektrofotometrycznie, metodą kinetyczną za pomocą komercyjnego zestawu (Sigma, USA), zgodnie z zaleceniami producenta.

3.5. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako średnie z n pomiarów \pm błąd standardowy. Znamienność statystyczną różnic pomiędzy grupami sprawdzano przy użyciu jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testami *post hoc* LSD Fishera i Sheffego. Za poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Model nadciśnienia naczyniowo-nerkowego 2K1C

4.1.1. Ekspresja HO w nerce w modelu 2K1C

Zaciśnięcie tętnicy nerkowej u „regularnych” (niepoddanych transfekcji wektorami) szczurów SD powodowało indukcję HO-1 w nerce jedynie po stronie zacisku (rys. 4 A–C). Indukcja HO-1 związana była ze wzrostem aktywności HO w tkance nerki (rys. 4 D).

U tych zwierząt HO-1 wyindukowana zaciśnięciem tętnicy nerkowej lokalizowała się przede wszystkim w komórkach tkanki śródmiąższowej rdzenia i, w mniejszym stopniu, kory nerek (rys. 5). Nie stwierdzano HO-1 w komórkach cewek nerkowych.

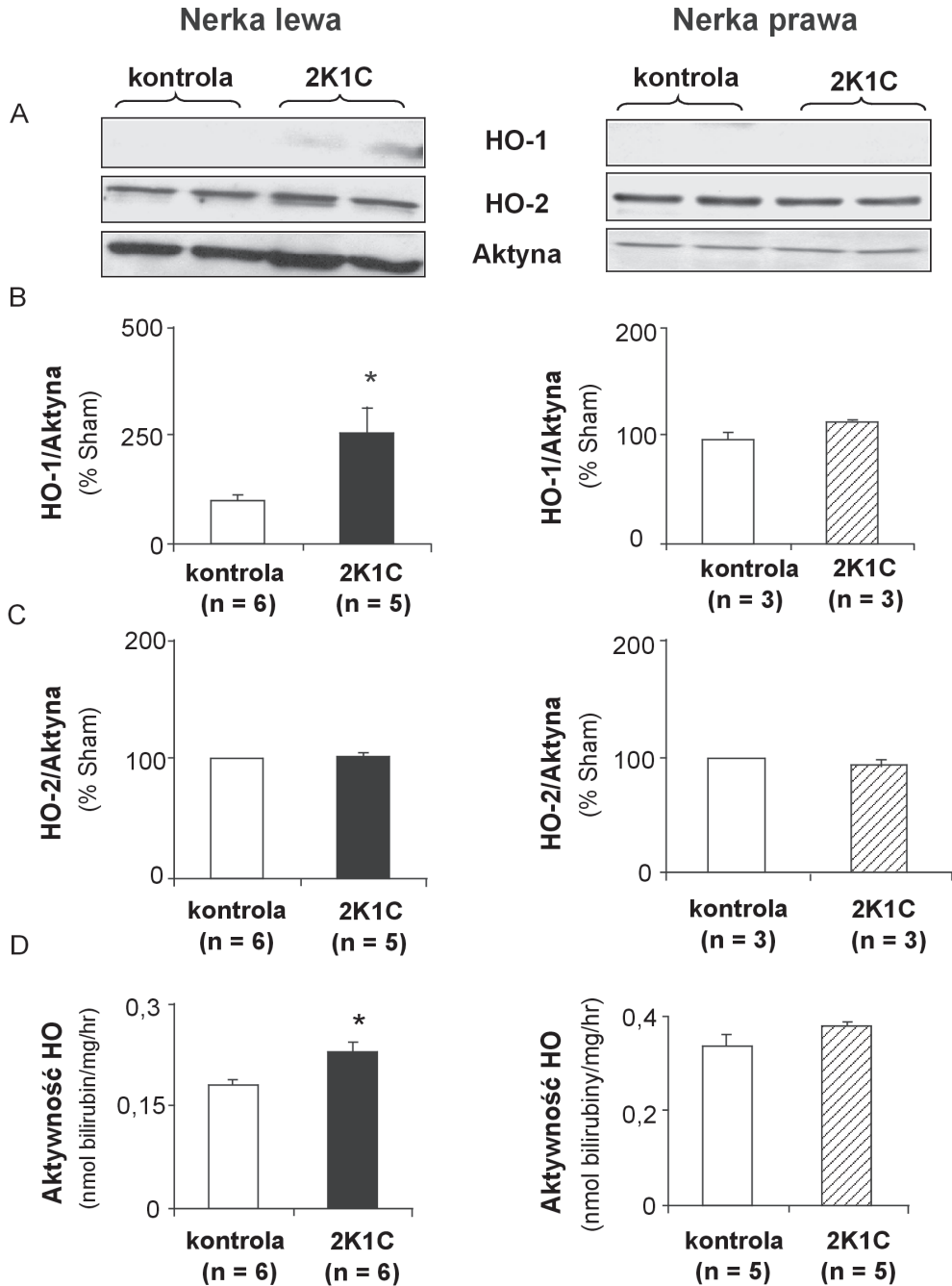
Podobnie do „regularnych” szczurów SD, zaciśnięcie tętnicy nerkowej wywoływało silną indukcję HO-1 w nerkach szczurów, którym podano „pusty” wektor (rys. 6). W nerkach zwierząt, którym podano wektor z genem HO-1 w orientacji „antysens”, zaciśnięcie tętnicy nerkowej nie powodowało indukcji HO-1 (rys. 6). Poziom HO-2 nie zmieniał się znacząco po zabiegu (rys. 6).

Zwierzęta LSN-RHO-1-AS zachowywały jednak zdolność do indukcji HO-1. Zastosowanie chemicznego induktora HO-1 (CoPP) wywoływało znaczny wzrost ekspresji HO-1 w nerkach tych zwierząt, bez wpływu na poziom HO-2 (rys. 7).

4.1.2. Wpływ HO na rozwój nadciśnienia i uszkodzenia nerek w modelu 2K1C

W grupie zwierząt, którym podano wektor LSN-RHO-1-AS, u szczurów poddanych operacji „pozorowanej”, ciśnienie krwi nie podlegało istotnym zmianom. Zaciśnięcie lewej tętnicy nerkowej, już od 12. dnia po zabiegu, powodowało znamienne podwyższenie ciśnienia tętniczego, które w 17. dniu po zabiegu osiągało wartości 151 ± 1 mmHg względem 132 ± 2 mmHg w grupie szczurów poddanych operacji „pozorowanej” ($p < 0,05$) (rys. 10 A).

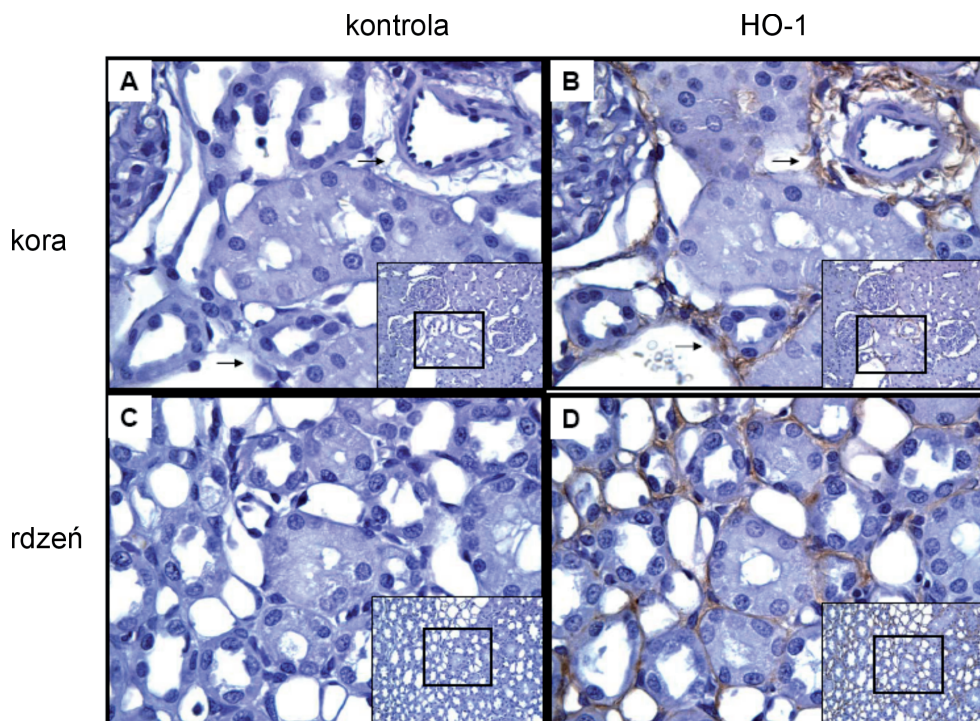
Wzrostowi ciśnienia towarzyszyło podwyższenie stężenia kreatyniny we krwi ($40,3 \pm 2,8$ vs $29,3 \pm 3,9$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,05$) oraz obniżenie się klirensu kreatyniny ($1,5 \pm 0,2$ vs $2,8 \pm 0,4$ ml/min, $p < 0,05$).



* $p < 0,05$ względem grupy *Sham*

Rys. 4. Ekspresja (A), analiza densytmetyryczna (B i C) poziomów HO-1 oraz HO-2 oraz aktywność HO (D) w nerce z zaciśniętą (lewa) oraz niezaciśniętą (prawa) tętnicą nerkową. Nerki pobierano po 21 dniach od zabiegu. Za kontrolę służyły nerki pobrane od szczurów poddanych operacji pozorowanej

Według Botros et al. [43]



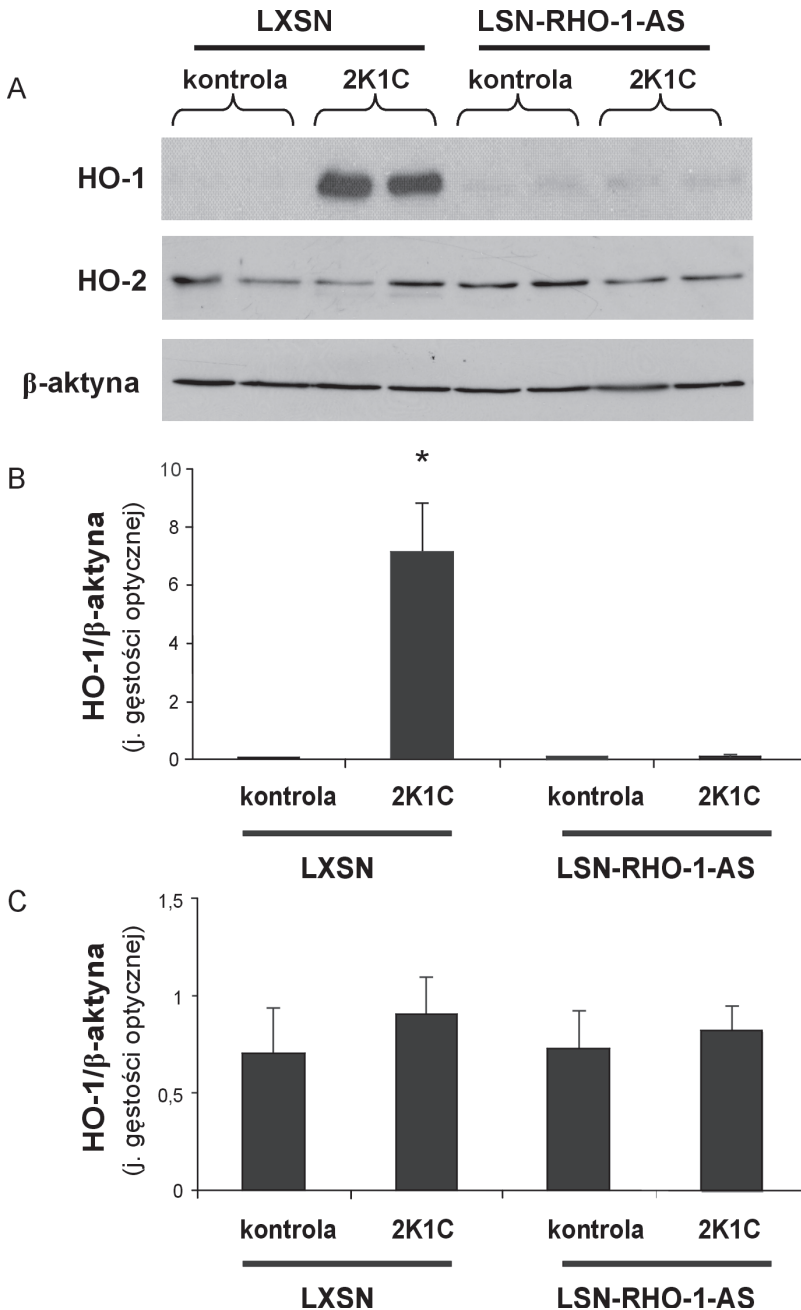
Rys. 5. Analiza immunohistochemiczna HO-1 wykonana na kolejnych skrawkach kory i rdzenia nerki z zaciśniętą tętnicą nerkową (2K1C). Duże zdjęcia przedstawiają 100-krotne powiększenie obszaru zaznaczonego ramką w zdjęciach o powiększeniu 40 x (**A, C**) – kontrole bez przeciwciała pierwotnego; (**B, D**) – inkubacja z przeciwciałem pierwotnym. Sygnał pozytywny dla HO-1 – kolor brązowy

Według *Botros et al.* [43]

Co ciekawe, podawanie zwierzętom LSN-RHO-1-AS z zaciśniętą tętnicą nerkową induktora HO-1, CoPP skutecznie zapobiegało wzrostowi ciśnienia tętniczego (rys. 10 A) oraz częściowo chroniło przed patologicznym spadkiem klirensu kreatyniny w czasie rozwoju nadciśnienia w modelu 2K1C.

Zaciśnięcie tętnicy nerkowej powodowało atrofię nerki (ubytek masy ok. 37%), która była silniej wyrażona w grupie zwierząt LSN-RHO-1-AS w porównaniu z grupą szczurów LXSN (rys. 10 B i C). Podawanie induktora HO-1, CoPP skutecznie zapobiegało atrofii spowodowanej zaciśnięciem tętnicy nerkowej (rys. 10 B i C).

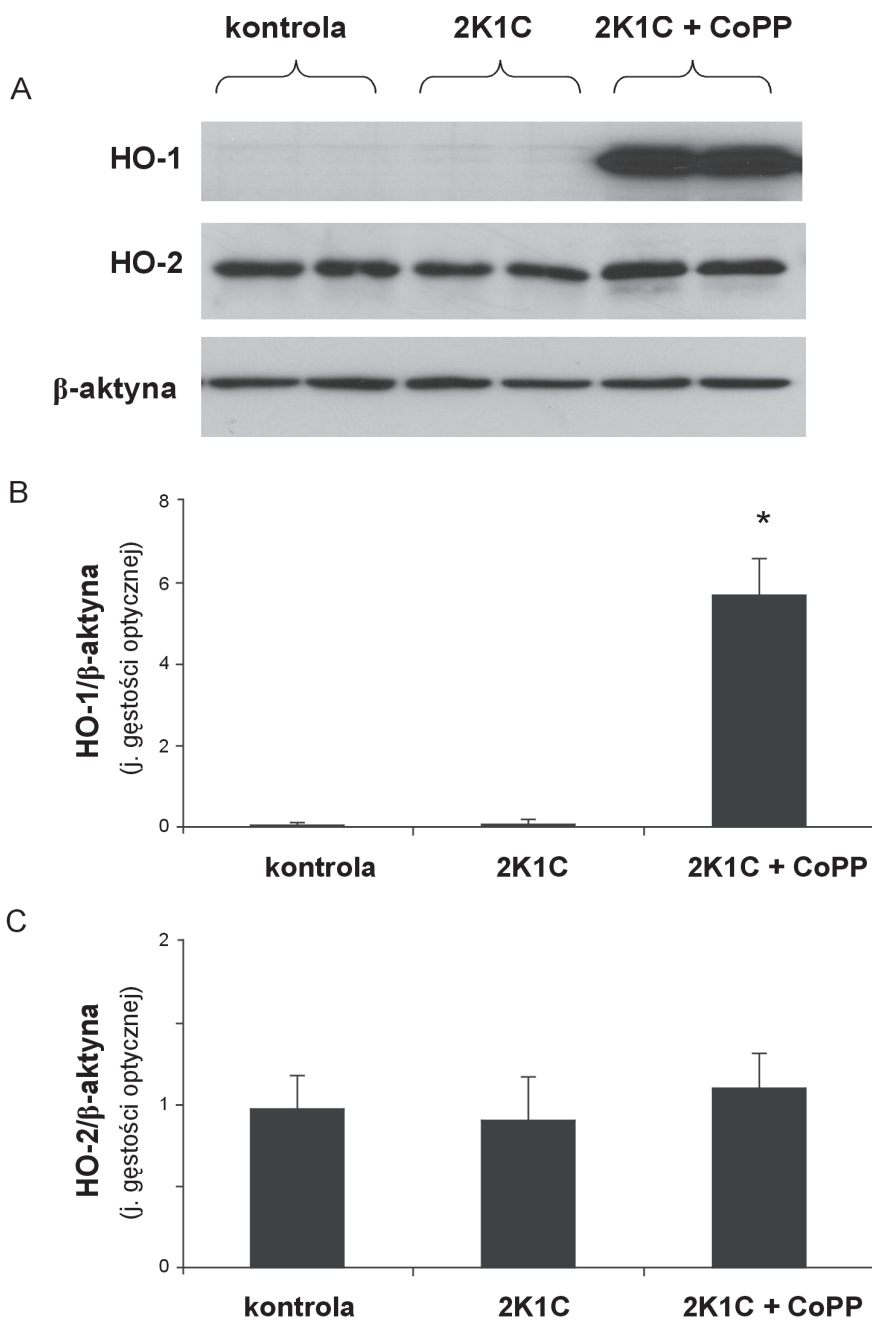
Zaciśnięcie tętnicy nerkowej powodowało zaburzenie mikroskopowej struktury nerek (rozstrzeń cewek oraz nacieki limfocytarne), które było silniej wyrażone w grupie zwierząt LSN-RHO-1-AS w porównaniu ze szczurami LXSN (rys. 9 A–I). Co ciekawe, podawanie CoPP w znacznym stopniu zapobiegało zmianom w nerkach (rys. 9 J–L). Barwienie błękitem pruskim ujawniło złogi żelaza pojawiające się w nerkach po zaciśnięciu tętnicy nerkowej (rys. 9, panel dolny).



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; $n = 4$

Rys. 6. (A) – ekspresja oraz analiza densytometryczna (B i C) poziomów HO-1 oraz HO-2 w nerkach szczurów z wstrzykniętym „pustym” wektorem (LXS) oraz wektorem z genem HO-1 w orientacji „anty-sens” (LSN-RHO-1-AS). Kontrola – szczury poddane operacji „pozorowanej”. 2K1C – nerki z zaciśniętą tętnicą nerkową. Nerki pobierano po 21 dniach od zabiegu

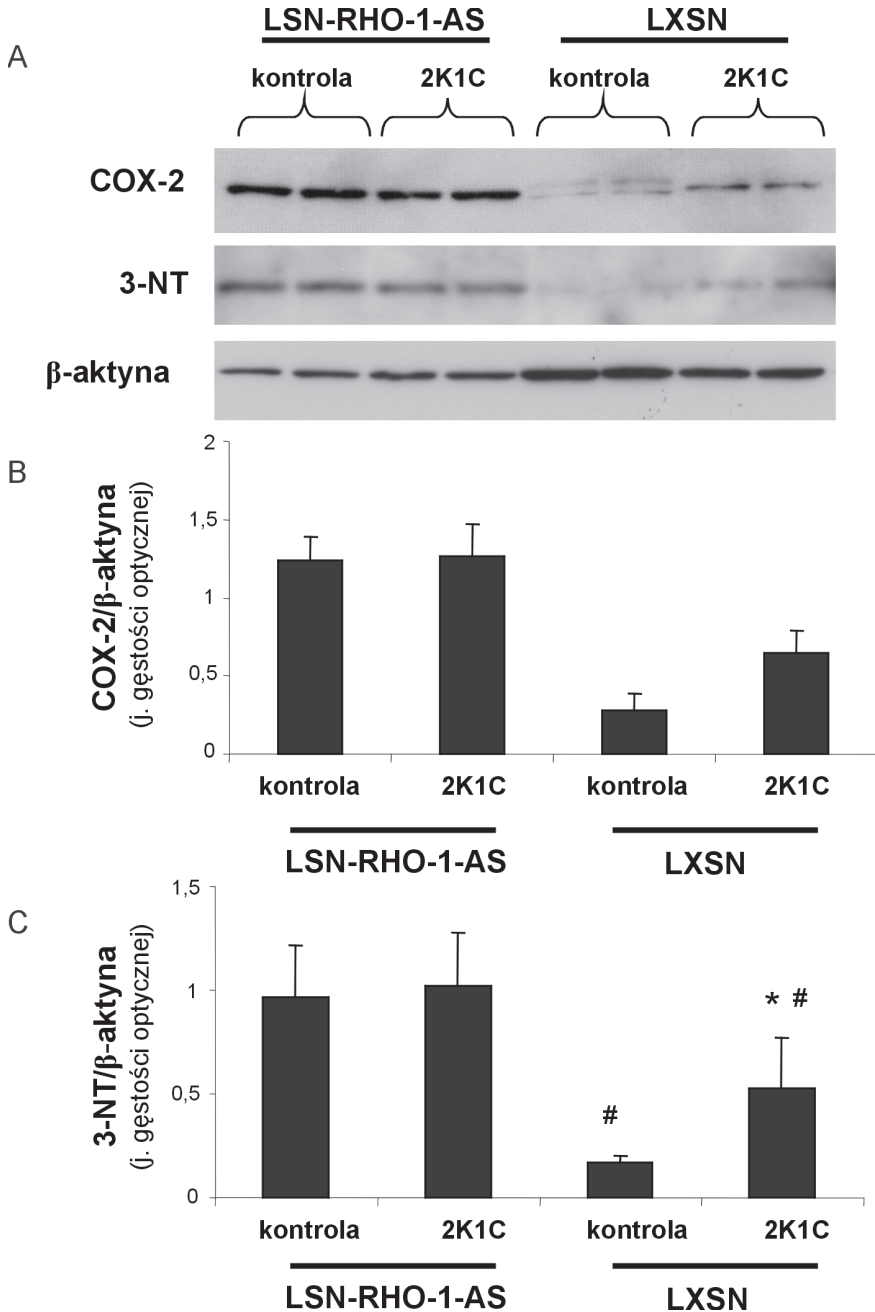
Według Olszanecki *et al.* [301]



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; $n = 4$

Rys. 7. (A) – ekspresja oraz analiza densytometryczna (B i C) poziomów HO-1 oraz HO-2 w nerkach szczurów z wstrzykniętym wektorem z genem HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS). Kontrola – szczury poddane operacji „pozorowanej”. 2K1C – nerki z zaciśniętą tętnicą nerkową. CoPP (5 mg/100 g, s.c.) stosowano raz w tygodniu do 21. dnia od zabiegu

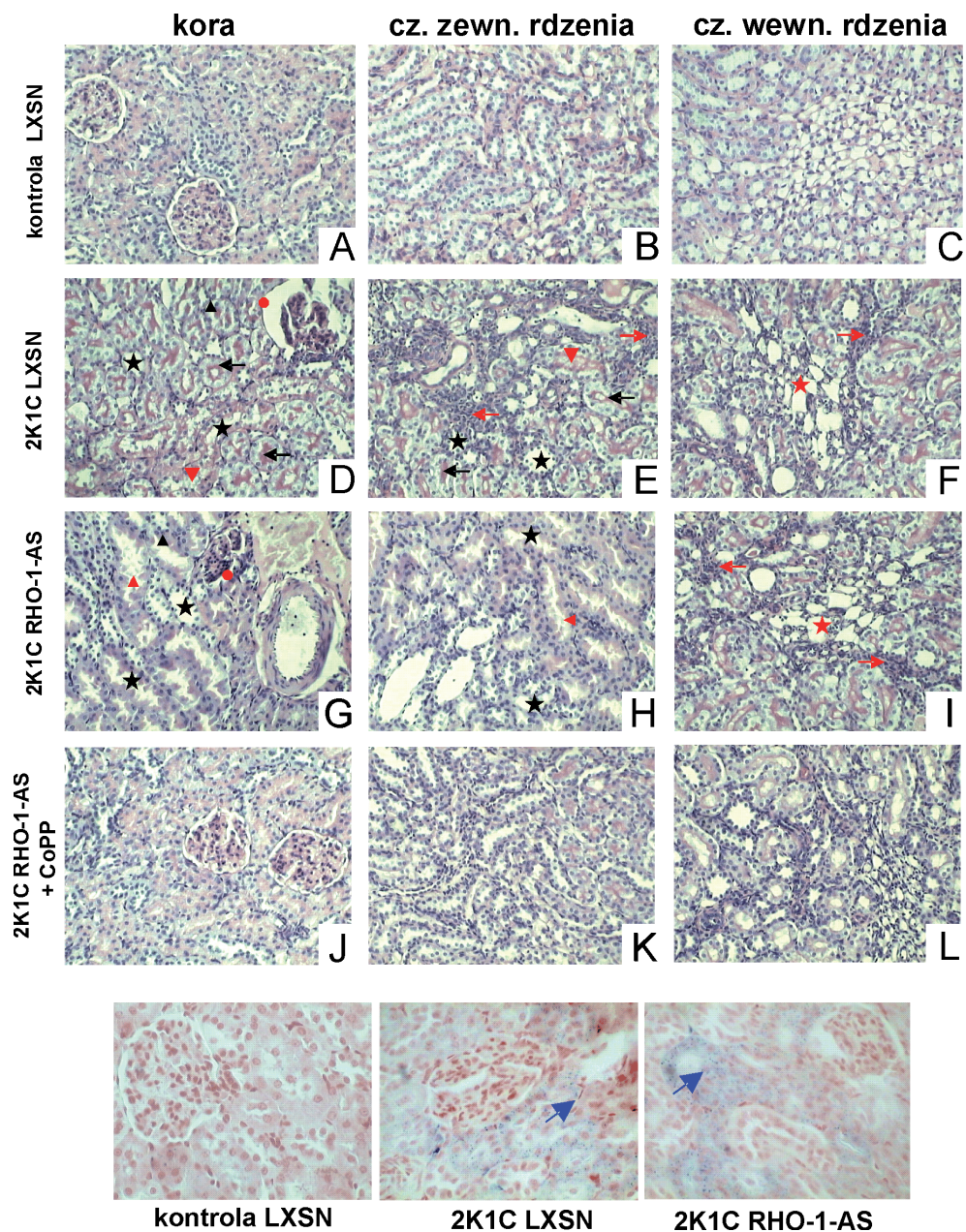
Według Olszanecki *et al.* [301]



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem odpowiedniej grupy „antysens”, $n = 4$

Rys. 8. **(A)** – ekspresja oraz analiza densytometryczna **(B i C)** poziomów COX-2 oraz 3-NT w nerkach szczurów z wstrzykniętym „pustym” wektorem (LXSN) oraz wektorem z genem HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS). Kontrola – szczury poddane operacji „pozorowanej”. 2K1C – nerki z zaciśniętą tętnicą nerkową. Nerki pobierano po 21 dniach od zabiegu

Według *Olszanecki et al.* [301]



Rys. 9. **Panel górny (A–L)** – obrazy histopatologiczne nerek z zaciśniętą tętnicą nerkową (2K1C) w barwieniu PAS. Czerwone strzałki: nacieki limfocytarne, czarne strzałki: cytoplazmatyczne krople hialinowe, gwiazdki: rozstrzeń cewek. **Panel dolny** – obraz nerek w barwieniu błękitem pruskim. Niebieskie strzałki: złogi żelaza

4.1.3. Wpływ HO na stres oksydacyjny i ekspresję COX-2 w nerce w modelu 2K1C

U szczurów LXSN zaciśnięcie tętnicy nerkowej skutkowało wzmożoną indukcją COX-2 oraz podwyższeniem poziomu 3-nitrotyrozyny (3-NT) w tkance (rys. 8). Co ciekawe, już kontrolne nerki szczurów, którym wstrzyknięto wektor z HO-1 w orientacji „antysens”, wykazywały podwyższony poziom 3-NT oraz COX-2 (rys. 8). Równie wysoki poziom 3-NT oraz COX-2 występował w nerkach szczurów LSN-RHO-1-AS po zaciśnięciu tętnicy nerkowej (rys. 8).

Co ciekawe, silny induktor HO-1, CoPP zmniejszał poziom 3-NT oraz COX-2 w nerkach szczurów LSN-RHO-1-AS po zaciśnięciu tętnicy nerkowej (rys. 11).

4.1.4. Wpływ HO na występowanie apoptozy w nerce w modelu 2K1C

Jądra komórek podlegających apoptozie wizualizowano metodą TUNEL (rys. 12).

Ilościowe wyniki oznaczeń metodą TUNEL przedstawiono na rysunku 13. W nerkach szczurów, którym wstrzyknięto „pusty” wektor, poddanych operacji „pozorowanej”, nie stwierdzano komórek apoptotycznych (rys. 12 A–C, rys. 13 A). Ich liczba znacznie wzrastała po zaciśnięciu tętnicy nerkowej (rys. 12 G–I, rys. 13 A). Co ciekawe, w porównaniu z nerkami szczurów LXSN, już w warunkach kontrolnych liczba komórek apoptotycznych była znamienne większa w nerkach szczurów z upośledzoną ekspresją HO-1 (rys. 12 D–F, rys. 13 A). Zaciśnięcie tętnicy nerkowej nieznacznie nasilało apoptozę w rdzeniu nerki tych zwierząt (rys. 12 J–L, rys. 13 A). Induktor HO-1, CoPP skutecznie zapobiegał apoptozie w nerkach zwierząt z genetycznym upośledzeniem ekspresji HO-1 (rys. 12 M–O, rys. 13 A).

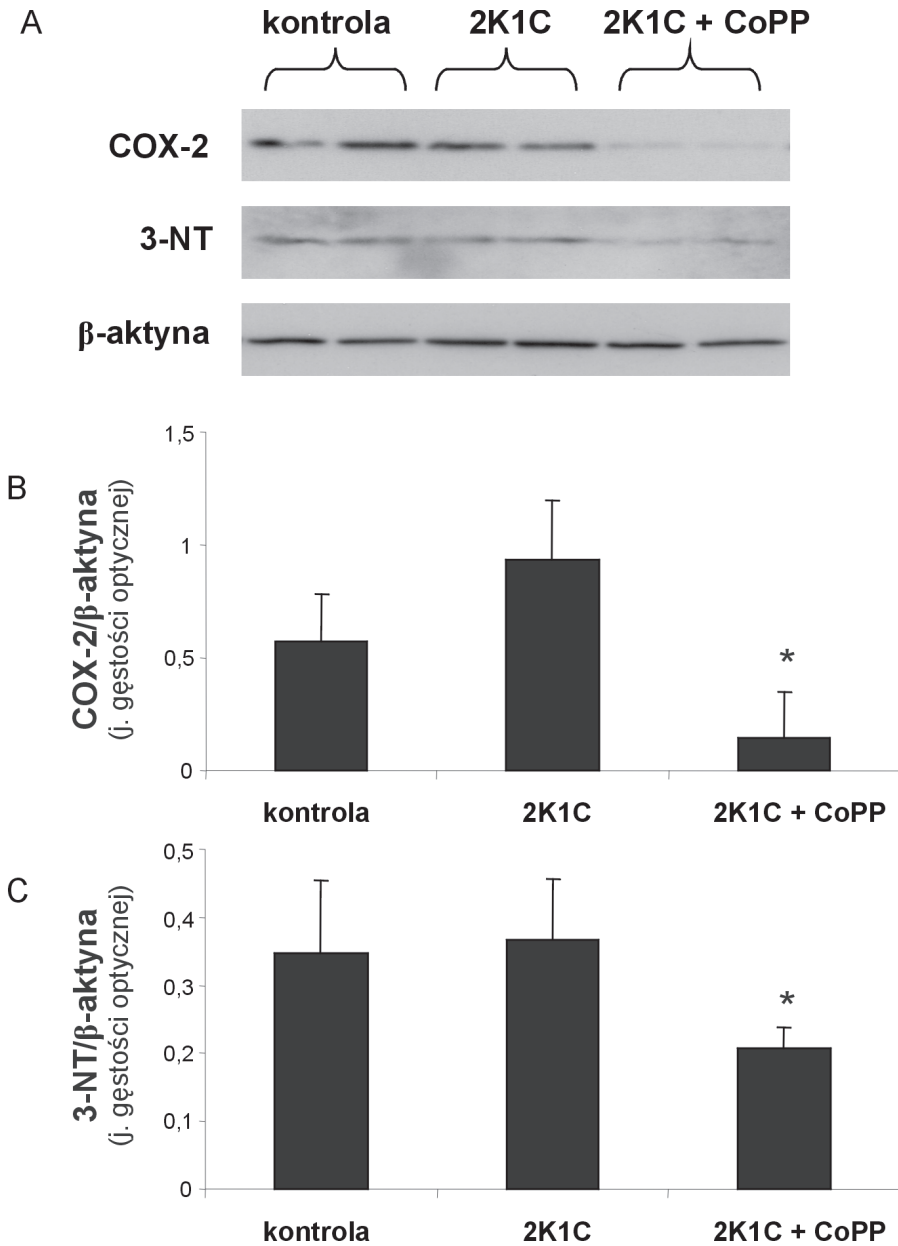
Zarówno w grupie zwierząt LXSN, jak i LSN-RHO-1-AS zaciśnięcie tętnicy nerkowej wiązało się ze wzrostem w nerce aktywności kaspazy-3 (rys. 13 B). Wzrost ten był większy u szczurów, którym wstrzyknięto wektor z HO-1 w orientacji „antysens” (rys. 13 B). Zastosowanie CoPP skutecznie zapobiegało aktywacji kaspazy-3 u szczurów z genetycznym upośledzeniem indukcji HO-1 (rys. 13 B).

4.1.5. Wpływ HO na białka regulujące procesy apoptozy w nerce w modelu 2K1C

Już w warunkach kontrolnych ekspresja białka Apaf-1, biorącego udział wraz z kaspazą-9 i cytochromem c w aktywacji kaspazy-3, była wyższa w nerkach szczurów, którym podano wektor z HO-1 w orientacji antysens (rys. 14 A i B). U tych zwierząt, ekspresja Apaf-1 utrzymywała się na podobnie wysokim poziomie po zaciśnięciu tętnicy nerkowej (rys. 14 A i B).

Zarówno u szczurów, którym podano wektor LXSN, jak też u zwierząt z genetycznie upośledzoną indukcją HO-1 (LSN-RHO-1-AS), zaciśnięcie tętnicy nerkowej powodowało wzrost poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2 (rys. 15). Jednocześnie poziom innego ochronnego białka, Bcl-xl, wykazywał tendencję do spadku, większą w nerkach zwierząt LSN-RHO-1-AS (rys. 15).

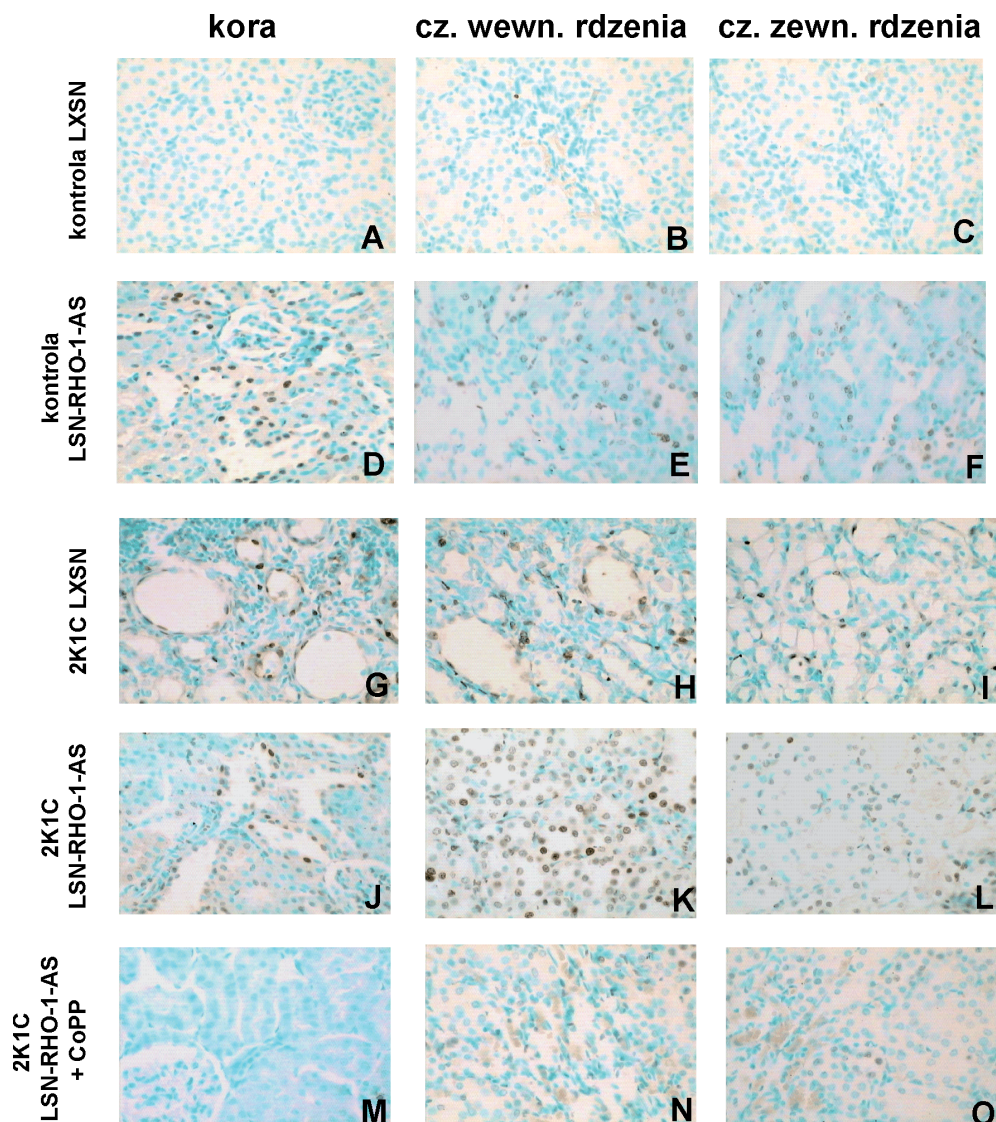
Pod wpływem CoPP w nerkach szczurów LSN-RHO-1-AS dochodziło do silnej indukcji obu przeciwapoptotycznych białek: Bcl-2 i Bcl-xl (rys. 16).



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; $n = 4$

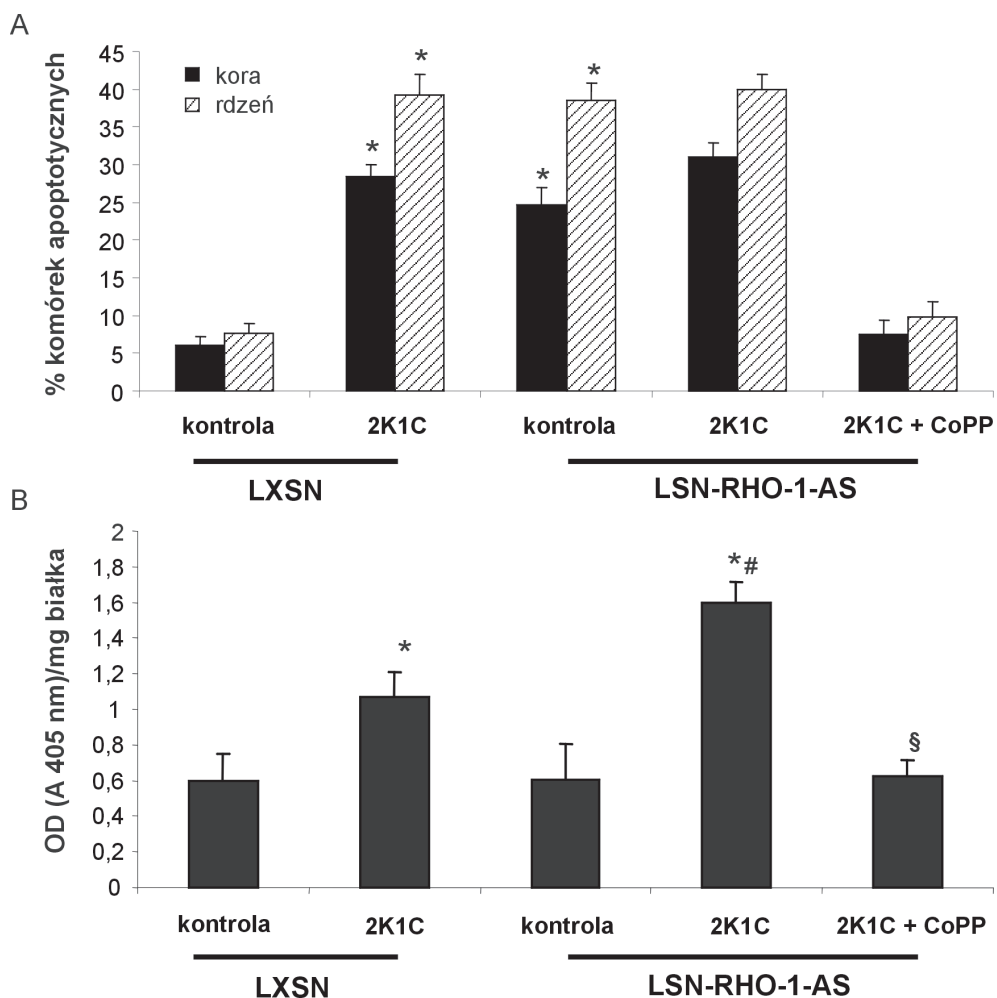
Rys. 11. Ekspresja **(A)** oraz analiza densytometryczna **(B i C)** poziomów COX-2 oraz 3-NT w nerkach szczurów z wstrzykniętym wektorem z genem HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS). Kontrola – szczury poddane operacji „pozorowanej”, 2K1C – nerki z zaciśniętą tętnicą nerkową. CoPP (5 mg/100 g, s.c.) stosowano raz w tygodniu do 21. dnia od zabiegu

Według Olszanecki *et al.* [301]



Rys. 12. Wizualizacja pyknotycznych jąder komórkowych (kolor brunatny) komórek apoptotycznych w rdzeniu nerek szczurów kontrolnych oraz z zaciśniętą tętnicą nerkową (2K1C) w grupach zwierząt z wstrzykniętym „pustym” wektorem (LXSN) oraz wektorem z genem HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS). CoPP (5 mg/100 g, s.c.) stosowano raz w tygodniu do 21. dnia od zabiegu

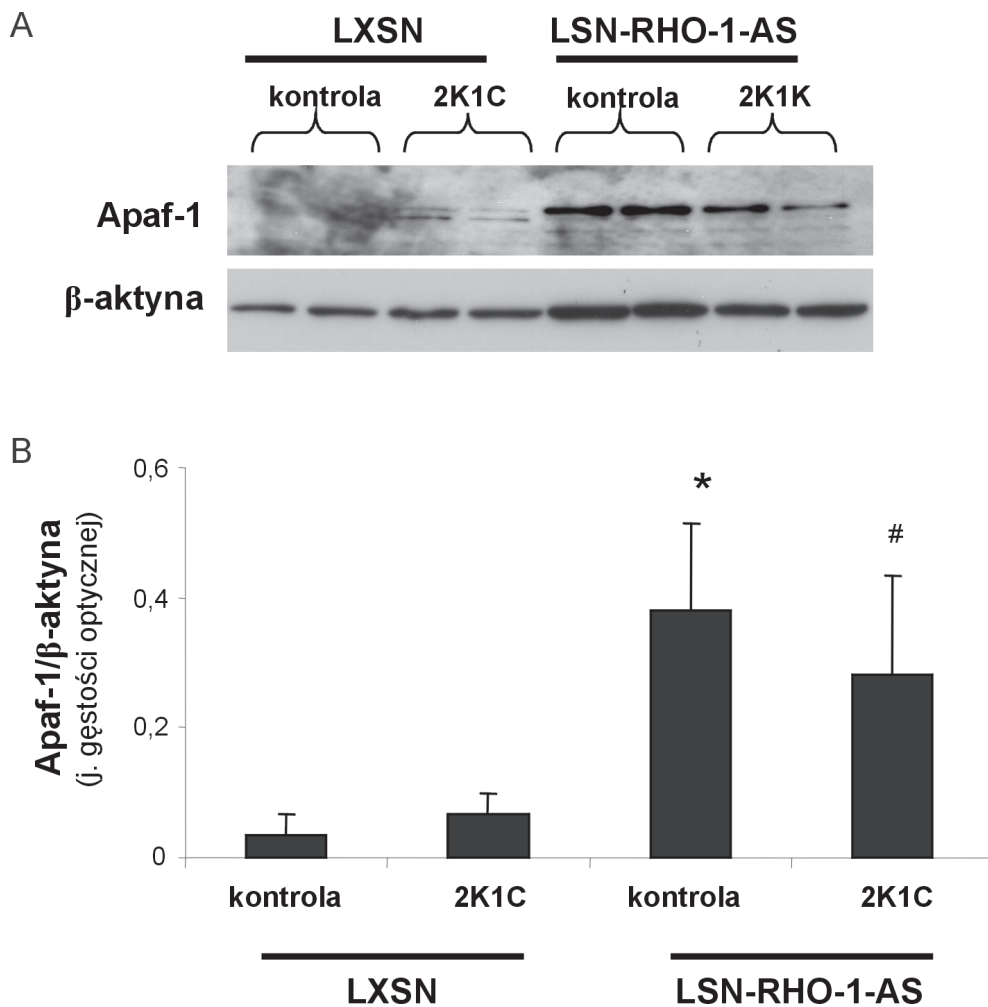
Według *Olszanecki et al.* [301]



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem grupy LXSN 2K1C; § $p < 0,05$ względem grupy LSN-RHO-1-AS 2K1C; $n = 6$

Rys. 13. Ilościowa analiza liczebności komórek apoptotycznych w preparatach kory i rdzenia nerek (**A**) oraz aktywność kaspazy-3 (**B**) w homogenatach nerek szczurów kontrolnych oraz z zaciśniętą tętnicą nerkową (2K1C), w grupach zwierząt z wstrzykniętym „pustym” wektorem (LXSN) oraz wektorem z genem HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS)

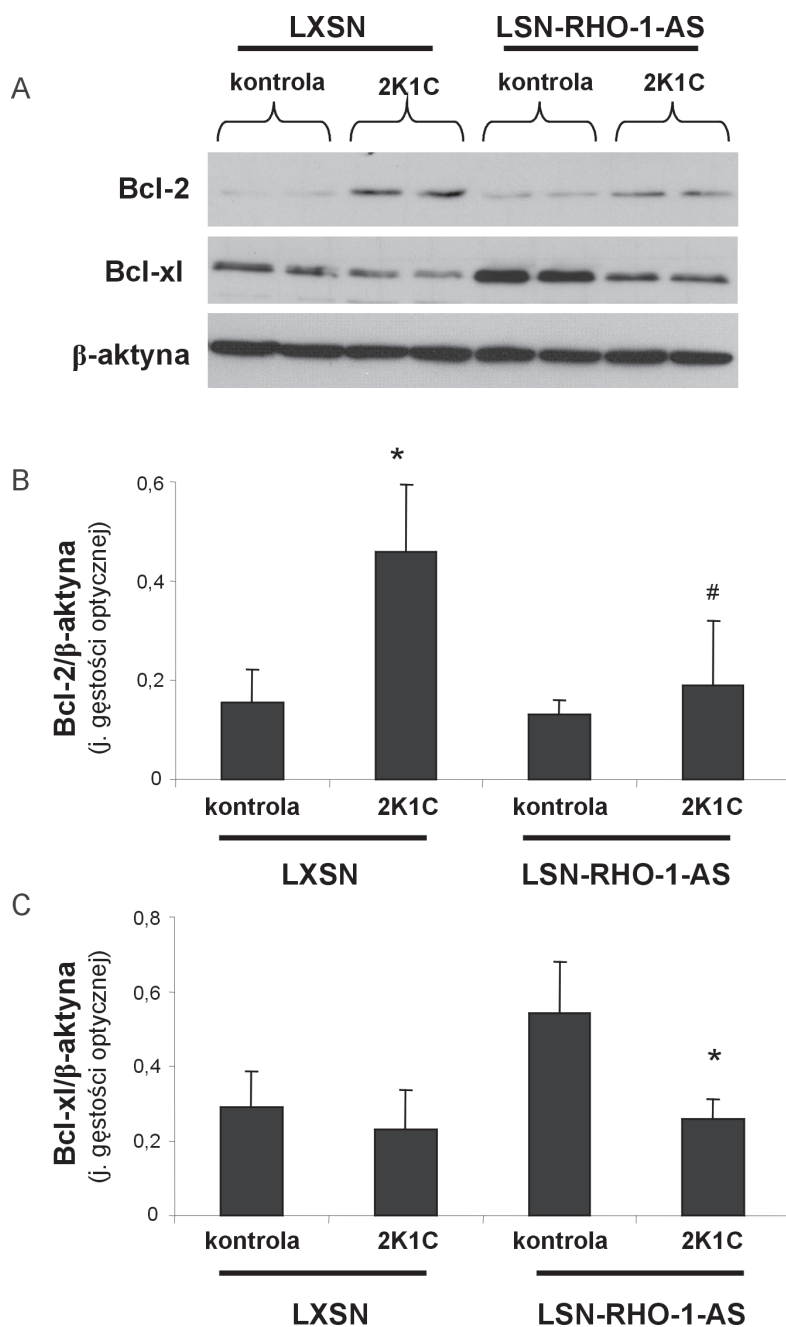
Według *Olszanecki et al.* [301]



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem grupy LXSN 2K1C; $n = 4$

Rys. 14. Ekspresja (A) oraz analiza densytometryczna (B i C) poziomu w nerkach szczurów z wstrzykniętym „pustym” wektorem (LXSN) oraz wektorem z genem HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS). Kontrola – szczury poddane operacji „pozorowanej”. Nerki pobierano po 21 dniach od zabiegu

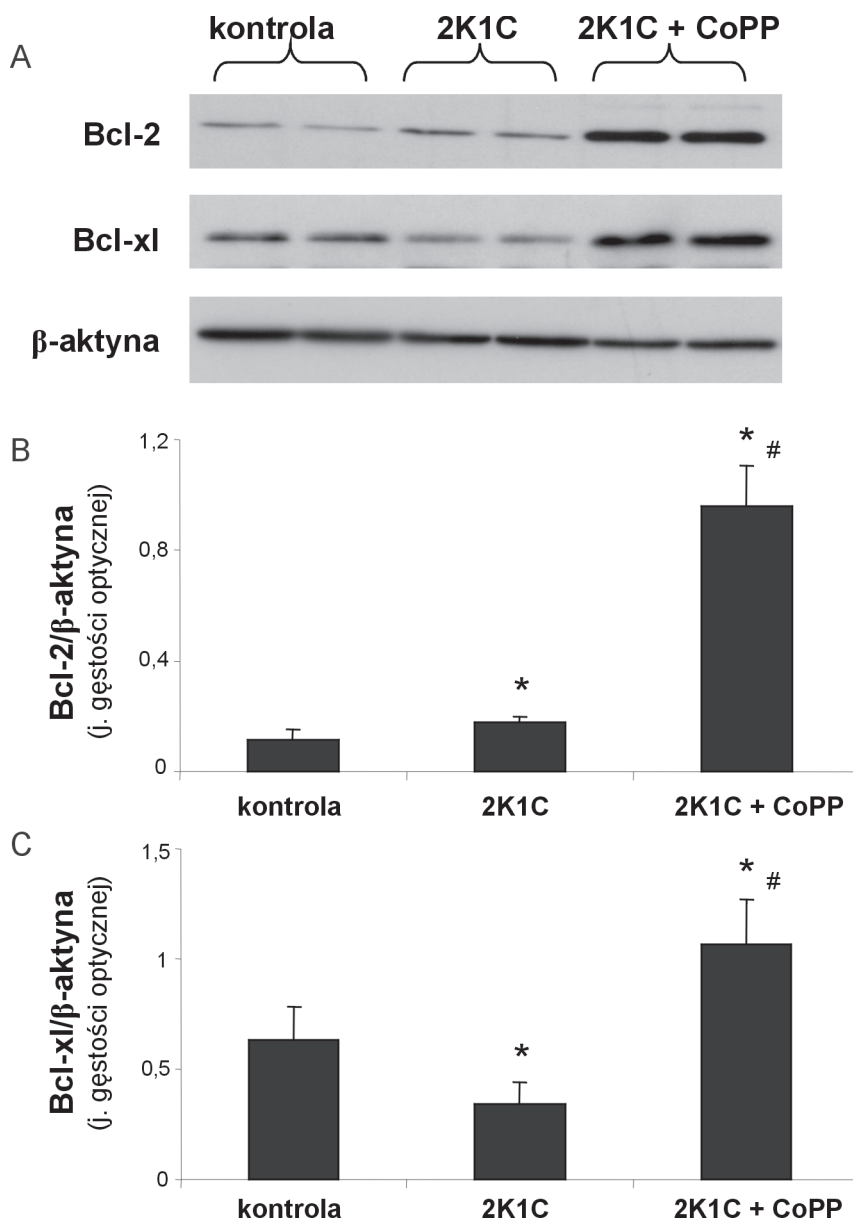
Według Olszanecki et al. [301]



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem LXSXN 2K1C, $n = 4$

Rys. 15. Ekspresja (A) oraz analiza densytometryczna (B i C) poziomów Bcl-2 i Bcl-xl w nerkach szczurów z wstrzykniętym „pustym” wektorem (LXSXN) oraz wektorem z genem HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS). Kontrola – szczury poddane operacji „pozorowanej”. 2K1C – nerki z zaciśniętą tętnicą nerkową. Nerki pobierano po 21 dniach od zabiegu

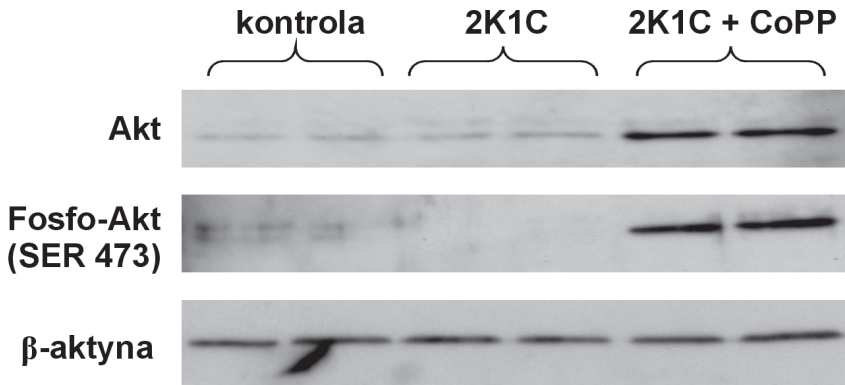
Według Olszanecki *et al.* [301]



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; $n = 4$

Rys. 16. Ekspresja **(A)** oraz analiza densytometryczna **(B i C)** poziomów białek Bcl-2 oraz Bcl-xl w nerkach szczurów z wstrzykniętym wektorem z genem HO-1 w orientacji „antsens” (LSN-RHO-1-AS). Kontrola – szczury poddane operacji „pozorowanej”, 2K1C – nerki z zaciśniętą tętnicą nerkową. CoPP (5 mg/100 g, s.c.) stosowano raz w tygodniu do 21. dnia od zabiegu

Według Olszanecki *et al.* [301]



Rys. 17. Poziom fosforylowanego Akt (seryna 473) w nerkach szczurów z wstrzykniętym wektorem z genem HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS). Kontrola – szczury poddane operacji „pozorowanej”, 2K1C – nerki z zaciśniętą tętnicą nerkową. CoPP (5 mg/100 g, s.c.) stosowano raz w tygodniu do 21. dnia od zabiegu

Według *Olszanecki et al.* [301]

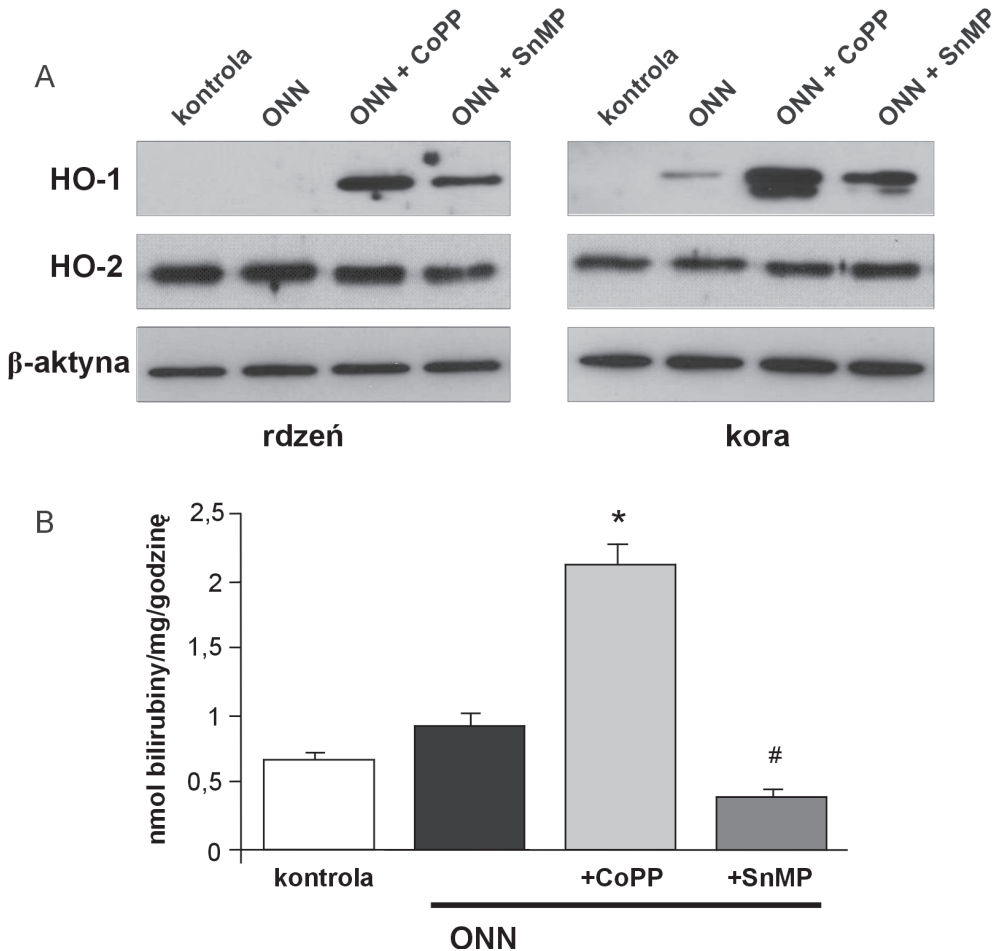
W nerkach zwierząt, którym podano wektor z HO-1 w orientacji „antysens”, zastosowanie CoPP zwiększało ekspresję sprzyjającej przeżyciu kinazy B (Akt), a także jej aktywację, mierzoną wzrostem jej ufosforylowania cząsteczki Akt w pozycji seryny 473 (rys. 17).

4.2. Model ostrej niewydolności nerek

4.2.1. Ekspresja HO w nerce

Podanie środka kontrastowego powodowało indukcję HO-1 w warstwie korowej nerek; w warstwie rdzeniowej nie obserwowano wzrostu poziomu HO-1 (rys. 18). Poziom HO-2, zarówno w rdzeniu, jak i w korze nerek, pozostawał niezmienny (rys. 18).

Trzytygodniowe podawanie induktora HO-1, CoPP powodowało znamienny wzrost ekspresji HO-1, przede wszystkim w korze, ale również w warstwie rdzeniowej nerek (rys. 19 A). Masywnej indukcji HO-1 towarzyszyło znamienne zwiększenie aktywności HO mierzonej w homogenacie całej nerki ($2,12 \pm 0,12$ vs $0,835 \pm 0,057$ nmol bilirubiny/mg białka/godzinę, rys. 19 B). Inhibitor HO, SnMP również powodował indukcję HO-1, hamując jednocześnie jej aktywność ($0,34 \pm 0,026$ vs $0,835 \pm 0,057$ nmol bilirubiny/mg białka/godzinę, rys. 19 B).



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem grupy ONN; $n = 4$

Rys. 19. (A) – ekspresja HO-1 oraz HO-2 w rdzeniu i korze nerek szczurów kontrolnych oraz po podaniu środka kontrastowego; (B) – aktywność HO w homogenatach nerek szczurów kontrolnych oraz po podaniu środka kontrastowego. Nerki pobierano po 48 godzinach od zabiegu. CoPP oraz SnMP (5 mg/100 g, s.c.) podawano raz w tygodniu przez 3 tygodnie poprzedzające wstrzyknięcie środka kontrastowego

Według Goodman *et al.* [142]

4.2.2. HO a poziom wolnego hemu i nasilenie stresu oksydacyjnego w nerce

Pod wpływem kwasu jotalamowego dochodziło do wzrostu poziomu wolnego hemu w tkance nerek ($0,95 \pm 0,021$ vs $0,61 \pm 0,058$ nmol/mg białka, $p < 0,05$; $n = 4$). Podawanie induktora HO-1, CoPP powodowało znamienne spadki stężeń hemu, zastosowanie zaś inhibitora aktywności HO, SnMP istotnie zwiększało poziom hemu w tkance nerek (stężenia odpowiednio $0,28 \pm 0,048$ oraz $1,14 \pm 0,1$ nmol/mg białka, $p < 0,05$ względem grupy ONN; $n = 4$).

W homogenatach nerek poddanych działaniu środka kontrastowego występowało zwiększone wytwarzanie anionu ponadtlenkowego (O_2^-) (rys. 20).

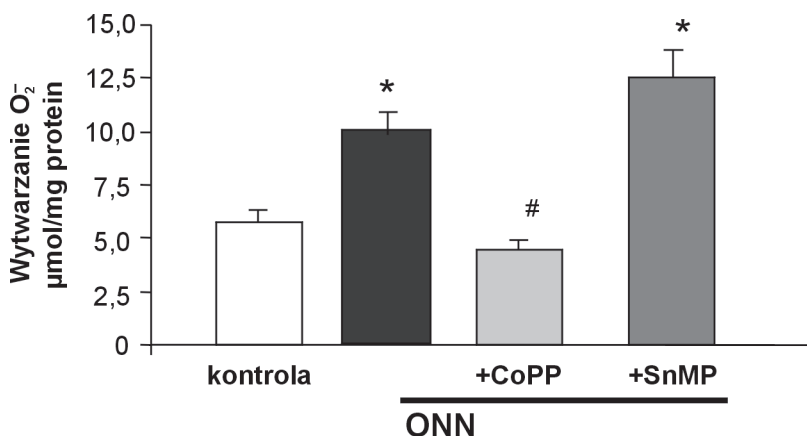
Podawanie induktora HO-1, CoPP powodowało zmniejszenie wytwarzania, zastosowanie zaś inhibitora aktywności HO, SnMP istotnie nasilało produkcję O_2^- w homogenacie nerek (rys. 20).

4.2.3. HO a biochemiczne wykładniki rozwoju niewydolności nerek

Podanie środka kontrastowego w ciągu 24–48 godzin doprowadzało do znamiennego wzrostu stężeń kreatyniny we krwi ($49 \pm 8,0$ vs $37 \pm 6,1$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,05$; $n = 4$) oraz spadku klirensu kreatyniny ($1,84 \pm 0,26$ vs $3,98 \pm 0,87$ ml/min , $p < 0,05$; $n = 4$) (rys. 21 A i B). Patologiczne zmiany poziomu kreatyniny we krwi i klirensu kreatyniny były znamienne nasilane przez zastosowanie inhibitora aktywności HO, SnMP (wartości odpowiednio: $52 \pm 4,8$ $\mu\text{mol/l}$ oraz $2,11 \pm 0,37$ ml/min) (rys. 21 A i B). W przeciwieństwie do tego induktor HO-1, CoPP zapobiegał wzrostowi stężenia kreatyniny we krwi i spadkowi klirensu kreatyniny po wstrzyknięciu środka kontrastowego (wartości odpowiednio: $35 \pm 5,0$ $\mu\text{mol/l}$ oraz $2,86 \pm 0,77$ ml/min) (rys. 21 A i B).

4.2.4. Wpływ HO na procesy apoptozy w nerce w modelu ostrej niewydolności nerek

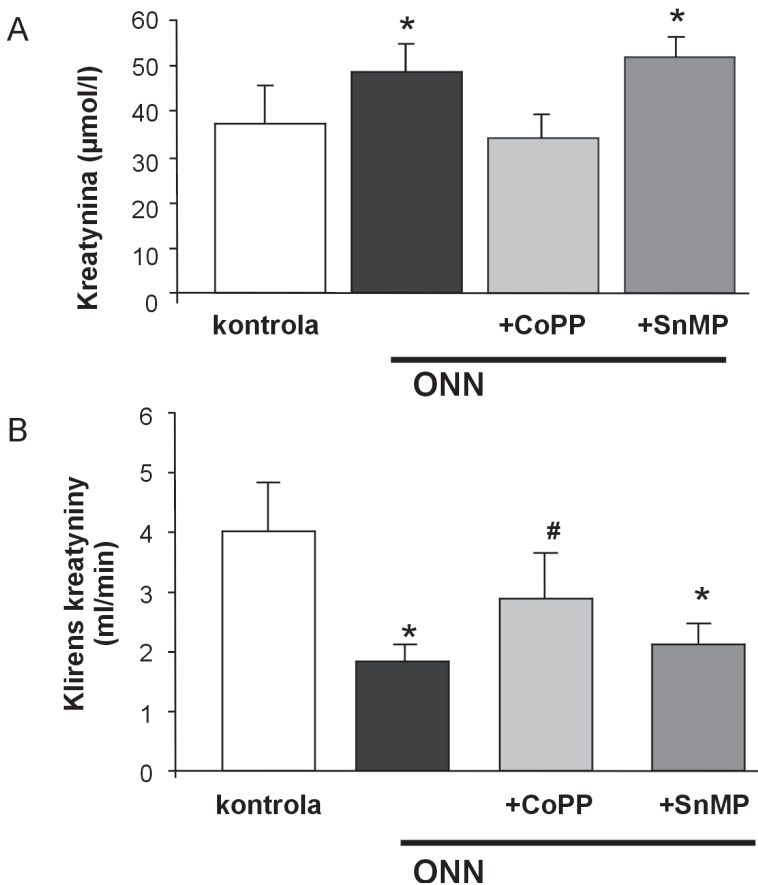
Podanie środka kontrastowego powodowało aktywację kaspazy-3, kaspazy-8 oraz kaspazy-9 w warstwie rdzeniowej, ale nie w korze nerek (rys. 22). Zastosowanie SnMP nie zwiększało dalej aktywności kaspaz, podawanie zaś CoPP znamienne tłumilo ich aktywność (rys. 22).



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem grupy ONN; $n = 4$

Rys. 20. Wytwarzanie O_2^- w homogenatach nerek szczurów kontrolnych oraz po podaniu środka kontrastowego. Nerki pobierano po 2 dniach od podania kwasu jotalamowego. CoPP oraz SnMP (5 mg/100 g, s.c.) podawano raz w tygodniu przez 3 tygodnie poprzedzające wstrzyknięcie środka kontrastowego

Według Goodman *et al.* [142]



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem grupy ONN; $n = 6$

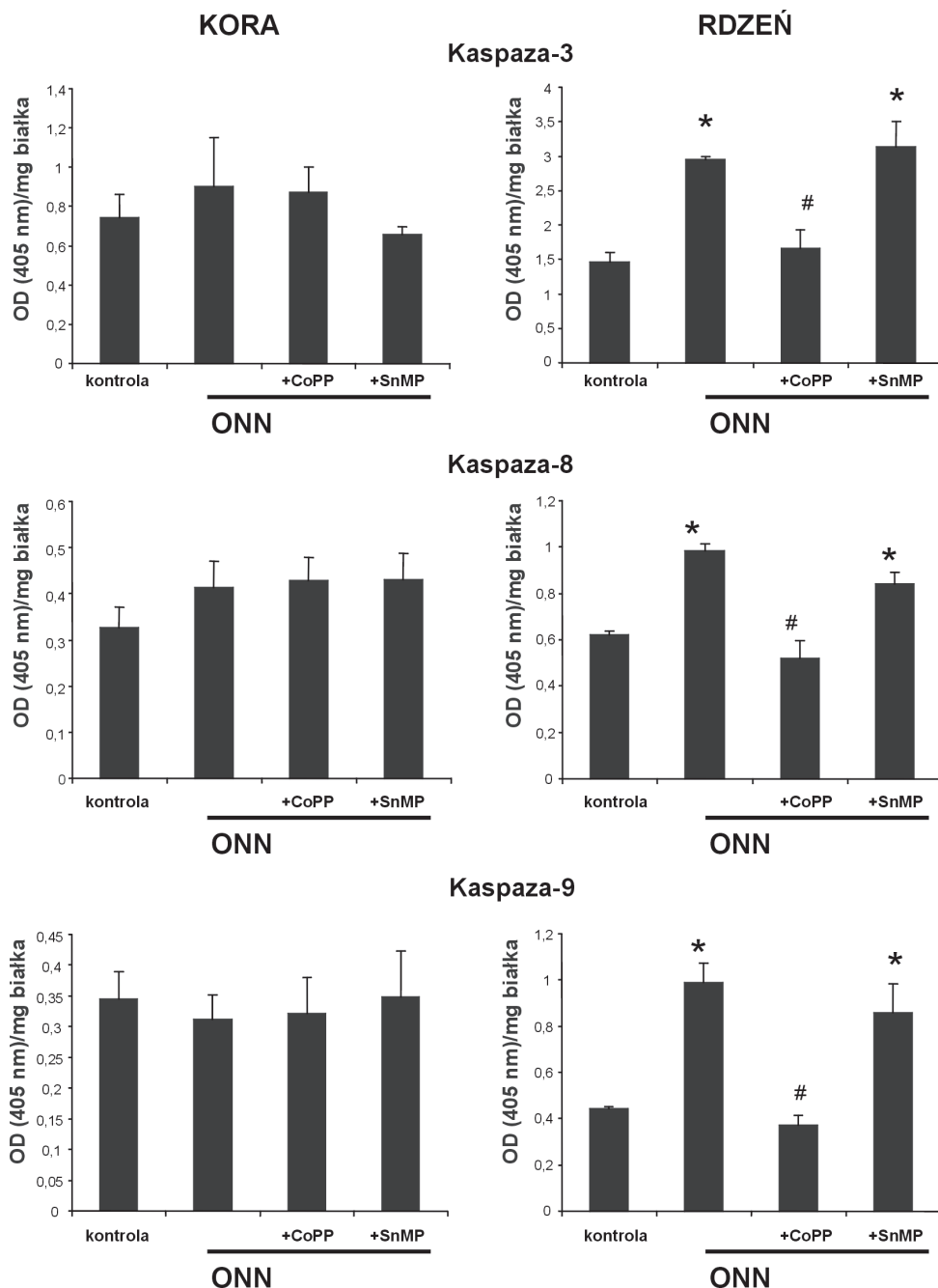
Rys. 21. Poziom kreatyniny w surowicy krwi (**A**) oraz klirens kreatyniny (**B**) w 2. dobie od podania środka kontrastowego u szczurów kontrolnych. CoPP oraz SnMP (5 mg/100 g, s.c.) podawano raz w tygodniu przez 3 tygodnie poprzedzające wstrzyknięcie środka kontrastowego

Według Goodman *et al.* [142]

W rdzeniu nerek podanie środka kontrastowego powodowało silną indukcję sprzyjającego apoptozie białka Bax (rys. 23 i 24). Indukcja Bax znoszona była przez CoPP (rys. 23 i 24). Co ciekawe, użycie inhibitora HO, SnMP nasilało indukcję Bax zarówno w rdzeniu, jak i w korze nerek (rys. 23 i 24).

Induktor HO-1, CoPP powodował podwyższenie w rdzeniu nerki poziomów przeciwapoptotycznych białek Bcl-2 oraz Bcl-x1 (w przypadku białka Bcl-x1 podobna reakcja zachodziła również w korze nerek) (rys. 23 i 24).

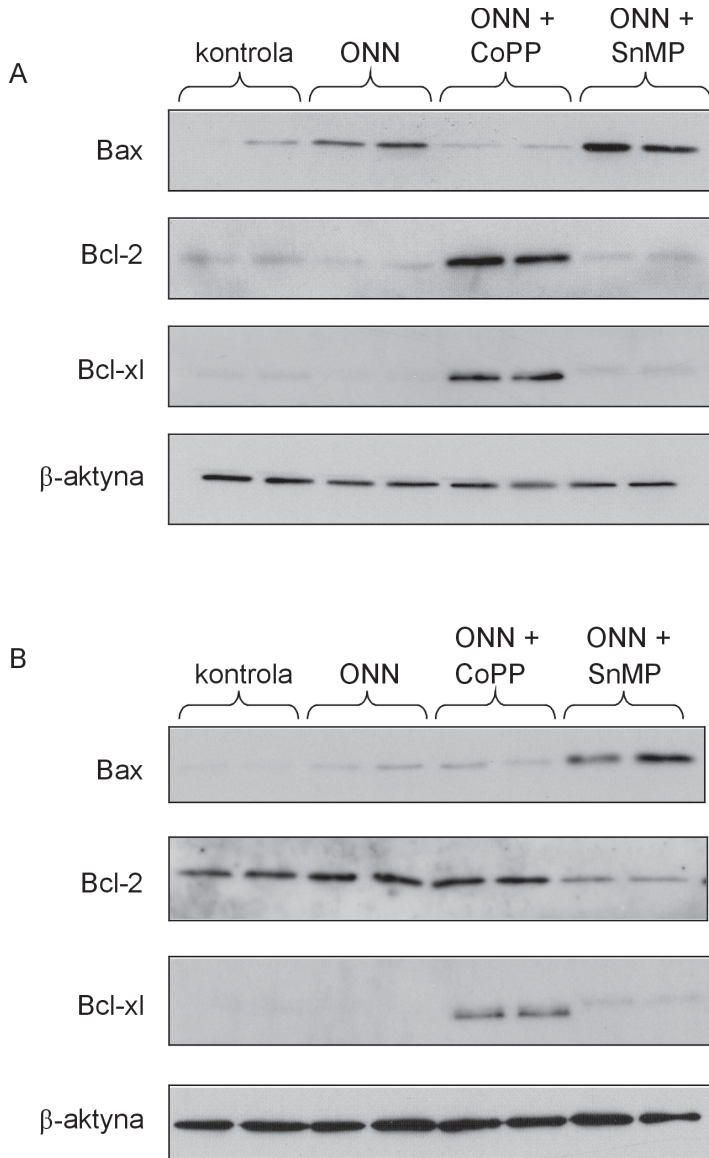
W korze nerki SnMP znamienne obniżało poziom białka Bcl-2 (rys. 23 i 24).



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem grupy ONN; $n = 4$

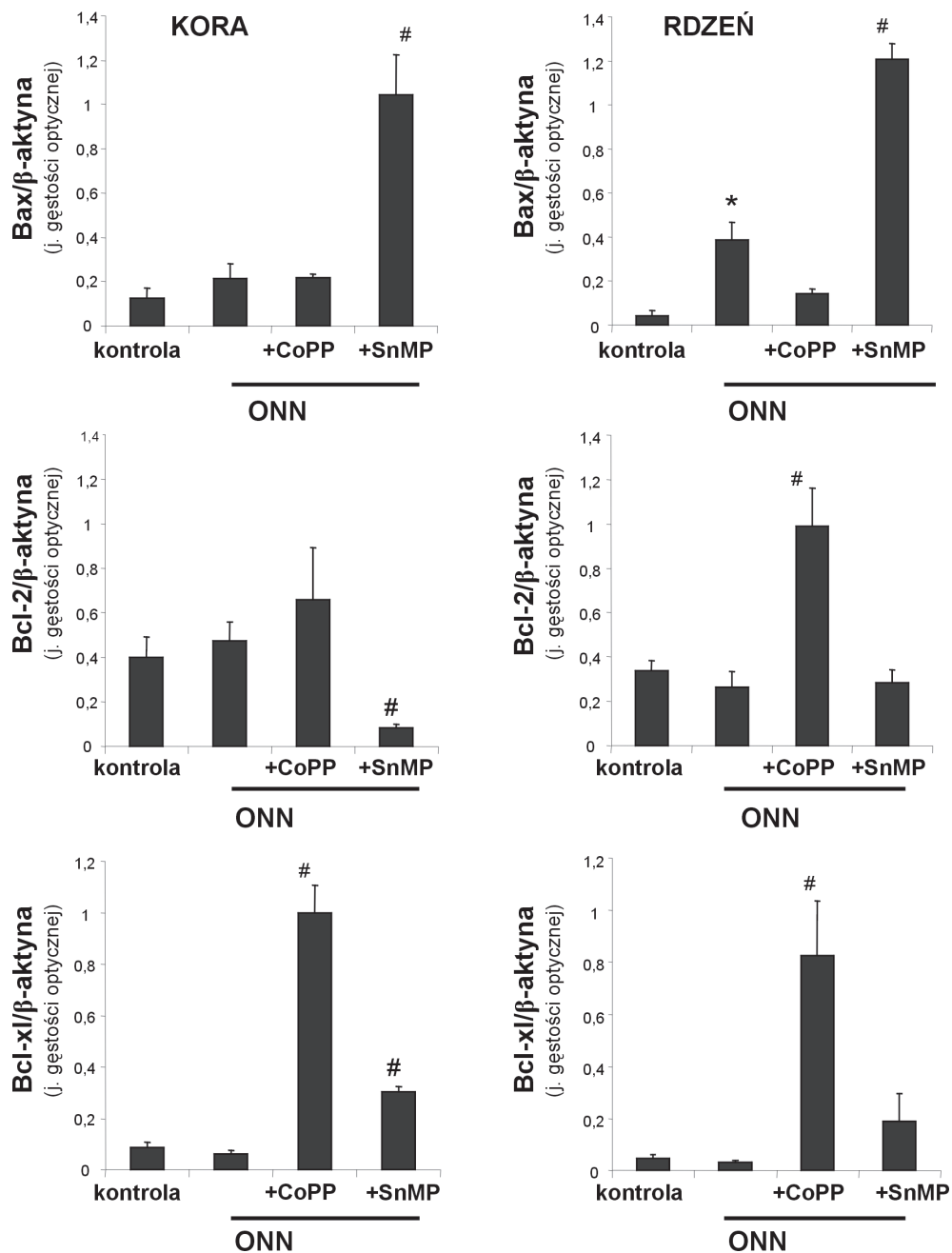
Rys. 22. Aktywność kaspaz w homogenatach kory i rdzenia nerek szczurów kontrolnych oraz po podaniu środka kontrastowego. Nerki pobierano po 2 dniach od zabiegu. CoPP oraz SnMP (5 mg/100 g, s.c.) podawano raz w tygodniu przez 3 tygodnie poprzedzające wstrzyknięcie środka kontrastowego

Według Goodman et al. [142]



Rys. 23. Ekspresja białek rodziny Bcl-2 w rdzeniu **(A)** i korze **(B)** nerek szczurów kontrolnych oraz po podaniu środka kontrastowego. Nerki pobierano po 2 dniach od zabiegu

Według *Goodman et al.* [142]



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem grupy ONN; $n = 4$

Rys. 24. Analiza densytometryczna poziomu białek rodziny Bcl-2 w rdzeniu i korze nerek szczurów kontrolnych oraz po podaniu środka kontrastowego

Według *Goodman et al.* [142]

4.3. Model cukrzycy

4.3.1. Ekspresja HO oraz wybranych białek pro- i antyapoptotycznych w nerkach

W trakcie rozwoju cukrzycy, 3 miesiące po podaniu STZ w nerce dochodziło do zwiększonej ekspresji HO-1 zarówno u szczurów, którym podano „pusty” wektor, jak i u szczurów LSN-RHO-1-AS (rys. 25 A i B). Frakcjonowanie homogenatu nerek umożliwiło dokładne zlokalizowanie pojawiającej się HO-1 we frakcji cytozolowej (rys. 25 A i B). Zastosowanie CoPP powodowało maszyną indukcję HO-1, która obok frakcji cytozolowej pojawiała się w dużej ilości w mitochondriach (rys. 25 A i B). Mitochondrialną lokalizację HO-1 wyindukowaną przez CoPP potwierdzały barwienia immunocytochemiczne wykonane techniką EM *immunogold* (rys. 26).

W porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi w nerkach szczurów cukrzycowych w cytozolu stwierdzano wyraźnie wyższy poziom cytochromu c (rys. 25 A i B). Co ciekawe, pomimo podobnego nasilenia indukcji HO-1 poziom cytochromu c we frakcji cytozolowej u szczurów, którym wstrzyknięto wektor z HO-1 w orientacji „antysens” był wyższy niż u zwierząt LXSN (rys. 25 A i B). Podanie CoPP zmniejszało poziom cytochromu c w cytozolu (rys. 25 A i B).

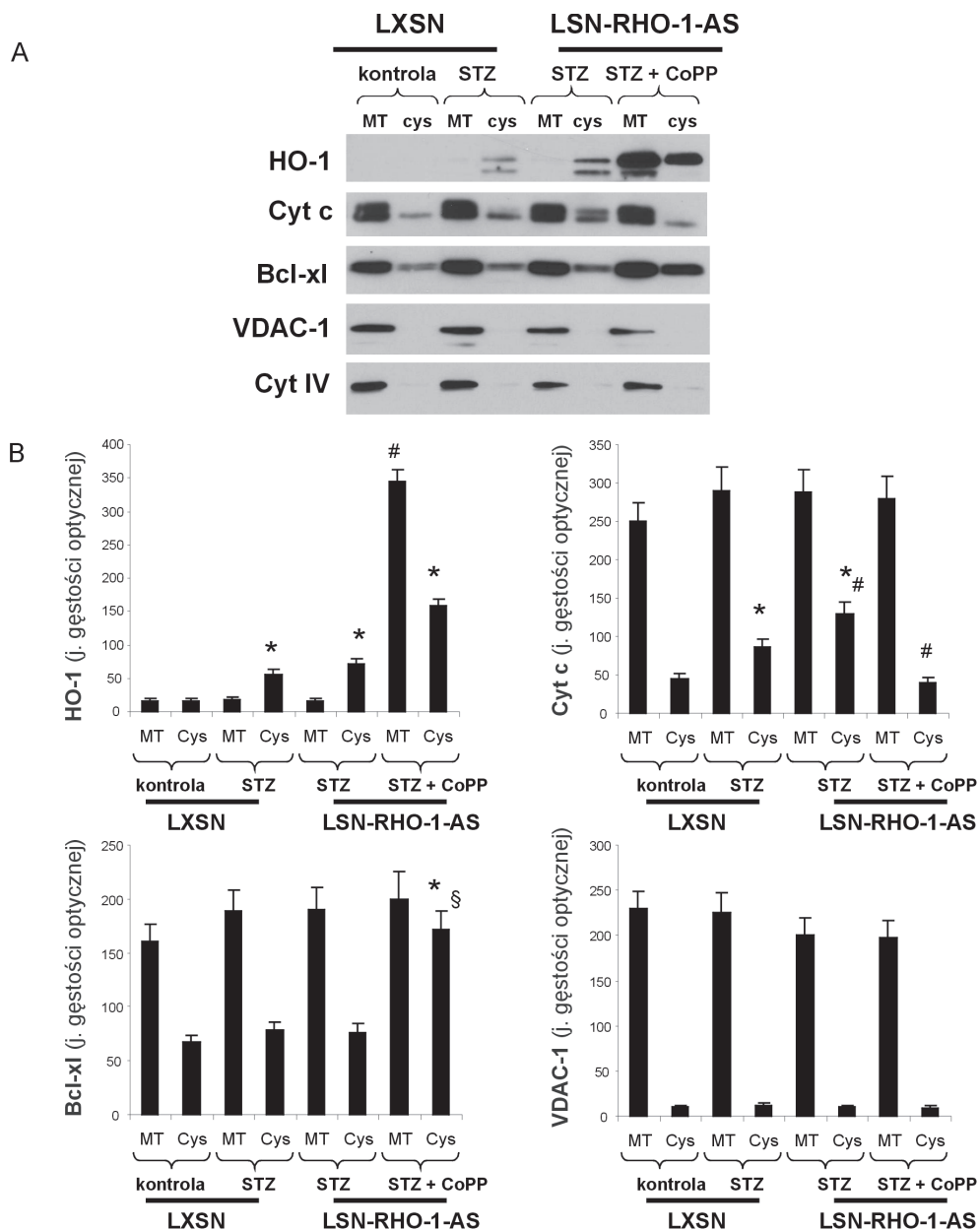
W porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi po podaniu STZ nie dochodziło w homogenatach nerek do zmian w ekspresji przeciwapoptotycznego białka Bcl-x1. Jednak podanie induktora HO-1, CoPP zwiększało poziom Bcl-x1 w cytozolu i mitochondriach nerek szczurów LSN-RHO-1-AS (rys. 25 A i B).

W badanych próbkach zaznaczała się tendencja (jednak bez znamienności statystycznej) do niższego poziomu mitochondrialnego białka VDAC-1 w nerkach szczurów, którym wstrzyknięto wektor z HO-1 w orientacji „antysens” w porównaniu z nerkami zwierząt „zakażonych” wektorem LXSN (rys. 25 A i B).

4.3.2. Aktywność oksydazy cytochromu c oraz wytwarzanie wolnych rodników tlenowych przez frakcję mitochondrialną homogenatów nerek

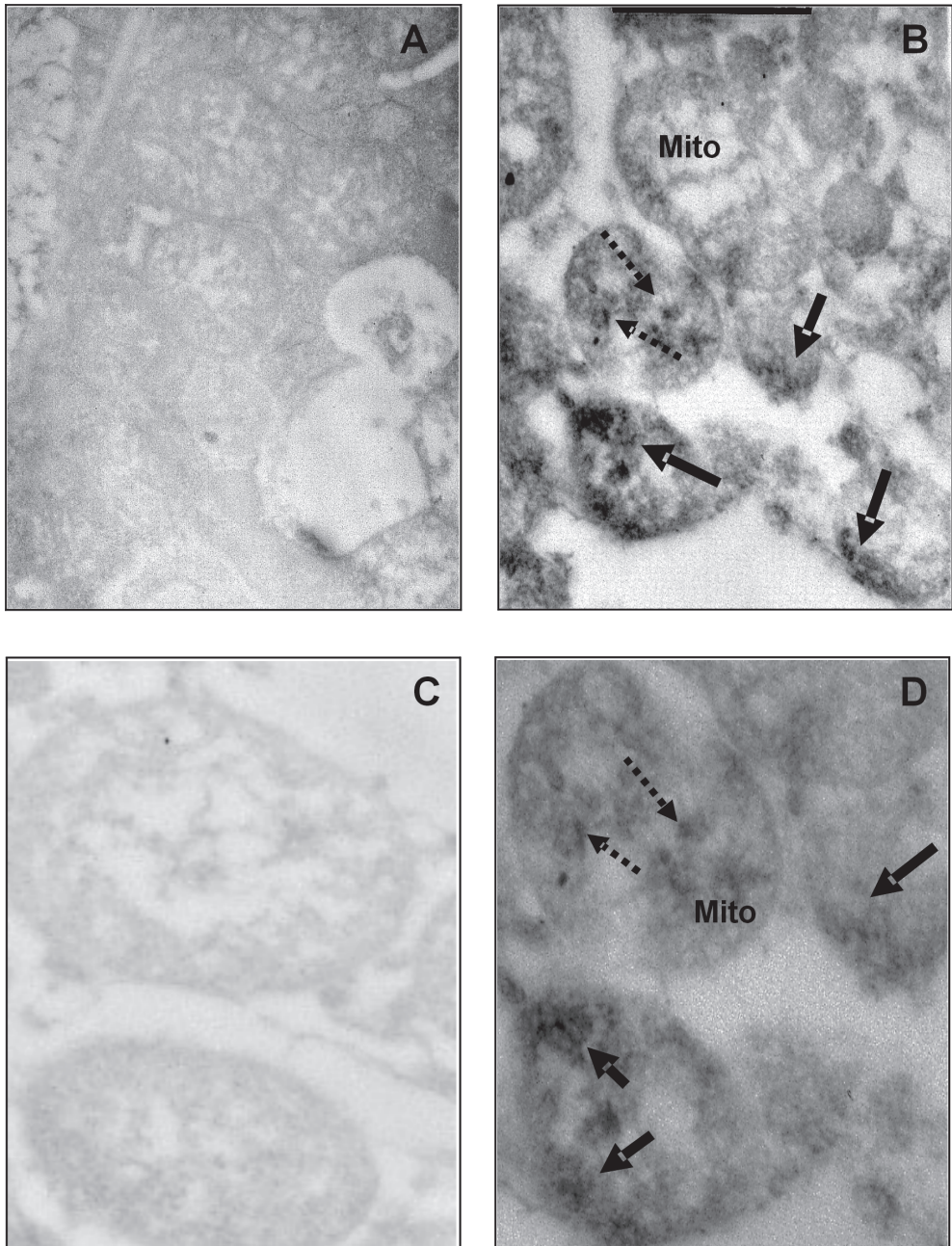
Podanie STZ zmniejszało aktywność oksydazy cytochromu c mierzonej we frakcji mitochondrialnej homogenatu nerek (rys. 27 A). Po 3 miesiącach hiperglikemii poziom aktywności oksydazy cytochromu c we frakcji mitochondrialnej był podobny u szczurów LXSN oraz u zwierząt, którym podano wektor LSN-RHO-1-AS (rys. 27 A). U tych ostatnich podanie CoPP podwyższało mitochondrialną aktywność oksydazy cytochromu c (rys. 27 A).

Trzymiesięczna cukrzyca powodowała wzrost wytwarzania ROS przez frakcję mitochondrialną homogenatu nerek, nieznacznie wyższy w przypadku frakcji mitochondrialnej homogenatów nerek zwierząt „zakażonych” wektorem z HO-1 w orientacji „antysens” (rys. 27 B). Induktor HO-1, CoPP powodował zmniejszenie produkcji anionu ponadtlenkowego przez frakcję mitochondrialną homogenatów nerek szczurów cukrzycowych LSN-RHO-1-AS (rys. 27 B).

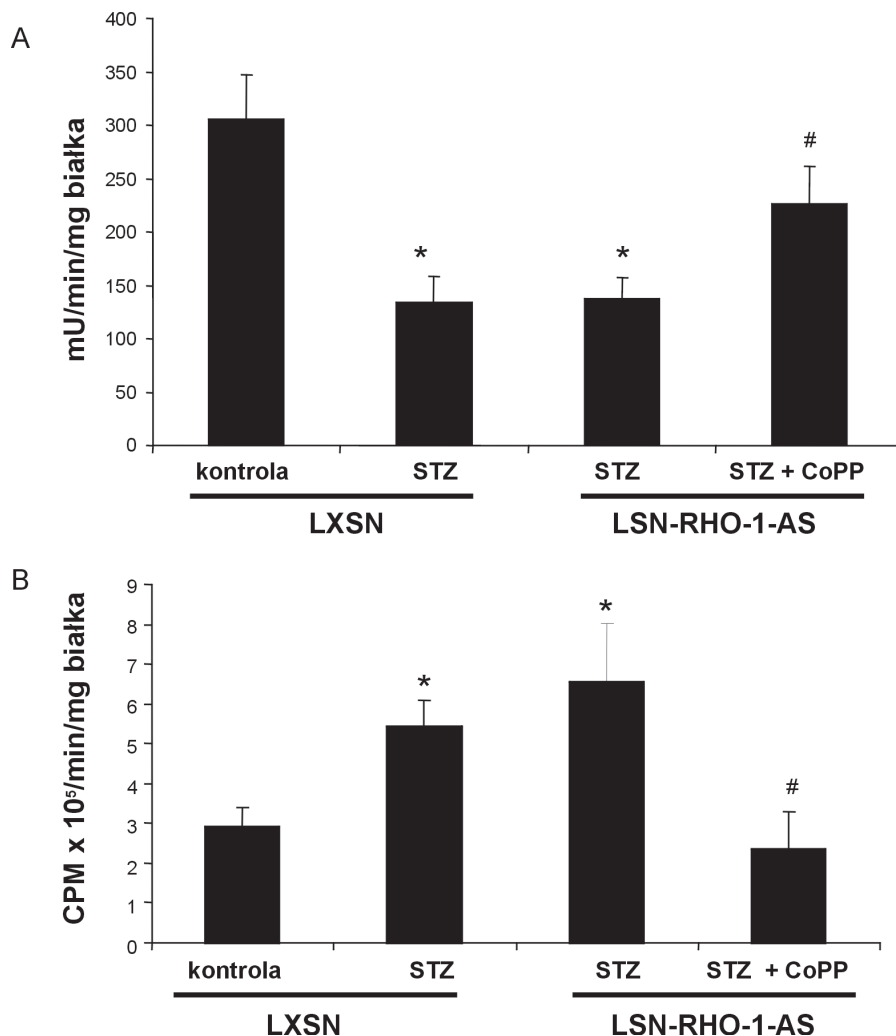


* $p < 0,05$ względem frakcji cytozolowej szczurów kontrolnych; § $p < 0,05$ względem frakcji cytozolowej LXSN STZ; # $p < 0,05$ względem frakcji mitochondrialnej szczurów LSN-RHO-1-AS STZ

Rys. 25. Ekspresja (A) i analiza densytometryczna (B) poziomu HO-1, cytochromu c (Cyt c), białka VDAC-1 oraz białka Bcl-xl we frakcji mitochondrialnej (MT) oraz cytozolowej (Cys) homogenatu nerek szczurów kontrolnych oraz po podaniu streptozotocyny (STZ). Ekspresję podjednostki IV cytochromu (Cyt IV) potraktowano jako kontrolę czystości frakcji (występuje tylko we frakcji mitochondrialnej). Nerki pobierano po 3 miesiącach od podania STZ. CoPP (5 mg/100 g, s.c.) podawano raz w tygodniu przez 3 tygodnie poprzedzające pobranie nerek



Rys. 26. Barwienie immunocytochemiczne metodą pozatopieniową z użyciem złota na obecność HO-1 w mitochondriach nerek szczurów cukrzycowych (**A i C**) oraz cukrzycowych, którym podano CoPP (5 mg/100 g, s.c., raz w tygodniu przez 3 tyg.) (**B i D**). Pozytywny sygnał związany jest z błoną mitochondrium (grube strzałki) oraz grzebieniami (przerwane strzałki). **A i B** – pow. 3900 x; **C i D** – pow. 21 000 x



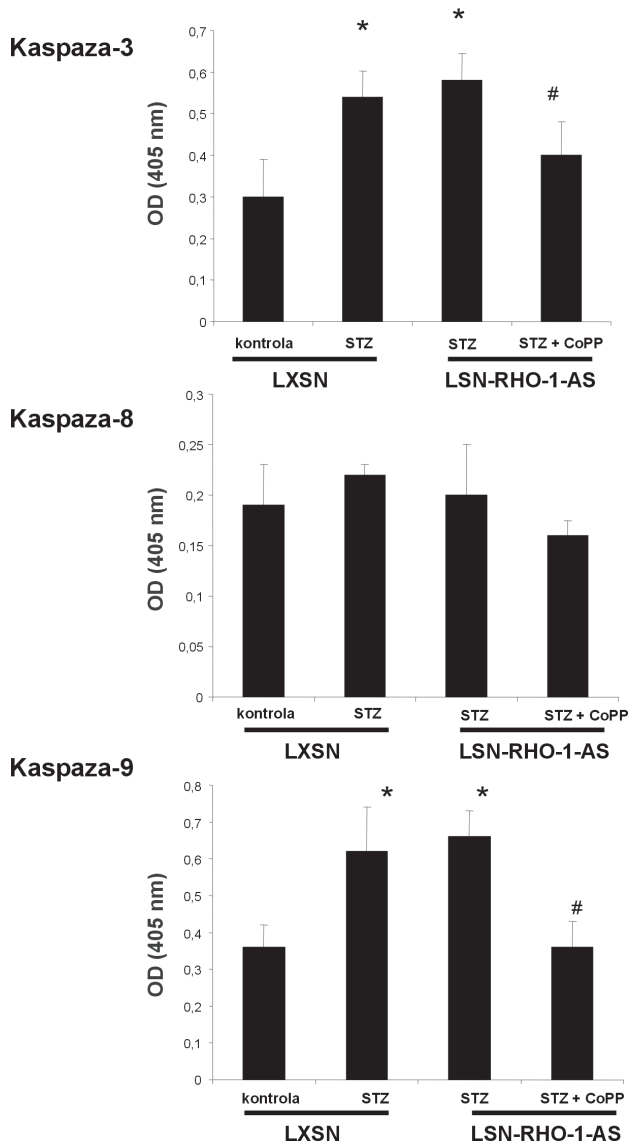
* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem grupy STZ „antysens”; $n = 4$

Rys. 27. Aktywność oksydazy cytochromu c (A) oraz wytwarzanie O_2^- (B) we frakcji mitochondrialnej homogenatów nerek szczurów kontrolnych oraz po podaniu streptozotocyny (STZ). Badania prowadzono na zwierzętach, którym podano „pusty” wektor (LXSN) oraz wektor z HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS). Nerki pobierano po 3 miesiącach od podania STZ. CoPP (5 mg/100 g, s.c.) podawano raz w tygodniu przez 3 tygodnie poprzedzające pobranie nerek

4.3.3. Aktywność kaspaz w homogenatach nerek

W porównaniu ze szczurami kontrolnymi w nerkach zwierząt cukrzycowych, zarówno LXSN, jak i „zakażonych” wirusem z HO-1 „antysens”, dochodziło do podobnego zwiększenia się aktywności kaspazy-3 i kaspazy-9, podczas gdy aktywność kaspazy-8

nie ulegała znaczącym zmianom (rys. 28). Podawanie CoPP zmniejszało aktywność kaspaz do poziomów występujących u zwierząt kontrolnych (rys. 28).



* $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej; # $p < 0,05$ względem grupy STZ „antysens”; $n = 4$

Rys. 28. Aktywność kaspaz w homogenatach nerek szczurów kontrolnych oraz po podaniu streptozotocyny (STZ). Badania prowadzono na zwierzętach, którym podano „pusty” wektor (LXSN) oraz wektor z HO-1 w orientacji „antysens” (LSN-RHO-1-AS). Nerki pobierano po 3 miesiącach od podania STZ. CoPP (5 mg/100 g, s.c.) podawano raz w tygodniu przez 3 tygodnie poprzedzające pobranie nerek

5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. Indukcja HO-1 w nerkach występowała we wszystkich badanych modelach: towarzyszyła zaciśnięciu tętnicy nerkowej (2K1C), podaniu jonowego środka kontrastowego (ONN) oraz, w dłuższej perspektywie czasowej, rozwojowi cukrzycy po dootrzewnowym podaniu szczurom streptozotocyny (STZ).

2. Pojawiające się uszkodzenie nerek charakteryzowało się zaburzeniem ich morfologii (2K1C), upośledzeniem ich funkcji (2K1C, ONN), pojawieniem się w komórkach enzymów zapalnych (2K1C) oraz wzrostem wytwarzania reaktywnych form tlenu w tkance (2K1C, ONN, STZ).

3. We wszystkich trzech modelach uszkodzeniu nerek (zwłaszcza rdzenia) towarzyszyło nasilenie się apoptozy, ze wzmożoną aktywacją kaspaz (2K1C, ONN) oraz zmianami ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych (2K1C, ONN, STZ). Aktywacja apoptozy była zwiększona u zwierząt z upośledzoną ekspresją szlaku HO-1.

4. We wszystkich modelach chemiczny induktor HO-1 (CoPP) zwiększał ekspresję HO-1 w nerkach i zapobiegał ich morfologicznemu i czynnościowemu uszkodzeniu.

5. Wywołanej przez CoPP indukcji HO-1 towarzyszyło zahamowanie apoptozy (wyrażone niższą aktywnością kaspaz), zwiększona ekspresja antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-xl oraz podniesiony poziom ekspresji i zwiększony stopień fosforylacji kinazy Akt (2K1C).

6. W modelu cukrzycy wyidukowana pod wpływem CoPP HO-1 lokalizowała się w mitochondriach. Pojawienie się HO-1 w mitochondriach wiązało się ze zwiększeniem aktywności mitochondrialnej oksydazy cytochromu c oraz spadkiem mitochondrialnego wytwarzania anionu nadadtlenkowego (O_2^-).

6. DYSKUSJA

Indukcja HO-1 towarzyszyła uszkodzeniu nerek we wszystkich zastosowanych modelach badawczych: w trakcie rozwoju nadciśnienia naczyniowo-nerkowego, ostrej niewydolności nerek oraz cukrzycy. Chociaż modele te różnią się przyczynami i stopniem uszkodzenia nerek, mechanizmy wiodące do indukcji HO-1 w każdym z nich mogą być podobne.

W modelu 2K1C poprzez kontrolowane zaciśnięcie tętnicy nerkowej ograniczony zostaje przepływ krwi przez jedną z nerek, podczas gdy druga pozostaje nietknięta [137, 268]. Masywne uwalnianie reniny z niedokrwionej nerki doprowadza do zwiększonego wytwarzania angiotensyny II w samym narządzie oraz wzrostu jej stężenia we krwi [144, 191, 214, 231, 268, 272]. Nerka niedokrwiona ulega atrofii, nerka „zdrowa” zaś przerasta i podlega hiperperfuzji, co zapobiega wystąpieniu hiperwolemii (typowej dla modelu 1K1C, w którym zaciska się tętnicę nerkową po przedniej, przeciwstronnej nefrektomii). W modelu 2K1C za wystąpienie i podtrzymanie nadciśnienia odpowiada więc przede wszystkim wzmożona aktywacja układu renina–angiotensyna–aldosteron (RAA) [231].

Angiotensyna II jest jednym z typowych induktorów HO-1 w tkankach [157, 323, 343], jednak sam wzrost poziomu krążącej angiotensyny II nie wydaje się wystarczać do indukcji HO-1 w nerce w modelu 2K1C. Znamienne, że poziom HO-1 wzrastał jedynie po stronie zaciśniętej tętnicy nerkowej – wydaje się więc, że krytyczne dla wystąpienia indukcji HO-1 było miejscowe, nakładające się działanie kilku czynników (hipoksji, zwiększonego powstawania ROS, aktywacji układu RAA). Co ciekawe, podobna konstelacja mechanizmów patologicznych (wzmożone, wewnątrznerkowe powstawanie angiotensyny II, skurcz naczyń, hipoksja i nasilenie wytwarzania ROS) pojawia się nie tylko po zaciśnięciu tętnicy nerkowej, lecz odgrywa również dużą rolę w patogenezie uszkodzenia nerek po podaniu jonowego środka kontrastowego [23, 164, 165, 224, 295, 308, 314] oraz w przebiegu nefropatii cukrzycowej [22, 59, 77, 296, 364, 396, 452].

W kontekście rozważań roli fizjologicznej niezwykle ważnym zagadnieniem jest lokalizacja HO-1 w nerce [69]. O ile umiejscowienie w nerkach konstytutywnej HO-2 jest dobrze opisane i nie budzi większych wątpliwości (występuje głównie w komórkach części wstępującej pętli Henlego, komórkach kanalików zbiorczych oraz w tętnicach międzypłacikowych i tętniczkach doprowadzających) [82, 190, 240], o tyle o wiele trudniej wskazać typową lokalizację pojawiającej się w warunkach patologicznych izoformy HO-1 – zależy ona w dużym stopniu od rodzaju uszkodzenia nerek. U zwierząt w modelu rabdomiolizy, w przypadku uszkodzenia nerek spowodowanego

podawaniem cisplatyny lub angiotensyny II, HO-1 pojawia się głównie w części proksymalnej cewek nerkowych [8, 157, 287, 416]; podobnie w przypadkach niektórych schorzeń nerek u ludzi – nocnej napadowej hemoglobinurii, nefropatii IgA czy ostrej martwicy cewek [290, 300]. Donoszono jednak także o indukcji HO-1 w kłębuszkach nerkowych i komórkach mezangium w przypadku kłębuszkowych zapaleń nerek [85, 86, 276] oraz w cewkach, komórkach śródmiąższowych i mięśniach gładkich naczyń nerkowych w przebiegu anemii sierpowatokrwinkowej [288]. Charakterystyczne, że w większości schorzeń indukcja HO-1 występuje w miejscu największego uszkodzenia – w naszym modelu zaciśnięcie tętnicy nerkowej powodowało indukcję HO-1 głównie w najbardziej niedokrwionym obszarze – rdzeniu nerki. Co ciekawe, zasada ta nie ma zastosowania do szczurzego modelu ostrej niewydolności nerek spowodowanej podaniem środka kontrastowego – tu indukcja HO-1 zachodziła jedynie w korze nerek, chociaż model ten, szczególnie po modyfikacji polegającej na zahamowaniu indometacyną syntezy prostaglandyn, uznawany jest za selektywnie uszkadzający rdzeń tego narządu [49, 100, 164, 165].

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że naturalne mechanizmy indukcji HO-1 w odpowiedzi na zaciśnięcie tętnicy nerkowej upośledzone były u szczurów, którym tuż po urodzeniu podawano wektor zawierający gen szczurzej HO-1 w orientacji „antsens”. Jak to już wcześniej opisano, tego rodzaju manipulacja genetyczna prowadzi do trwałego obniżenia zdolności komórek i tkanek do indukcji HO-1 w odpowiedzi na naturalny stres, ale nie zamyka możliwości wyindukowania enzymu substancjami egzogennymi, jak np. metaloporfirynami [330, 449]. Tak zmodyfikowane szczury stanowią więc bardzo wygodny model badawczy, a genetyczne hamowanie ekspresji HO-1 funkcjonalnie odpowiada użyciu inhibitora aktywności HO – mezoporfiryny cynowej (SnMP) u „regularnych” zwierząt laboratoryjnych.

Zarówno w modelu 2K1C, jak i niewydolności nerek po podaniu środka kontrastowego, zahamowanie aktywności HO wiązało się z nasilaniem uszkodzenia nerek, indukcja zaś HO-1 za pomocą CoPP wiązała się z działaniem ochronnym. Zaciśnięcie tętnicy nerkowej powodowało atrofię i patologiczne zmiany w strukturze nerek, zaostrome u zwierząt z genetycznym upośledzeniem indukcji HO-1. Co ciekawe, już w nerkach szczurów z upośledzoną indukcją HO-1, poddanych jedynie operacji „pozorowanej”, notowano mikroskopowe cechy uszkodzenia, występował wyższy poziom COX-2 (izoformy pojawiającej się głównie w odpowiedzi tkanki na stres, chociaż w małych ilościach obecnej w nerkach konstytutywnie, w warunkach fizjologicznych [120, 156, 450]) oraz 3-nitrotyrozyny (3-NT) – wykładnika stresu oksydacyjnego, „chemicznego dowodu” działania wolnego rodnika – nadtlenoazotynu – na reszty tyrozynowe białek [61, 91, 103, 335]. Różnice te utrzymywały się także u zwierząt poddanych zaciśnięciu tętnicy nerkowej.

W modelu ONN podanie środka kontrastowego powodowało również znaczne zwiększenie wytwarzania w nerkach anionu ponadtlenkowego, co było nieco nasilane przez inhibitor aktywności HO, mezoporfirynę cynową (SnMP).

Należy podkreślić, że w obu modelach „superindukcja” HO-1, osiągnięta poprzez zastosowanie CoPP, znamienne zmniejszała w nerkach stres oksydacyjny, zapobiegała ich makro- i mikroskopowemu uszkodzeniu oraz poprawiała ich funkcje (klirens kreatyniny), w modelu 2K1C takie działanie CoPP wiązało się także z normalizacją ciśnienia krwi. Wynik ten pozostaje w zgodzie z wcześniejszym doniesieniem dotyczącym mo-

delu 2K1C [44] oraz uzupełnia badania przeprowadzone na modelu 1K1C, w którym unieczynnienie genu HO-1 sprzyjało nadciśnieniu i uszkodzeniu nerki [434].

Jakie mechanizmy molekularne mogą odpowiadać za ochronne działanie HO-1 w nerkach? Układ hem–oksygenaza hemowa ujawnił swoje cytoprotekcyjne działanie w wielu modelach uszkodzenia narządowego [343, 346, 442], jednak wydaje się, że szczególną rolę układ ten pełni w nerkach [3, 166, 362], gdzie indukcję HO-1 można rozważać jako jeden z podstawowych mechanizmów adaptacji do uszkodzenia spowodowanego niedokrwieniem i reperfuzją [9, 392], działaniem nefrotoksyn (np. cisplatyny, czy rapamycyny) [8, 139], zapaleniem kłębuszków nerkowych [85, 276, 416], rabdomiolizą [287, 289] czy reakcją odrzucania przeszczepu [409, 419]. Zrozumienie roli HO w fizjopatologii nerek pogłębiły prace na myszkach z unieczynnionymi genami dla HO-1 [HO-1^{-/-}] lub HO-2 [HO-2^{-/-}] oraz opis kliniczny niedoboru HO-1 u człowieka [300, 326, 327, 443]. W nerkach myszek HO-1^{-/-} powyżej 20. tygodnia życia, w korze w okolicach cewek wykazywano obecność złogów żelaza, a z czasem u zwierząt tych pojawiało się zapalenie kłębuszków nerkowych [327]. Z kolei u myszek HO-2^{-/-} podanie streptozotocyny powodowało większe zmiany morfologiczne i funkcjonalne nerek niż u myszek kontrolnych [141].

U pacjenta z niedoborem HO-1 notowano podobny fenotyp zaburzeń, jak w przypadku myszek HO-1^{-/-}: zaburzenie wzrostu, anemia, złogi żelaza w narządach mięszkowych, powiększenie węzłów chłonnych, leukocytoza, hepatosplenomegalia, wzrost podatności komórek na uszkodzenie przez stres oksydacyjny. Tak jak w przypadku myszek HO-1^{-/-} nerkowe złogi żelaza lokalizowały się przede wszystkim w okolicy cewek proksymalnych, a w nerkach występował łagodny rozplam mezangium i uszkodzenie naczyń kłębuszków [300, 443].

Nefroprotecyjna rola HO zależy może od kilku mechanizmów. Po pierwsze, indukcja HO-1 sprzyja usuwaniu toksycznego i nasilającego wytwarzanie ROS wolnego hemu [325, 344]. Poziom wolnego hemu w nerkach wzrasta w czasie ich ostrego uszkodzenia i jego usuwanie może mieć duże znaczenie dla ochrony nerek [140, 219, 405]. Rzeczywiście, w naszych eksperymentach podanie środka kontrastowego powodowało kumulację wolnego hemu w tkance nerek, czemu zapobiegał induktor HO-1, CoPP.

Po drugie, podwyższona aktywność HO-1 skutkuje zwiększeniem wytwarzania bilirubiny, CO oraz żelaza, którego potencjalnie szkodliwe, prooksydacyjne działanie neutralizowane jest przez ferrytynę (jej indukcja prawie zawsze towarzyszy indukcji HO-1) i/lub zwiększony transport Fe²⁺ na zewnątrz komórki [121]. Zwiększenie poziomu bilirubiny w tkance nerek może mieć duże znaczenie dla ochronnego działania HO-1. Wewnątrznerkowy stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w patogenezie uszkodzenia nerek po zaciśnięciu tętnicy nerkowej oraz wstrzyknięciu środka kontrastowego [150, 157], a bilirubina, jako niezwykle skuteczny zmiatacz wolnych rodników oraz inhibitor oksydazy NAD[P]H, może ograniczać zarówno powstawanie, jak i oddziaływanie ROS [383, 391]. Ochronne działanie bilirubiny opisane zostało w modelu niedokrwienia i reperfuzji izolowanej nerki [7].

Za działanie ochronne HO-1 odpowiadać może także zwiększone powstawanie tlenku węgla (CO). Na ochronne właściwości CO może składać się jego działanie naczyniorozszerzające [105, 423, 458], hamowanie wytwarzania ROS przez oksydazę NAD[P]H [3], działanie przeciwzapalne [275, 305], a także (w modelach *in vitro*) zdolność do hamowania procesów apoptozy [51]. Wykazano kardioprotekcyjne właściwości ma-

łych ilości gazowego CO [131] oraz związków chemicznych – donorów CO (CORM, CORM-2, CORM-3) [72, 145].

Uzyskane w pracy wyniki świadczą, że nadmiernie nasiloną apoptozę odgrywa ważną rolę w patogenezie uszkodzenia nerek i nadciśnienia spowodowanego zaciśnięciem tętnicy nerkowej oraz niewydolności nerek po podaniu jonowego środka kontrastowego. Zaciśnięcie tętnicy nerkowej powodowało wzrost w tkance nerek liczby komórek apoptotycznych oraz zwiększenie aktywności kaspazy-3 w homogenacie z narządu. We wcześniejszych badaniach prowadzonych w modelu 2K1C wykazano aktywację kaspazy-3 oraz kaspazy-9, ale nie kaspazy-8 [43]. Podobnie w nerkach szczurów z eksperymentalną cukrzycą dochodziło do aktywacji kaspazy-3 i kaspazy-9, aktywność zaś kaspazy-8 nie ulegała podwyższeniu. Inaczej było w modelu ONN, gdzie podanie środka kontrastowego powodowało aktywację wszystkich trzech kaspaz w rdzeniu nerek.

Analiza aktywności poszczególnych kaspaz sugeruje, że w modelu 2K1C oraz cukrzyca wywołanej podaniem STZ dochodzi głównie do aktywacji wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy (zob. rys. 2), zależnego od destabilizacji mitochondriów i uwalniania z nich proapoptotycznych białek. W modelu ONN, obok niewątpliwiej aktywacji szlaku wewnątrzpochodnego, nasila się także działanie szlaku zewnątrzpochodnego (mogłoby to być np. wykładnikiem silniejszej w tym modelu komponenty zapalnej). Znamienne jest także, że we wszystkich trzech modelach miejsce najsilniejszej aktywacji procesów apoptozy pokrywa się z miejscem największego uszkodzenia narządu.

Niniejsza praca po raz pierwszy zwraca uwagę na istotną rolę programowanej śmierci komórek w modelu 2K1C, chociaż również wiadomo, że nadmiernie nasiloną apoptozę może przyczyniać się do rozwoju różnych schorzeń nerek [3, 195, 196, 246]: ostrej niewydolności nerek w przebiegu ich niedokrwienia i reperfuzji [37, 83, 108, 134, 223, 309, 415], uszkodzenia spowodowanego podaniem środka kontrastowego [169] i glicerolu [171], a także nefropatii cukrzycowej [218, 428, 440] i torbielowości nerek [107]. W większości wypadków apoptozę bierze udział w uszkodzeniu cewek nerkowych, chociaż ostatnio podnosi się również udział programowanej śmierci komórki w patologii kłębuszków nerkowych [175, 258]. Wydaje się, że hamowanie apoptozy mogłoby stanowić obiecującą strategię ochrony nerek [117, 303].

W prezentowanych modelach uszkodzenia nerek upośledzenie indukcji HO-1 lub zahamowanie jej aktywności wiązało się z nasileniem, „superindukcja” zaś HO-1 za pomocą CoPP z zahamowaniem apoptozy. Co ciekawe, w modelu 2K1C, już u zwierząt poddanych operacji „pozorowanej”, genetyczne upośledzenie indukcji HO-1 podwyższało liczbę komórek apoptotycznych w tkance nerek, czemu jednak nie towarzyszył wzrost aktywności kaspazy-3 (sugerowałoby to aktywację niezależnych od kaspaz dróg apoptozy w nerkach tych zwierząt [50]). Zaciśnięcie tętnicy nerkowej u szczurów, którym podano wektor zawierający gen HO-1 w orientacji „antysens”, powodowało znamienne silniejszą aktywację kaspazy-3 w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Podobnie w modelu ONN zastosowanie inhibitora aktywności HO, SnMP, nasilało aktywację kaspaz. Niezmiernie ważne jest, że indukcja HO-1 za pomocą CoPP we wszystkich trzech modelach uszkodzenia nerek znamienne zmniejszała cechy aktywacji apoptozy. Możliwość hamowania apoptozy w nerkach przez HO-1 podnoszona była już wcześniej [204, 331], jednak mechanizmy antyapoptotycznego działania HO-1 nie były zbadane.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że hamowanie apoptozy przez HO-1 odbywa się poprzez wpływ na białka regulujące procesy apoptozy z rodziny Bcl-2 oraz kinazę białkową Akt. W modelu 2K1C, w grupie zwierząt poddanych operacji „pozorowanej”, w porównaniu ze szczurami kontrolnymi, poziom jednego z głównych aktywatorów apoptozy – białka Apaf-1 – w homogenatach nerek był wyraźnie wyższy u szczurów z genetycznym upośledzeniem indukcji HO-1 i różnica ta utrzymywała po zaciśnięciu tętnicy nerkowej. U tych zwierząt upośledzony był także wzrost ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 w odpowiedzi na zaciśnięcie tętnicy nerkowej – jak się wydaje naturalna reakcja obronna, rozwijająca się bez przeszkód u zwierząt kontrolnych. Z kolei w modelu niewydolności nerek farmakologiczne hamowanie aktywności HO silnie zwiększało, zarówno w rdzeniu, jak i w korze nerek poziom proapoptotycznego, destabilizującego mitochondria, białka Bax oraz zmniejszało w korze nerek ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2. Szczególnie ważny jest fakt, że we wszystkich modelach uszkodzenia nerek indukcja HO-1 za pomocą CoPP silnie zwiększała poziomy antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-xl.

Wzajemne hamowanie pomiędzy pro- i antyapoptotycznymi białkami z rodziny Bcl-2, realizowane głównie poprzez bezpośrednie oddziaływanie ich domen białkowych (BH1–BH4), jest kluczowe dla skutecznej kontroli wewnątrzpochodnego szlaku programowanej śmierci komórki [41, 355, 436]. Biorąc pod uwagę działanie i strukturę, liczną rodzinę tych białek dzieli się na 3 podgrupy: posiadające 4 domeny BH białka hamujące apoptozę (np. Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1), wielodomenowe (ale bez domen BH4) białka nasilające apoptozę (np. Bax, Bak, Bok/Mtd) oraz proapoptotyczne białka zawierające jedynie domenę BH3 (np. Bad, Bid, Bim/Mod, Noxa, Puma/Bbc3, Bmf). Liczne badania wciąż przynoszą nowe informacje o działaniu poszczególnych składowych rodziny Bcl-2 [6, 143, 149, 339]. W największym skrócie, podczas aktywacji wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy białka Bax i Bak, tworząc oligomery na powierzchni mitochondriów, biorą udział w uwalnianiu z nich potężnych aktywatorów apoptozy [193]. Główną rolą antyapoptotycznych białek Bcl-2 jest zapobieganie tej reakcji. Należy jednak podkreślić, że ochronna rola takich białek, jak Bcl-2 i Bcl-xl wykracza poza bezpośrednie hamowanie białek proapoptotycznych – mogą one również stabilizować przepuszczalność dla wapnia błon siateczki śródplazmatycznej i mitochondrium oraz działać antyoksydacyjnie [99, 182]. Z kolei białka zawierające jedynie domenę BH3, indukowane w sytuacji stresu komórkowego, inaktywują antyapoptotyczne białka Bcl-2. Komórki regulują ekspresję oraz aktywność (poprzez modyfikacje potranslacyjne) poszczególnych składowych rodziny Bcl-2 [41, 436]. Uzyskane wyniki wskazują, że ochronna rola HO-1 może polegać na przywracaniu prawidłowej równowagi pomiędzy ekspresją pro- i antyapoptotycznych białek rodziny Bcl-2, a przez to na stabilizacji mitochondriów. Dokładny mechanizm molekularny takiego wpływu wymaga jednak dalszych badań.

W modelu 2K1C indukcji HO-1 wywołanej przez CoPP towarzyszyło podwyższenie poziomu kinazy Akt oraz wzrost jej aktywności, mierzony stopniem krytycznej dla jej działania fosforylacji – przy reszcie seryny 473 [450]. Kinaza białkowa Akt (znana także jako PKB, *protein kinase B*) to konserwatywne białko występujące u ssaków w trzech izoformach – PKB α , PKB β i PKB γ (Akt1, Akt2 i Akt3) – odgrywające (z pewnymi różnicami co do poszczególnej izoformy [163]) centralną rolę w regulacji metabolizmu (zwłaszcza cukrów), transkrypcji mRNA, przebiegu cyklu komórkowego i funkcji cytoszkieletu [46, 55, 104, 118]. Kinaza Akt sprzyja proliferacji komórkowej i pełni aktyw-

nią rolę w hamowaniu apoptozy, m.in. poprzez inaktywację proapoptotycznego białka Bad [87, 126, 370, 401], które – podobnie jak inni sprzyjający apoptozie „członkowie” rodziny Bcl-2 – bierze udział w destabilizacji mitochondriów [355]. Należy dodać, że działanie kinazy Akt jest bardzo ściśle związane z mitochondriami – oprócz hamowania białka Bad odpowiada ona za przyłączanie do błon mitochondrialnych innych regulatorów apoptozy (w tym np. innych kinaz), sama może także łączyć się z błonami mitochondrialnymi, a nawet być „importowana” do wnętrza tych organelli [34, 311]. Podstawowym aktywatorem kinazy Akt jest kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K) pobudzana związaniem się ze swoistymi receptorami czynników wzrostu czy insuliny [26, 159, 161, 375]. Chociaż mechanizm aktywacji Akt przez HO-1 w naszych modelach badawczych pozostaje niejasny, to można spekulować, że mógłby zależeć on od odkrytej niedawno zdolności CO do pobudzania PI3K [235, 460]. Schematyczne ujęcie zakładanych punktów działania HO-1 na szlaki apoptozy przedstawia rysunek 29.

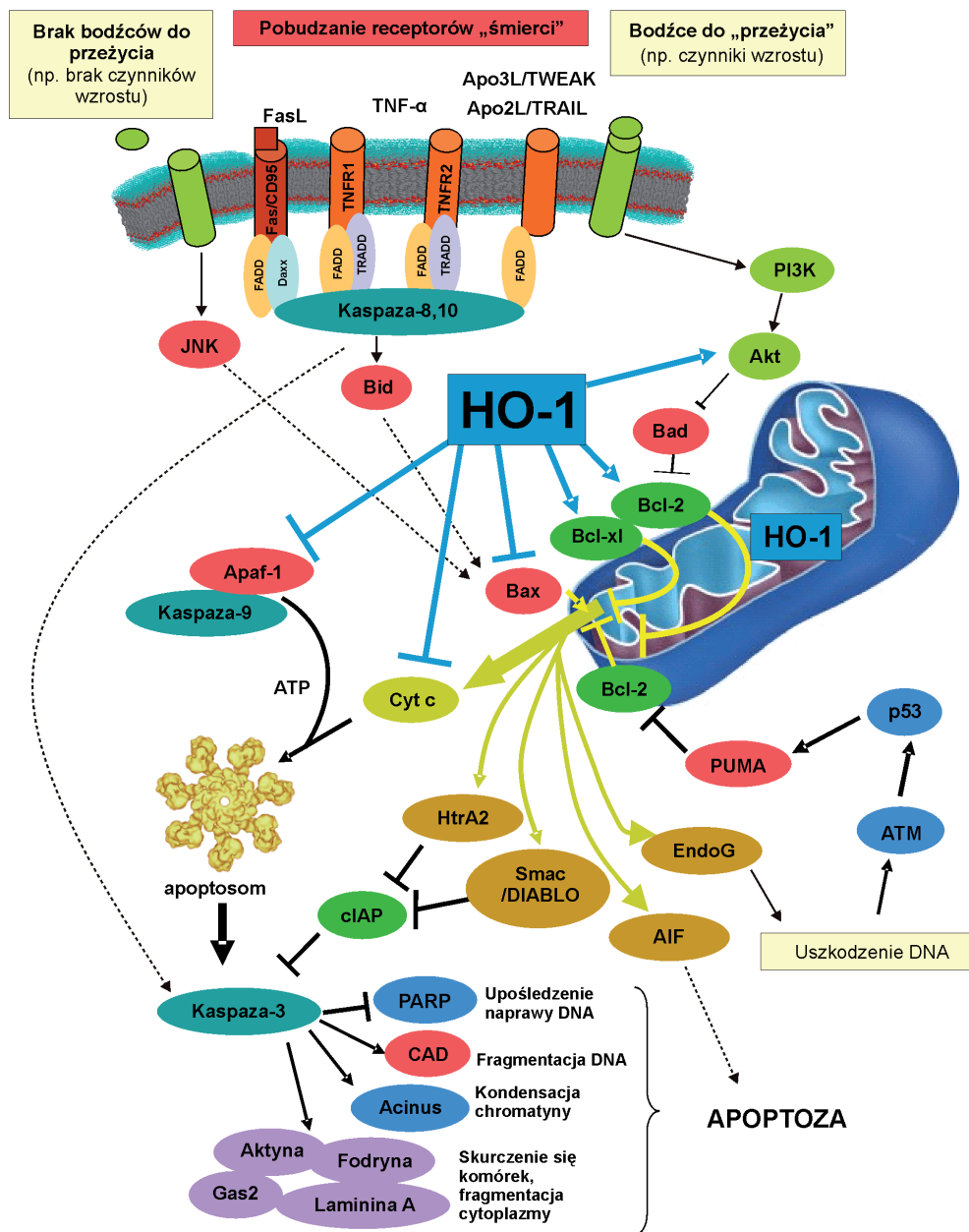
Biologicznym rezultatem antyapoptotycznego działania HO-1 wydaje się stabilizacja mitochondriów i poprawa ich funkcji. Mitochondria to nie tylko komórkowe „elektrownie” odpowiedzialne za wytwarzanie energii, ale także podstawowe organelle regulujące przebieg wewnątrzkomórkowego szlaku programowanej śmierci komórki [15, 45, 62, 260]. Uzyskane wyniki sugerują, że działanie biologiczne indukowanych (lub hamowanych) przez HO-1 molekuł skupia się właśnie na tych organellach [172, 338, 413]. Co więcej, wydaje się, że mitochondria mają swój „własny” układ HO (rys. 29).

Podawanie CoPP w modelu cukrzycy szczurom z genetycznym upośledzeniem indukcji HO-1 powodowało pojawienie się tego enzymu we frakcji mitochondrialnej. Mitochondrialna lokalizacja HO-1 potwierdzona była barwieniem immunocytochemicznym, wykonanym techniką EM *immunogold*. Co więcej, podawanie CoPP poprawiało funkcje mitochondriów – odwracało cukrzycowe upośledzenie aktywności mitochondrialnej oksydazy cytochromu c oraz zmniejszało mitochondrialne wytwarzanie ROS.

Niewiele wiadomo o „wewnątrzmitochondrialnej HO-1” – po raz pierwszy możliwość takiej lokalizacji tego enzymu zasugerowano bardzo niedawno [76, 343]. Podejrzewa się, że główną rolą tej HO-1 byłaby degradacja hemu uwalnianego z licznych mitochondrialnych hemoprotein [76]. Istnieją jednak wiarygodne przesłanki, że wewnątrzmitochondrialna HO-1 mogłaby również regulować funkcje tych organelli [98]. Czy mogłaby także zapobiegać uwalnianiu z nich aktywatorów apoptozy, np. cytochromu c? Uzyskane w modelu cukrzycy wyniki sugerują taką właśnie możliwość.

Potencjalny mechanizm takiego działania HO-1 mógłby np. zależeć od ograniczania prooksydacyjnego działania wolnego hemu na lipidy błon mitochondrialnych [98] – ich stan bowiem (np. stopień utlenienia kardiolipiny) istotnie wpływa na funkcje mitochondriów i działanie systemu pro- i antyapoptotycznych białek Bcl-2 [264, 298, 304, 433, 439].

Śmierć jest nieodłączną towarzyszką życia. Nadmierne hamowanie apoptozy może sprzyjać chorobom nowotworowym i zaburzeniom autoimmunizacyjnym [111, 158, 266]. Jednakże nadmiernie nasilona, „rozregulowana” apoptoza bierze udział w patogenezie wielu schorzeń, w tym również tych przewlekłych, zwanych cywilizacyjnymi – chorób układu sercowo-naczyniowego [88, 183, 461] oraz zaburzeń degeneracyjnych układu nerwowego [281]. Coraz bardziej intensywne są więc próby bezpiecznego hamowania programu śmierci komórki, np. poprzez wpływanie na białka regulujące apoptozę lub poprawiające funkcje mitochondriów [132, 146, 158, 202, 281, 319, 389, 397, 432].



Rys. 29. Schematyczne ujęcie wpływu HO na podstawowe szlaki apoptozy. Szczegóły w tekście

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że system HO działa ochronnie poprzez przywracanie prawidłowej regulacji apoptozy w wybranych, zwierzęcych modelach ostrego i przewlekłego uszkodzenia nerek. Otwarte jednak pozostaje pytanie, na

ile wyniki te można odnieść do sytuacji klinicznej. Każdy model zwierzęcy ma ograniczenia i odrębności, które uniemożliwiają „automatyczne” odniesienia do prawdziwego schorzenia u ludzi. Dotyczy to także zwierzęcych modeli uszkodzenia nerek [48, 64, 374]. Biorąc pod uwagę patomechanizmy oraz obraz morfologiczny, modele ostrego uszkodzenia nerek, spowodowanego zaciśnięciem tętnicy nerkowej (2K1C) oraz podaniem środka kontrastowego (ONN), są bardziej zbliżone do sytuacji klinicznej niż model ich przewlekłego uszkodzenia w przebiegu cukrzycy typu 1, rozwijającej się po podaniu streptozotocyny [49, 164, 165, 430]. Wydaje się więc, że uzyskane w niniejszej pracy wyniki można, chociaż z dużą ostrożnością, odnieść przede wszystkim do przebiegu klinicznego ostrej niewydolności nerek.

Nefroprotekcyjne działanie HO-1 wykazywano już wcześniej [9, 10, 393]. Niniejsza praca podkreśla kluczowe znaczenie apoptozy w uszkodzeniu nerek, spowodowanym zaciśnięciem tętnicy nerkowej oraz podaniem środka kontrastowego, oraz identyfikuje hamowanie apoptozy przez HO-1 jako główny mechanizm jej działania ochronnego. W niniejszej pracy po raz pierwszy zaproponowano również mechanizm molekularny ochronnego działania HO-1 w „nerkowej” postaci uszkodzenia nerek.

Co ciekawe, istnieją przesłanki, aby uznać hamowanie apoptozy poprzez stymulację kinazy Akt oraz indukcję antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 za uniwersalny mechanizm dobroczynnego działania HO-1. Ostatnie miesiące przynoszą kolejne ciekawe doniesienia o powiązaniach HO-1 z układem białek Bcl-2 w modelach *in vitro* uszkodzenia komórek śródbłonna [426], kardiomiocytów [155], komórek siatkówki oka [388] oraz *in vivo*, w modelu niedokrwienia jelit [176] i wątroby [199]. Znalezienie bezpiecznych, farmakologicznych sposobów naśladowania tego, jak się wydaje, uniwersalnego mechanizmu ochronnego mogłoby więc przyczynić się nie tylko do postępów w leczeniu ostrej lub przewlekłej niewydolności nerek, lecz także schorzeń, w których rozwoju rolę odgrywa nadmiernie nasiloną apoptoza.

7. WNIOSKI

1. Nadmiernie nasiloną apoptozę, a zwłaszcza jej szlak wewnątrzpochodny, odgrywa ważną rolę w patogenezie uszkodzenia nerek i nadciśnienia spowodowanego zaciśnięciem tętnicy nerkowej oraz niewydolności nerek po podaniu jonowego środka kontrastowego.

2. Niezależnie od modelu, indukcja HO-1 towarzysząca uszkodzeniu nerek jest częścią ochronnej odpowiedzi adaptacyjnej narządu ukierunkowanej na ograniczenie uszkodzenia.

3. Mechanizm ochronnego działania HO-1 polega na aktywnym hamowaniu apoptozy, zwłaszcza jej szlaku wewnątrzpochodnego, poprzez podwyższenie poziomu regulatorowych białek antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-xl), obniżanie poziomu białek proapoptotycznych (Bax) oraz aktywację szlaku kinazy Akt.

4. Hamowanie wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy może być związane z wewnątrzmitochondrialną HO-1 i jej potencjalnym wpływem ochronnym na mitochondria.

8. STRESZCZENIE

Oksygenaza hemowa (HO), a szczególnie jej izoforma indukowalna (HO-1), odgrywa główną rolę w obronie komórek i tkanek przed różnego rodzaju uszkodzeniem. Wykazano ochronną rolę HO-1 w wielu schorzeniach nerek, jednak pomimo intensywnych badań dokładne mechanizmy dobroczynnego działania tego enzymu nie są do końca poznane.

Nadmiernie nasilona apoptoza bierze udział w rozwoju wielu ostrych i przewlekłych schorzeń nerek, a hamowanie procesów apoptozy może mieć duży potencjał terapeutyczny.

Celem pracy było zbadanie mechanizmów oddziaływania szlaku HO na procesy apoptozy w trzech różnych szczurzych modelach uszkodzenia nerek: modelu nadciśnienia naczyniowo-nerkowego *2 Kidney 1 Clip* (2K1C), modelu ostrej niewydolności nerek spowodowanej podaniem środka kontrastowego (kwas jotalamowy) (ONN) oraz modelu cukrzycy spowodowanej podaniem streptozotocyny (STZ).

W badaniach stosowano zarówno strategie hamujące aktywność HO (szczury, którym zaraz po urodzeniu podawano retrowirusowy wektor zawierający gen szczurzej HO-1 ułożony w orientacji „antysens”); podawanie inhibitora aktywności HO – mezoporfiryny cynowej – SnMP), jak i zwiększające indukcję HO-1 (podawanie chemicznego induktora HO-1 – protoporfiryny kobaltowej – CoPP). Oceniano makro- i mikroskopowe (ocena histologiczna), biochemiczne (tkankowa ekspresja zapalnej cyklooksygenazy-2 oraz 3-nitrotyrozyny) oraz funkcjonalne (klirens kreatyniny) wykładniki uszkodzenia nerek. W nerkach mierzono ekspresję i aktywność izoform HO (pomiar spektrofotometryczny i techniką Western blot), nasilenie apoptozy (metoda TUNEL, aktywność poszczególnych kaspaz) oraz ekspresję wybranych pro- i antyapoptotycznych białek (Bcl-2, Bcl-x1, Bax, Apaf-1, Akt i fosfo-Akt).

Indukcja HO-1 w nerkach występowała we wszystkich badanych modelach: towarzyszyła zaciśnięciu tętnicy nerkowej (2K1C), podaniu jonowego środka kontrastowego (ONN) oraz, w dłuższej perspektywie czasowej, rozwojowi cukrzycy po dootrzewnowym podaniu szczurom streptozotocyny (STZ). Pojawiające się uszkodzenie nerek charakteryzowało się zaburzeniem ich morfologii (2K1C), upośledzeniem ich funkcji (2K1C, ONN), pojawieniem się w komórkach enzymów zapalnych (2K1C) oraz wzrostem wytwarzania wolnych rodników tlenowych w tkance (2K1C, ONN, STZ). We wszystkich modelach eksperymentalnych CoPP zwiększał ekspresję HO-1 w nerkach i zapobiegał ich morfologicznemu i czynnościowemu uszkodzeniu, a wywołanej przez CoPP indukcji HO-1 towarzyszyło zahamowanie apoptozy (wyrażone niższą aktyw-

nością kaspaz), zwiększona ekspresja antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-xl oraz podniesiony poziom ekspresji i zwiększony stopień fosforylacji kinazy Akt (2K1C). Co ciekawe, w modelu cukrzycy wyidukowana pod wpływem CoPP HO-1 lokalizowała się w mitochondriach, a pojawieniu się HO-1 towarzyszyło zwiększenie aktywności mitochondrialnej oksydazy cytochromu c oraz spadek mitochondrialnego wytwarzania anionu nadadtlenkowego (O_2^-).

Podsumowując, mechanizm ochronnego działania HO-1 w badanych modelach uszkodzenia nerek polegał na aktywnym hamowaniu apoptozy, zwłaszcza jej szlaku wewnątrzpochodnego, poprzez podwyższanie poziomu regulatorowych białek antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-xl), obniżanie poziomu białek proapoptotycznych (Bax) oraz aktywację szlaku kinazy Akt. Hamowanie wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy mogło być związane z wewnątrzmitochondrialną lokalizacją HO-1 i jej potencjalnym wpływem ochronnym na mitochondria. Znalezienie bezpiecznych, farmakologicznych sposobów naśladowania tego mechanizmu ochronnego mogłoby przyczynić się nie tylko do postępów w leczeniu ostrej lub przewlekłej niewydolności nerek, ale także schorzeń, w rozwoju których rolę odgrywa nadmiernie nasilona apoptoza.

9. ABSTRACT

Heme oxygenase (HO) (esp. its inducible isoform – HO-1), plays pivotal role in cellular defense against various form of injury and induction of HO-1 has been shown to play a protective role in renal pathology. However, despite intensive studies the exact mechanisms of renoprotective action of HO have not been fully established.

It is known that enhanced apoptosis contributes to the development of various acute and chronic renal disorders, thus the inhibition of apoptotic processes may represent new, important therapeutic approach.

The aim of this study was to study the mechanisms of anti-apoptotic action of HO system in three different rat models of kidney injury: 2 kidney 1 clip reno-vascular hypertension (2K1C), acute renal failure induced by injection of contrast medium (iothalamic acid – ARF) and diabetes induced by administration of streptozotocin (STZ). Both, strategies aimed to diminish HO activity (use of rats injected with retroviral vector containing rat HO-1 gene in anti-sens orientation; use of HO activity inhibitor, stannous mesoporphyrin – SnMP) and to enhance HO-1 induction (use of chemical HO-1 inducer, cobalt protoporphyrin – CoPP) were applied. Renal functional parameters (creatinine clearance) as well as macro- and microscopic features of kidney injury (histology, tissue expression of cyclooxygenase-2 and 3-nitrotyrosine) were estimated. The expression and activity of HO isoforms (spectrophotometric assay, western blot technique), activation of apoptotic processes (TUNEL method, activity of caspases) as well as expression of selected pro- and anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xl, Apaf-1, Bax, Akt kinase and its phosphorylation) were estimated.

Depending on the model, the injury was characterized by derangement of kidney morphology (2K1C), impairment of kidney function (2K1C, ARF), tissue induction of inflammatory enzymes (2K1C) and increase of oxygen free radical production (2K1C, ARF, STZ). In every model kidney injury was accompanied by the induction of HO-1.

Enhanced apoptosis was triggered in three models of kidney injury, as evidenced by activation of caspases and changes in expression of pro- and anti-apoptotic regulatory proteins. Apoptosis was enhanced by use of HO activity inhibitor, SnMP, and in HO-1-antisense rats. In every model of kidney injury, induction of HO-1 by chemical inducer, CoPP was associated with decrease of morphological and functional damages as well as with inhibition of apoptosis and increased expression of anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xl, Akt and phosho-Akt). Interestingly, in kidneys of STZ-treated rats, CoPP-induced HO-1 was localized in mitochondria, what was associated with increase of activ-

ity of mitochondrial cytochrome c oxidase and decrease of mitochondrial production of superoxide anion (O_2^-).

Summing up, the mechanism of protective action of HO-1 in studied models of kidney injury was related to the inhibition of apoptosis (esp. its intrinsic pathway), due to increase of expression of anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xl), decrease of expression of pro-apoptotic factors (Bax) and activation of Akt pathway. Inhibition of intrinsic pathway of apoptosis by HO-1 could be also associated with protective action on mitochondria. Better understanding of influence of HO-1 on apoptotic processes may facilitate designing of HO-1-mimicking drugs, which could be useful in the treatment of apoptosis-related diseases.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abraham N.G., Asija A., Drummond G., Peterson S. Heme oxygenase-1 gene therapy: recent advances and therapeutic applications. *Curr. Gene Ther.* 2007; 7(2):89–108.
- [2] Abraham N.G., Jiang S., Yang L., Zand B.A., Laniado-Schwartzman M., Marji J. et al. Adenoviral vector-mediated transfer of human heme oxygenase in rats decreases renal heme-dependent arachidonic acid epoxygenase activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 293(2):494–500.
- [3] Abraham N.G., Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 39(1):1–25.
- [4] Abraham N.G., Lin J.H., Schwartzman M.L., Levere R.D., Shibahara S. The physiological significance of heme oxygenase. *Int. J. Biochem.* 1988; 20:543–558.
- [5] Abuelo J.G. Normotensive ischemic acute renal failure. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357(8):797–805.
- [6] Adams J.M., Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007; 26(9):1324–1337.
- [7] Adin C.A., Croker B.P., Agarwal A. Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2005; 288(4):F778–F784.
- [8] Agarwal A., Balla J., Alam J., Croatt A.J., Nath K.A. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int.* 1995; 48(4):1298–1307.
- [9] Akagi R., Takahashi T., Sassa S. Fundamental role of heme oxygenase in the protection against ischemic acute renal failure. *Jpn. J. Pharmacol.* 2002; 88(2):127–132.
- [10] Akagi R., Takahashi T., Sassa S. Cytoprotective effects of heme oxygenase in acute renal failure. *Contrib. Nephrol.* 2005; 148:70–85.
- [11] Alcaraz M.J., Fernandez P., Guillen M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr. Pharm. Des.* 2003; 9(30):2541–2551.
- [12] Alexandreanu I.C., Lawson D.M. Heme oxygenase in the rat ovary: immunohistochemical localization and possible role in steroidogenesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2003; 228(1):59–63.
- [13] Allen D.A., Yaqoob M.M., Harwood S.M. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J. Nutr. Biochem.* 2005; 16(12):705–713.
- [14] Ameisen J.C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* 2002; 9(4):367–393.
- [15] Antonsson B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol. Cell Biochem.* 2004; 256–257(1–2):141–155.
- [16] Applegate L.A., Luscher P., Tyrrell R.M. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* 1991; 51(3):974–978.

- [17] Armstrong J.S. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion* 2006; 6(5):225–234.
- [18] Armstrong J.S., Whiteman M. Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria. *Methods Cell Biol.* 2007; 80:355–377.
- [19] Artinian L.R., Ding J.M., Gillette M.U. Carbon monoxide and nitric oxide: interacting messengers in muscarinic signaling to the brain's circadian clock. *Exp. Neurol.* 2001; 171(2):293–300.
- [20] Ashton-Rickardt P.G. The granule pathway of programmed cell death. *Crit. Rev. Immunol.* 2005; 25(3):161–182.
- [21] Assuncao G.C., Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271(9):1638–1650.
- [22] Awad A.S., Webb R.L., Carey R.M., Siragy H.M. Increased renal production of angiotensin II and thromboxane B2 in conscious diabetic rats. *Am. J. Hypertens.* 2005; 18(4 Pt 1):544–548.
- [23] Bakris G.L., Lass N., Gaber A.O., Jones J.D., Burnett J.C. Jr. Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am. J. Physiol.* 1990; 258(1 Pt 2):F115–F120.
- [24] Baranano D.E., Rao M., Ferris C.D., Snyder S.H. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99(25):16093–16098.
- [25] Baranano D.E., Wolosker H., Bae B.I., Barrow R.K., Snyder S.H., Ferris C.D. A mammalian iron ATPase induced by iron. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(20):15166–15173.
- [26] Barnett S.F., Bilodeau M.T., Lindsley C.W. The Akt/PKB family of protein kinases: a review of small molecule inhibitors and progress towards target validation. *Curr. Top Med. Chem.* 2005; 5(2):109–125.
- [27] Basile D.P. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int.* 2007; 72(2):151–156.
- [28] Beale S.I., Cornejo J. Enzymatic heme oxygenase activity in soluble extracts of the unicellular red alga, *Cyanidium caldarium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984; 235(2):371–384.
- [29] Becker E.B., Bonni A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog. Neurobiol.* 2004; 72(1):1–25.
- [30] Beere H.M. „The stress of dying”: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 2004; 117(Pt 13):2641–2651.
- [31] Beierwaltes W.H. Induction of heme oxygenase: can it really reverse hypertension? *Hypertension* 2006; 48(4):555–557.
- [32] Beisswenger P.J. Glomerular basement membrane: biosynthesis and chemical composition in the streptozotocin diabetic rat. *J. Clin. Invest.* 1976; 58(4):844–852.
- [33] Beri R., Chandra R. Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450. *Drug Metab. Rev.* 1993; 25(1–2):49–152.
- [34] Bijur G.N., Jope R.S. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J. Neurochem.* 2003; 87(6):1427–1435.
- [35] Blank M., Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* 2007; 6(6):686–695.
- [36] Boatright K.M., Salvesen G.S. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003; 15(6):725–731.
- [37] Bonegio R., Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2002; 11(3):301–308.
- [38] Bonventre J.V. Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contrib. Nephrol.* 2007; 156:39–46.
- [39] Bonventre J.V., Weinberg J.M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14(8):2199–2210.

- [40] Bonventre J.V., Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004; 66(2):480–485.
- [41] Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.* 2003; 39(11):615–647.
- [42] Borst P., Rottenberg S. Cancer cell death by programmed necrosis? *Drug Resist. Updat.* 2004; 7(6):321–324.
- [43] Botros F.T., Olszanecki R., Prieto-Carrasquero M.C., Goodman A.I., Navar L.G., Abraham N.G. Induction of heme oxygenase-1 in renovascular hypertension is associated with inhibition of apoptosis. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 2007; 53(4):51–60.
- [44] Botros F.T., Schwartzman M.L., Stier C.T. Jr., Goodman A.I., Abraham N.G. Increase in heme oxygenase-1 levels ameliorates renovascular hypertension. *Kidney Int.* 2005; 68(6):2745–2755.
- [45] Bouchier-Hayes L., Lartigue L., Newmeyer D.D. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(10):2640–2647.
- [46] Brazil D.P., Yang Z.Z., Hemmings B.A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29(5):233–242.
- [47] Breimer L.H., Wannamethee G., Ebrahim S., Shaper A.G. Serum bilirubin and risk of ischemic heart disease in middle-aged British men. *Clin. Chem.* 1995; 41(10):1504–1508.
- [48] Breyer M.D., Bottinger E., Brosius F.C., Coffman T.M., Fogo A., Harris R.C. et al. Diabetic nephropathy: of mice and men. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 2005; 12(2):128–145.
- [49] Brezis M., Rosen S., Stoff J.S., Spokes K., Silva P., Epstein F.H. Inhibition of prostaglandin synthesis in rat kidney perfused with and without erythrocytes: implication for analgesic nephropathy. *Miner. Electrolyte Metab.* 1986; 12(5–6):326–332.
- [50] Broker L.E., Krut F.A., Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11(9):3155–3162.
- [51] Brouard S., Berberat P.O., Tobiasch E., Seldon M.P., Bach F.H., Soares M.P. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(20):17950–17961.
- [52] Buckley B.J., Marshall Z.M., Whorton A.R. Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 307(4):973–979.
- [53] Burnett A.L., Johns D.G., Kriegsfeld L.J., Klein S.L., Calvin D.C., Demas G.E. et al. Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nat. Med.* 1998; 4(1):84–87.
- [54] Cairo G., Tacchini L., Pogliaghi G., Anzon E., Tomasi A., Bernelli-Zazzera A. Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the „free” iron pool. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(2):700–703.
- [55] Calleja V., Alcor D., Laguerre M., Park J., Vojnovic B., Hemmings B.A. et al. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol.* 2007; 5(4):e95.
- [56] Camhi S.L., Alam J., Otterbein L., Sylvester S.L., Choi A.M. Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 13(4):387–398.
- [57] Cappello F., Bellafiore M., Palma A., Bucchieri F. Defective apoptosis and tumorigenesis: role of p53 mutation and Fas/FasL system dysregulation. *Eur. J. Histochem.* 2002; 46(3):199–208.
- [58] Cardell L.O., Ueki I.F., Stjarne P., Agusti C., Takeyama K., Linden A. et al. Bronchodilation in vivo by carbon monoxide, a cyclic GMP related messenger. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 124(6):1065–1068.
- [59] Carey R.M., Siragy H.M. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol. Metab.* 2003; 14(6):274–281.

- [60] Carney S.L., Wong N.L., Dirks J.H. Acute effects of streptozotocin diabetes on rat renal function. *J. Lab. Clin. Med.* 1979; 93(6):950–961.
- [61] Ceriello A. Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* 2002; 129:51–58.
- [62] Chan D.C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 2006; 125(7):1241–1252.
- [63] Chapman J.T., Otterbein L.E., Elias J.A., Choi A.M. Carbon monoxide attenuates aeroallergen-induced inflammation in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001; 281(1):L209–L216.
- [64] Chatterjee P.K., Thiemermann C. An in vivo model of ischemia/reperfusion and inflammation of the kidneys of the rat. *Methods Mol. Biol.* 2003; 225:223–237.
- [65] Chen K., Maines M.D. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 2000; 46(3):609–617.
- [66] Chiarugi A. „Simple but not simpler”: toward a unified picture of energy requirements in cell death. *FASEB J.* 2005; 19(13):1783–1788.
- [67] Choi B.M., Pae H.O., Jeong Y.R., Oh G.S., Jun C.D., Kim B.R. et al. Overexpression of heme oxygenase (HO)-1 renders Jurkat T cells resistant to fas-mediated apoptosis: involvement of iron released by HO-1. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36(7):858–871.
- [68] Chong Z.Z., Li F., Maiese K. Activating Akt and the brain’s resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol. Histopathol.* 2005; 20(1):299–315.
- [69] Chung S.W., Perrella M.A. Role of HO-1 in renoprotection: location, location, location. *Kidney Int.* 2004; 65(5):1968–1969.
- [70] Claireaux A.E., Cole P.G., Lathe G.H. Icterus of the brain in the newborn. *Lancet* 1953; 265(6798):1226–1230.
- [71] Clark J.E., Foresti R., Sarathchandra P., Kaur H., Green C.J., Motterlini R. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; 278(2):H643–H651.
- [72] Clark J.E., Naughton P., Shurey S., Green C.J., Johnson T.R., Mann B.E. et al. Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ. Res.* 2003; 93(2):e2–e8.
- [73] Coates P.J., Lorimore S.A., Wright E.G. Cell and tissue responses to genotoxic stress. *J. Pathol.* 2005; 205(2):221–235.
- [74] Coburn R.F., Mayers L.B. Myoglobin O₂ tension determined from measurement of carboxymyoglobin in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1971; 220(1):66–74.
- [75] Coburn R.F., Williams W.J., Kahn S.B. Endogenous carbon monoxide production in patients with hemolytic anemia. *J. Clin. Invest.* 1966; 45(4):460–468.
- [76] Converso D.P., Taille C., Carreras M.C., Jaitovich A., Poderoso J.J., Boczkowski J. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J.* 2006; 20(8):1236–1238.
- [77] Coughlan M.T., Cooper M.E., Forbes J.M. Renal microvascular injury in diabetes: RAGE and redox signaling. *Antioxid. Redox Signal* 2007; 9(3):331–342.
- [78] Coultas L., Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2003; 13(2):115–123.
- [79] Cross A.R., Higson F.K., Jones O.T., Harper A.M., Segal A.W. The enzymic reduction and kinetics of oxidation of cytochrome b-245 of neutrophils. *Biochem. J.* 1982; 204(2):479–485.
- [80] Cruse I., Maines M.D. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J. Biol. Chem.* 1988; 263(7):3348–3353.
- [81] Cuervo A.M. Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell Biochem.* 2004; 263(1–2):55–72.
- [82] da Silva J.L., Zand B.A., Yang L.M., Sabaawy H.E., Lianos E., Abraham N.G. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney. *Kidney Int.* 2001; 59(4):1448–1457.

- [83] Daemen M.A., de Vries B., Buurman W.A. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73(11):1693–1700.
- [84] Dagher P.C. Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53. *Kidney Int.* 2004; 66(2):506–509.
- [85] Datta P.K., Koukouritaki S.B., Hopp K.A., Lianos E.A. Heme oxygenase-1 induction attenuates inducible nitric oxide synthase expression and proteinuria in glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; 10(12):2540–2550.
- [86] Datta P.K., Lianos E.A. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 1999; 55(5):1734–1739.
- [87] Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91(2):231–241.
- [88] Davidson S.M., Duchon M.R. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circ. Res.* 2007; 100(8):1128–1141.
- [89] Dawson J.H. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science* 1988; 240:433–439.
- [90] De Broe M.E. Apoptosis in acute renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001; 16(suppl. 6):23–26.
- [91] Dedon P.C., Tannenbaum S.R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 423(1):12–22.
- [92] Dennery P.A., McDonagh A.F., Spitz D.R., Rodgers P.A., Stevenson D.K. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 19(4):395–404.
- [93] Derijard B., Raingeaud J., Barrett T., Wu I.H., Han J., Ulevitch R.J. et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995; 267(5198):682–685.
- [94] Detrenis S., Meschi M., Musini S., Savazzi G. Lights and shadows on the pathogenesis of contrast-induced nephropathy: state of the art. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20(8):1542–1550.
- [95] Devalaraja-Narashimha K., Singaravelu K., Padanilam B.J. Poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell injury in acute renal failure. *Pharmacol. Res.* 2005; 52(1):44–59.
- [96] Devarajan P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 2005; 17(2):193–199.
- [97] Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(6):1503–1520.
- [98] Di Noia M.A., Van D.S., Palmieri F., Yang L.M., Quan S., Goodman A.I. et al. Heme oxygenase-1 enhances renal mitochondrial transport carriers and cytochrome C oxidase activity in experimental diabetes. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(23):15687–15693.
- [99] Distelhorst C.W., Shore G.C. Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene* 2004; 23(16):2875–2880.
- [100] Donadio C., Tramonti G., Lucchesi A., Giordani R., Lucchetti A., Bianchi C. Tubular toxicity is the main renal effect of contrast media. *Ren. Fail.* 1996; 18(4):647–656.
- [101] Dore S., Takahashi M., Ferris C.D., Zakhary R., Hester L.D., Guastella D. et al. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96(5):2445–2450.
- [102] Doseff A.I. Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Dev.* 2004; 13(5):473–483.
- [103] Ducrocq C., Blanchard B., Pignatelli B., Ohshima H. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol. Life Sci.* 1999; 55(8–9):1068–1077.
- [104] Dummler B., Tschopp O., Hynx D., Yang Z.Z., Dirnhofer S., Hemmings B.A. Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol. Cell Biol.* 2006; 26(21):8042–8051.

- [105] Durante W., Johnson F.K., Johnson R.A. Role of carbon monoxide in cardiovascular function. *J. Cell Mol. Med.* 2006; 10(3):672–686.
- [106] Eddy A.A. Progression in chronic kidney disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 2005; 12(4):353–365.
- [107] Edelstein C.L. What is the role of tubular epithelial cell apoptosis in polycystic kidney disease (PKD)? *Cell Cycle* 2005; 4(11):1550–1554.
- [108] Eefting F., Rensing B., Wigman J., Pannekoek W.J., Liu W.M., Cramer M.J. et al. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 2004; 61(3):414–426.
- [109] Efeyan A., Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 2007; 6(9):1006–1010.
- [110] Eisenstein R.S., Garcia-Mayol D., Pettingell W., Munro H.N. Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88(3):688–692.
- [111] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007; 35(4):495–516.
- [112] Er E., Oliver L., Cartron P.F., Juin P., Manon S., Vallette F.M. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1757(9–10):1301–1311.
- [113] Erkan E., Devarajan P., Schwartz G.J. Mitochondria are the major targets in albumin-induced apoptosis in proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18(4):1199–1208.
- [114] Estabrook R.W., Franklin M.R., Hildebrandt A.G. Factors influencing the inhibitory effect of carbon monoxide on cytochrome P-450-catalyzed mixed function oxidation reactions. *Ann. NY Acad. Sci.* 1970; 174(1):218–232.
- [115] Ewing J.F., Haber S.N., Maines M.D. Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. *J. Neurochem.* 1992; 58(3):1140–1149.
- [116] Ewing J.F., Maines M.D. Histochemical localization of heme oxygenase-2 protein and mRNA expression in rat brain. *Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* 1997; 1(2):165–174.
- [117] Faubel S., Edelstein C.L. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2005; 5(3):269–287.
- [118] Fayard E., Tintignac L.A., Baudry A., Hemmings B.A. Protein kinase B/Akt at a glance. *J. Cell Sci.* 2005; 118(Pt 24):5675–5678.
- [119] Ferrario F., Rastaldi M.P. Histopathological atlas of renal diseases: diabetic nephropathy. *J. Nephrol.* 2006; 19(1):1–5.
- [120] Ferreri N.R., McGiff J.C., Carroll M.A., Quilley J. Renal COX-2, cytokines and 20-HETE: tubular and vascular mechanisms. *Curr. Pharm. Des.* 2004; 10(6):613–626.
- [121] Ferris C.D., Jaffrey S.R., Sawa A., Takahashi M., Brady S.D., Barrow R.K. et al. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat. Cell Biol.* 1999; 1(3):152–157.
- [122] Fioretto P., Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.* 2007; 27(2):195–207.
- [123] Forster R.E. Carbon monoxide and the partial pressure of oxygen in tissue. *Ann. NY Acad. Sci.* 1970; 174(1):233–241.
- [124] Fortuno M.A., Gonzalez A., Ravassa S., Lopez B., Diez J. Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 284(5):H1495–H1506.
- [125] Foy J.M., Salih A.K. Glomerular filtration rate and kidney blood flow in alloxan and streptozotocin diabetic rats. *Experientia* 1979; 35(8):1084–1086.
- [126] Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997; 88(4):435–437.
- [127] Frankenberg-Dinkel N. Bacterial heme oxygenases. *Antioxid. Redox Signal* 2004; 6(5):825–834.

- [128] Fresno Vara J.A., Casado E., de Castro J., Cejas P., Belda-Iniesta C., Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30(2):193–204.
- [129] Fridman J.S., Lowe S.W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22(56):9030–9040.
- [130] Frohlich K.U., Madeo F. Apoptosis in yeast – a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.* 2000; 473(1):6–9.
- [131] Fujimoto H., Ohno M., Ayabe S., Kobayashi H., Ishizaka N., Kimura H. et al. Carbon monoxide protects against cardiac ischemia – reperfusion injury in vivo via MAPK and Akt – eNOS pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24(10):1848–1853.
- [132] Gan L. Therapeutic potential of sirtuin-activating compounds in Alzheimer's disease. *Drug News Perspect.* 2007; 20(4):233–239.
- [133] Gandolfo M.T., Verzola D., Salvatore F., Gianiorio G., Procopio V., Romagnoli A. et al. Gender and the progression of chronic renal diseases: does apoptosis make the difference? *Minerva Urol. Nefrol.* 2004; 56(1):1–14.
- [134] Genesca M., Sola A., Hotter G. Actin cytoskeleton derangement induces apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Apoptosis* 2006; 11(4):563–571.
- [135] Giunti S., Barit D., Cooper M.E. Diabetic nephropathy: from mechanisms to rational therapies. *Minerva Med.* 2006; 97(3):241–262.
- [136] Giunti S., Barit D., Cooper M.E. Mechanisms of diabetic nephropathy: role of hypertension. *Hypertension* 2006; 48(4):519–526.
- [137] Goldblatt H., Lynch J., Hanzal R.F., Summerville W.W. Studies on experimental hypertension: production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 1934; 59:347–379.
- [138] Goligorsky M.S. Frontiers in nephrology: viewing the kidney through the heart – endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18(11):2833–2835.
- [139] Goncalves G.M., Cenedeze M.A., Feitoza C.Q., Wang P.M., Bertocchi A.P., Damiao M.J. et al. The role of heme oxygenase 1 in rapamycin-induced renal dysfunction after ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int.* 2006; 70(10):1742–1749.
- [140] Gonzalez-Michaca L., Farrugia G., Croatt A.J., Alam J., Nath K.A. Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2004; 286(2):F370–F377.
- [141] Goodman A.I., Chander P.N., Rezzani R., Schwartzman M.L., Regan R.F., Rodella L. et al. Heme oxygenase-2 deficiency contributes to diabetes-mediated increase in superoxide anion and renal dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(4):1073–1081.
- [142] Goodman A.I., Olszanecki R., Yang L.M., Quan S., Li M., Omura S. et al. Heme oxygenase-1 protects against radiocontrast-induced acute kidney injury by regulating anti-apoptotic proteins. *Kidney Int.* 2007; 72(8):945–953.
- [143] Green D.R. Life, death, BH3 profiles, and the salmon mousse. *Cancer Cell* 2007; 12(2):97–99.
- [144] Gunning M.E.I.J.R., King A.J., Brenner B.M. Vasoactive peptide and the kidney, in: Brenner B.M., ed. *The Kidney*. 5th ed., WB Saunders Co, Philadelphia 1996; 627–712.
- [145] Guo Y., Stein A.B., Wu W.J., Tan W., Zhu X., Li Q.H. et al. Administration of a CO-releasing molecule at the time of reperfusion reduces infarct size in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 286(5):H1649–H1653.
- [146] Gupta S., Das B., Sen S. Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal* 2007; 9(6):623–652.
- [147] Gustafsson A.B., Gottlieb R.A. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J. Clin. Immunol.* 2003; 23(6):447–459.
- [148] Gustafsson A.B., Gottlieb R.A. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292(1):C45–C51.

- [149] Hacker G., Weber A. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch. Biochem. Biophys.* 2007; 462(2):150–155.
- [150] Haeussler U., Riedel M., Keller F. Free reactive oxygen species and nephrotoxicity of contrast agents. *Kidney Blood Press. Res.* 2004; 27(3):167–171.
- [151] Haider A., Olszanecki R., Gryglewski R., Schwartzman M.L., Lianos E., Kappas A. et al. Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 300(1):188–194.
- [152] Hajnoczky G., Hoek J.B. Cell signaling. Mitochondrial longevity pathways. *Science* 2007; 315(5812):607–609.
- [153] Hall A.M., Unwin R.J. The not so ‘mighty chondrion’: emergence of renal diseases due to mitochondrial dysfunction. *Nephron. Physiol.* 2007; 105(1):1–10.
- [154] Hall Y.N., Chertow G.M. End stage renal disease. *Clin. Evid.* 2006; (15):1171–1181.
- [155] Han X., Ren D., Fan P., Shen T., Lou H. Protective effects of naringenin-7-O-glucoside on doxorubicin-induced apoptosis in H9C2 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 581(1–2):47–53.
- [156] Harris R.C. COX-2 and the kidney. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2006; 47(suppl. 1):S37–42.
- [157] Haugen E.N., Croatt A.J., Nath K.A. Angiotensin II induces renal oxidant stress in vivo and heme oxygenase-1 in vivo and in vitro. *Kidney Int.* 2000; 58(1):144–152.
- [158] Hausenloy D.J., Scorrano L. Targeting cell death. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007; 82(4):370–373.
- [159] Hawkins P.T., Anderson K.E., Davidson K., Stephens L.R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* 2006; 34(Pt 5):647–662.
- [160] Hayashi S., Omata Y., Sakamoto H., Higashimoto Y., Hara T., Sagara Y. et al. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004; 336(2):241–250.
- [161] Hennessy B.T., Smith D.L., Ram P.T., Lu Y., Mills G.B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005; 4(12):988–1004.
- [162] Henry-Mowatt J., Dive C., Martinou J.C., James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 2004; 23(16):2850–2860.
- [163] Heron-Milhavet L., Franckhauser C., Rana V., Berthenet C., Fisher D., Hemmings B.A. et al. Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol. Cell Biol.* 2006; 26(22):8267–8280.
- [164] Heyman S.N., Brezis M., Epstein F.H., Spokes K., Silva P., Rosen S. Early renal medullary hypoxic injury from radiocontrast and indomethacin. *Kidney Int.* 1991; 40(4):632–642.
- [165] Heyman S.N., Brezis M., Reubinoff C.A., Greenfeld Z., Lechene C., Epstein F.H. et al. Acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *J. Clin. Invest.* 1988; 82(2):401–412.
- [166] Hill-Kapturczak N., Chang S.H., Agarwal A. Heme oxygenase and the kidney. *DNA Cell Biol.* 2002; 21(4):307–321.
- [167] Hilton R. Acute renal failure. *BMJ* 2006; 333(7572):786–790.
- [168] Hinds M.G., Day C.L. Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005; 15(6):690–699.
- [169] Hizoh I., Haller C. Radiocontrast-induced renal tubular cell apoptosis: hypertonic versus oxidative stress. *Invest. Radiol.* 2002; 37(8):428–434.
- [170] Ho P.K., Hawkins C.J. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J.* 2005; 272(21):5436–5453.
- [171] Homsí E., Janino P., de Faria J.B. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 2006; 69(8):1385–1392.
- [172] Horbinski C., Chu C.T. Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38(1):2–11.
- [173] Hoy W.E., Hughson M.D., Bertram J.F., Douglas-Denton R., Amann K. Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16(9):2557–2564.

- [174] Hu S., Kincaid J.R. Resonance Raman studies of the carbonmonoxy form of catalase. Evidence for and effects of phenolate ligation. *FEBS Lett.* 1992; 314(3):293–296.
- [175] Hughes J., Savill J.S. Apoptosis in glomerulonephritis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2005; 14(4):389–395.
- [176] Inoue K., Takahashi T., Uehara K., Shimuzu H., Ido K., Morimatsu H. et al. Protective role of heme oxygenase 1 in the intestinal tissue injury in hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2007; Epub ahead of print.
- [177] Ishii T., Itoh K., Ruiz E., Leake D.S., Unoki H., Yamamoto M. et al. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ. Res.* 2004;94(5):609–616.
- [178] Ishikawa K., Sato M., Yoshida T. Expression of rat heme oxygenase in *Escherichia coli* as a catalytically active, full-length form that binds to bacterial membranes. *Eur. J. Biochem.* 1991; 202(1):161–165.
- [179] Ishikawa K., Sugawara D., Wang X., Suzuki K., Itabe H., Maruyama Y. et al. Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knockout mice. *Circ. Res.* 2001; 88(5):506–512.
- [180] Iwahara S., Satoh H., Song D.X., Webb J., Burlingame A.L., Nagae Y. et al. Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol. *Biochemistry* 1995; 34(41):13398–13406.
- [181] Jaggar J.H., Leffler C.W., Cheranov S.Y., Tcheranova D.E.S., Cheng X. Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca^{2+} sparks to Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Circ. Res.* 2002; 91(7):610–617.
- [182] Jang J.H., Surh Y.J. Bcl-2 attenuation of oxidative cell death is associated with up-regulation of gamma-glutamylcysteine ligase via constitutive NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(37):38779–38786.
- [183] Javadov S., Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol. Biochem.* 2007; 20(1–4):1–22.
- [184] Jeney V., Balla J., Yachie A., Varga Z., Vercellotti G.M., Eaton J.W. et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 2002; 100(3):879–887.
- [185] Jiang X., Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 2004; 73:87–106.
- [186] Jin Z., El Deiry W.S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 2005; 4(2):139–163.
- [187] Jo S.K., Rosner M.H., Okusa M.D. Pharmacologic treatment of acute kidney injury: why drugs haven't worked and what is on the horizon. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 2(2):356–365.
- [188] Juan S.H., Cheng T.H., Lin H.C., Chu Y.L., Lee W.S. Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 2005; 69(1):41–48.
- [189] Kadowaki H., Nishitoh H., Ichijo H. Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. *J. Chem. Neuroanat.* 2004; 28(1–2):93–100.
- [190] Kaide J.I., Zhang F., Wei Y., Jiang H., Yu C., Wang W.H. et al. Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J. Clin. Invest.* 2001; 107(9):1163–1171.
- [191] Kaminska M., Mogielnicki A., Stankiewicz A., Kramkowski K., Domaniewski T., Buczko W. et al. Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005; 56(4):571–585.
- [192] Kappas A. A method for interdicting the development of severe jaundice in newborns by inhibiting the production of bilirubin. *Pediatrics* 2004; 113(1 Pt 1):119–123.
- [193] Kaufmann T., Schinzel A., Borner C. Bcl-w(edding) with mitochondria. *Trends Cell Biol.* 2004; 14(1):8–12.

- [194] Kaur H., Hughes M.N., Green C.J., Naughton P., Foresti R., Motterlini R. Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Lett.* 2003; 543(1–3):113–119.
- [195] Kaushal G.P. Role of caspases in renal tubular epithelial cell injury. *Semin. Nephrol.* 2003; 23(5):425–431.
- [196] Kaushal G.P., Basnakian A.G., Shah S.V. Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004; 66(2):500–506.
- [197] Kawamura K., Ishikawa K., Wada Y., Kimura S., Matsumoto H., Kohro T. et al. Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25(1):155–160.
- [198] Ke B., Buelow R., Shen X.D., Melinek J., Amersi F., Gao F. et al. Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Hum. Gene Ther.* 2002; 13(10):1189–1199.
- [199] Ke B., Shen X.D., Tsuchihashi S., Gao F., Araujo J.A., Busuttill R.W. et al. Viral interleukin-10 gene transfer prevents liver ischemia-reperfusion injury: Toll-like receptor-4 and heme oxygenase-1 signaling in innate and adaptive immunity. *Hum. Gene Ther.* 2007; 18(4):355–366.
- [200] Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26(4):239–257.
- [201] Keyse S.M., Tyrrell R.M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86(1):99–103.
- [202] Kim H.A., Blanco F.J. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr. Drug Targets* 2007; 8(2):333–345.
- [203] Kim H.P., Wang X., Galbiati F., Ryter S.W., Choi A.M. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J.* 2004; 18(10):1080–1089.
- [204] Kim J.H., Yang J.I., Jung M.H., Hwa J.S., Kang K.R., Park D.J. et al. Heme oxygenase-1 protects rat kidney from ureteral obstruction via an antiapoptotic pathway. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(5):1373–1381.
- [205] Kim R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 333(2):336–343.
- [206] Kim R., Emi M., Tanabe K., Murakami S., Uchida Y., Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J. Pathol.* 2006; 208(3):319–326.
- [207] Kitamura Y., Ishida Y., Takata K., Mizutani H., Kakimura J., Inden M. et al. Hyperbilirubinemia protects against focal ischemia in rats. *J. Neurosci. Res.* 2003; 71(4):544–550.
- [208] Kmita H., Stobienia O. [The VDAC channel as the mitochondria function regulator]. *Postepy Biochem.* 2006; 52(2):129–136.
- [209] Koizumi S. Human heme oxygenase-1 deficiency: a lesson on serendipity in the discovery of the novel disease. *Pediatr. Int.* 2007; 49(2):125–132.
- [210] Koizumi T., Negishi M., Ichikawa A. Induction of heme oxygenase by delta 12-prostaglandin J2 in porcine aortic endothelial cells. *Prostaglandins* 1992; 43(2):121–131.
- [211] Kopyt N.P. Slowing progression along the renal disease continuum. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 2005; 105(4):207–215.
- [212] Kopyt N.P. Chronic kidney disease: the new silent killer. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 2006; 106(3):133–136.
- [213] Kozma F., Johnson R.A., Zhang F., Yu C., Tong X., Nasjletti A. Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels. *Am. J. Physiol.* 1999; 276(4 Pt 2):R1087–R1094.
- [214] Kramkowski K., Mogielnicki A., Buczko W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 57(4):529–539.
- [215] Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 2007; 87(1):99–163.

- [216] Kronke G., Kadl A., Ikonomu E., Bluml S., Furnkranz A., Sarembock I.J. et al. Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27(6):1276–1282.
- [217] Kukhta V.K., Marozkina N.V., Sokolchik I.G., Bogaturova E.V. Molecular mechanisms of apoptosis. *Ukr. Biokhim. Zh.* 2003; 75(6):5–9.
- [218] Kumar D., Zimpelmann J., Robertson S., Burns K.D. Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney. *Nephron. Exp. Nephrol.* 2004; 96(3):e77–e88.
- [219] Kumar S., Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* 2005; 157(3):175–188.
- [220] Kumar S., Walia V., Ray M., Elble R.C. p53 in breast cancer: mutation and countermeasures. *Front. Biosci.* 2007; 12:4168–4178.
- [221] Kutty R.K., Nagineni C.N., Kutty G., Hooks J.J., Chader G.J., Wiggert B. Increased expression of heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells by transforming growth factor-beta. *J. Cell Physiol.* 1994; 159(2):371–378.
- [222] Kutuk O., Basaga H. Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis* 2006; 11(10):1661–1675.
- [223] Lameire N.H., Vanholder R. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 2004; 18(1):21–36.
- [224] Larson T.S., Hudson K., Mertz J.I., Romero J.C., Knox F.G. Renal vasoconstrictive response to contrast medium. The role of sodium balance and the renin-angiotensin system. *J. Lab. Clin. Med.* 1983; 101(3):385–391.
- [225] Lederer E., Ouseph R. Chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2007; 49(1):162–171.
- [226] Lee B.C. Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol. Microbiol.* 1995; 18(3):383–390.
- [227] Lee H.B., Seo J.Y., Yu M.R., Uh S.T., Ha H. Radical approach to diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* 2007; 106:S67–S70.
- [228] Lee P.J., Jiang B.H., Chin B.Y., Iyer N.V., Alam J., Semenza G.L. et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(9):5375–5381.
- [229] Lee S.C., Pervaiz S. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39(3):497–504.
- [230] Lee T.S., Chau L.Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat. Med.* 2002; 8(3):240–246.
- [231] Leenen F.H.H., Myers M.G. Handbook of hypertension, Volume 4: experimental and genetic models of hypertension. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers BV; 1984: 25–53.
- [232] Leever S.J., McNeill H. Controlling the size of organs and organisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005; 17(6):604–609.
- [233] Leffler C.W., Nasjletti A., Yu C., Johnson R.A., Fedinec A.L., Walker N. Carbon monoxide and cerebral microvascular tone in newborn pigs. *Am. J. Physiol.* 1999; 276(5 Pt 2):H1641–H1646.
- [234] Levey A.S., Andreoli S.P., DuBose T., Provenzano R., Collins A.J. Chronic kidney disease: common, harmful and treatable – World Kidney Day 2007. *Am. J. Nephrol.* 2007; 27(1):108–112.
- [235] Li M.H., Jang J.H., Na H.K., Cha Y.N., Surh Y.J. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 in response to nitrosative stress induces expression of glutamate-cysteine ligase in PC12 cells via activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Nrf2 signaling. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(39):28577–28586.
- [236] Li V.G., Ientile R., Abraham N.G., Vanella A., Cannavo G., Mazza F. et al. Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: effect of glutamate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 315(2):517–524.

- [237] Li X., Clark J.D. Heme oxygenase type 2 participates in the development of chronic inflammatory and neuropathic pain. *J. Pain* 2003; 4(2):101–107.
- [238] Lippard S.J., Berg J.M. *Podstawy chemii bionieorganicznej*. Warszawa 1998, Wydawnictwo Naukowe PWN.
- [239] Little M.H. Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(9):2390–2401.
- [240] Liu H., Mount D.B., Nasjletti A., Wang W. Carbon monoxide stimulates the apical 70-pS K⁺ channel of the rat thick ascending limb. *J. Clin. Invest.* 1999; 103(7):963–970.
- [241] Liu K.D. Molecular mechanisms of recovery from acute renal failure. *Crit. Care Med.* 2003; 31(8 Suppl):S572–S581.
- [242] Liu X., Wei J., Peng D.H., Layne M.D., Yet S.F. Absence of heme oxygenase-1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice. *Diabetes* 2005; 54(3):778–784.
- [243] Locatelli F., Pozzoni P., Del Vecchio L. Renal manifestations in the metabolic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(4 Suppl 2):S81–S85.
- [244] Lockshin R.A., Williams C.M. Programmed cell death – i. cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J. Insect. Physiol.* 1965; 11:123–133.
- [245] Loftus L., Cuppage F.E., Hoogstraten B. Clinical and pathological effects of streptozotocin. *J. Lab. Clin. Med.* 1974; 84(3):407–413.
- [246] Lorz C., Benito-Martin A., Justo P., Sanz A.B., Sanchez-Nino M.D., Santamaria B. et al. Modulation of renal tubular cell survival: where is the evidence? *Curr. Med. Chem.* 2006; 13(4):449–454.
- [247] Lossi L., Cantile C., Tamagno I., Merighi A. Apoptosis in the mammalian CNS: Lessons from animal models. *Vet. J.* 2005; 170(1):52–66.
- [248] Ma N., Ding X., Doi M., Izumi N., Semba R. Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina. *J. Neurocytol.* 2004; 33(4):407–415.
- [249] Maddika S., Ande S.R., Panigrahi S., Paranjothy T., Weglarczyk K., Zuse A. et al. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* 2007; 10(1–2):13–29.
- [250] Maines M.D. The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 2000; 46(3):573–585.
- [251] Maines M.D. Bile pigments: newcomers to the cell signaling arena. *Toxicol. Sci.* 2003; 71(1):9–10.
- [252] Maines M.D., Ewing J.F. Stress response of the rat testis: in situ hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia. *Biol. Reprod.* 1996; 54(5):1070–1079.
- [253] Maines M.D., Kappas A. Metals as regulators of heme metabolism. *Science* 1977; 198(4323):1215–1221.
- [254] Maines M.D., Trakshel G.M., Kutty R.K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* 1986; 261(1):411–419.
- [255] Mancuso C., Pani G., Calabrese V. Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species. *Redox Rep.* 2006; 11(5):207–213.
- [256] Mancuso C., Preziosi P., Grossman A.B., Navarra P. The role of carbon monoxide in the regulation of neuroendocrine function. *Neuroimmunomodulation* 1997; 4(5–6):225–229.
- [257] Marks G.S., Brien J.F., Nakatsu K. What role does the heme – heme oxygenase – carbon monoxide system play in vasoregulation? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; 285(3):R522–R523.
- [258] Marshall C.B., Shankland S.J. Cell cycle and glomerular disease: a minireview. *Nephron Exp. Nephrol.* 2006; 102(2):e39–e48.
- [259] Martin D.A., Elkon K.B. Mechanisms of apoptosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2004; 30(3):441–454, vii.

- [260] McBride H.M., Neuspiel M., Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 2006; 16(14):R551–R560.
- [261] McCord J.M., Omar B.A. Sources of free radicals. *Toxicol Ind Health* 1993; 9(1–2):23–37.
- [262] McCoubrey W.K. Jr., Huang T.J., Maines M.D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* 1997; 247(2):725–732.
- [263] McGrath J.J., Smith D.L. Response of rat coronary circulation to carbon monoxide and nitrogen hypoxia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1984; 177(1):132–136.
- [264] McMillin J.B., Dowhan W. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1585(2–3):97–107.
- [265] Meyer T.W., Hostetter T.H. Uremia. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357(13):1316–1325.
- [266] Michlewska S., McColl A., Rossi A.G., Megson I.L., Dransfield I. Clearance of dying cells and autoimmunity. *Autoimmunity* 2007; 40(4):267–273.
- [267] Migita C.T., Zhang X., Yoshida T. Expression and characterization of cyanobacterium heme oxygenase, a key enzyme in the phycobilin synthesis. Properties of the heme complex of recombinant active enzyme. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270(4):687–698.
- [268] Miksche L.W., Miksche U., Gross F. Effect of sodium restriction on renal hypertension and on renin activity in the rat. *Circ. Res.* 1970; 27(6):973–984.
- [269] Minamino T., Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ. Res.* 2007; 100(1):15–26.
- [270] Mircescu G. Oxidative stress: an accomplice to uremic toxicity? *J. Ren. Nutr.* 2006; 16(3):194–198.
- [271] Mitra P.K., Tasker P.R., Ell M.S. Chronic kidney disease. *BMJ* 2007; 334(7606):1273.
- [272] Mogielnicki A., Chabielska E., Pawlak R., Szemraj J., Buczek W. Angiotensin II enhances thrombosis development in renovascular hypertensive rats. *Thromb. Haemost.* 2005; 93(6):1069–1076.
- [273] Morita T., Mitsialis S.A., Koike H., Liu Y., Kourembanas S. Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(52):32804–32809.
- [274] Morita T., Perrella M.A., Lee M.E., Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92(5):1475–1479.
- [275] Morse D., Pischke S.E., Zhou Z., Davis R.J., Flavell R.A., Loop T. et al. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(39):36993–36998.
- [276] Mosley K., Wembridge D.E., Cattell V., Cook H.T. Heme oxygenase is induced in nephrotoxic nephritis and heme, a stimulator of heme oxygenase synthesis, ameliorates disease. *Kidney Int.* 1998; 53(3):672–678.
- [277] Motterlini R., Clark J.E., Foresti R., Sarathchandra P., Mann B.E., Green C.J. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ. Res.* 2002; 90(2):E17–E24.
- [278] Motterlini R., Foresti R., Bassi R., Green C.J. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28(8):1303–1312.
- [279] Muller-Eberhard U. Hemopexin. *Methods Enzymol.* 1988; 163:536–565.
- [280] Muramoto T., Tsurui N., Terry M.J., Yokota A., Kohchi T. Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis. *Plant Physiol.* 2002; 130(4):1958–1966.
- [281] Muresanu D.F. Neuroprotection and neuroplasticity – a holistic approach and future perspectives. *J. Neurol. Sci.* 2007; 257(1–2):38–43.

- [282] Murray R.K. Porphyrins & bile pigments, in: „Harper’s illustrated biochemistry”, 27th edition, McGraw-Hill 2006; 279–294.
- [283] Nakao A., Neto J.S., Kanno S., Stolz D.B., Kimizuka K., Liu F. et al. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am. J. Transplant.* 2005; 5(2):282–291.
- [284] Nangaku M. Hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *Nephron Exp. Nephrol.* 2004; 98(1):e8–12.
- [285] Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(1):17–25.
- [286] Nath K.A. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney Int.* 2006; 70(3):432–443.
- [287] Nath K.A., Balla G., Vercellotti G.M., Balla J., Jacob H.S., Levitt M.D. et al. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J. Clin. Invest.* 1992; 90(1):267–270.
- [288] Nath K.A., Grande J.P., Haggard J.J., Croatt A.J., Katusic Z.S., Solovey A. et al. Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease. *Am. J. Pathol.* 2001; 158(3):893–903.
- [289] Nath K.A., Haggard J.J., Croatt A.J., Grande J.P., Poss K.D., Alam J. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am. J. Pathol.* 2000; 156(5):1527–1535.
- [290] Nath K.A., Vercellotti G.M., Grande J.P., Miyoshi H., Paya C.V., Manivel J.C. et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int.* 2001; 59(1):106–117.
- [291] Navratil J.S., Liu C.C., Ahearn J.M. Apoptosis and autoimmunity. *Immunol. Res.* 2006; 36(1–3):3–12.
- [292] Ndisang J.F., Tabien H.E., Wang R. Carbon monoxide and hypertension. *J. Hypertens.* 2004; 22(6):1057–1074.
- [293] Neuzil J., Stocker R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* 1993; 331(3):281–284.
- [294] Neuzil J., Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(24):16712–16719.
- [295] Nikolsky E., Mehran R. Understanding the consequences of contrast-induced nephropathy. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2003; 4(suppl. 5):S10–8.
- [296] Nishikawa T., Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid. Redox. Signal* 2007; 9(3):343–353.
- [297] Noguchi M., Yoshida T., Kikuchi G. A stoichiometric study of heme degradation catalyzed by the reconstituted heme oxygenase system with special consideration of the production of hydrogen peroxide during the reaction. *J. Biochem. (Tokyo)* 1983; 93(4):1027–1036.
- [298] Nomura K., Imai H., Koumura T., Nakagawa Y. Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor. *Biol. Signals Recept.* 2001; 10(1–2):81–92.
- [299] Ny L., Alm P., Ekstrom P., Larsson B., Grundemar L., Andersson K.E. Localization and activity of haem oxygenase and functional effects of carbon monoxide in the feline lower oesophageal sphincter. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 118(2):392–399.
- [300] Ohta K., Yachie A., Fujimoto K., Kaneda H., Wada T., Toma T. et al. Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency. *Am. J. Kidney Dis.* 2000; 35(5):863–870.
- [301] Olszanecki R., Rezzani R., Omura S., Stec D.E., Rodella L., Botros F.T. et al. Genetic suppression of HO-1 exacerbates renal damage: reversed by an increase in the antiapoptotic signaling pathway. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2007; 292(1):F148–F157.

- [302] Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 47:143–183.
- [303] Ortiz A., Justo P., Sanz A., Lorz C., Egidio J. Targeting apoptosis in acute tubular injury. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66(8):1589–1594.
- [304] Ott M., Robertson J.D., Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99(3):1259–1263.
- [305] Otterbein L.E., Bach F.H., Alam J., Soares M., Tao L.H., Wysk M. et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen- activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 2000; 6(4):422–428.
- [306] Otterbein L.E., Choi A.M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 279(6):L1029–L1037.
- [307] Otterbein L.E., Zuckerbraun B.S., Haga M., Liu F., Song R., Usheva A. et al. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat. Med.* 2003; 9(2):183–190.
- [308] Oudemans-van Straaten H.M. Contrast nephropathy, pathophysiology and prevention. *Int. J. Artif. Organs* 2004; 27(12):1054–1065.
- [309] Padanilam B.J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2003; 284(4):F608–F627.
- [310] Padanilam B.J., Lewington A.J. Molecular mechanisms of cell death and regeneration in acute ischemic renal injury. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1999; 8(1):15–19.
- [311] Parcellier A., Tintignac L.A., Zhuravleva E., Hemmings B.A. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal* 2007; Epub ahead of print.
- [312] Parmar M.S. Chronic renal disease. *BMJ* 2002; 325(7355):85–90.
- [313] Pendrak M.L., Yan S.S., Roberts D.D. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 426(2):148–156.
- [314] Persson P.B., Tepel M. Contrast medium-induced nephropathy: the pathophysiology. *Kidney Int. Suppl.* 2006; 100:S8–10.
- [315] Petrache I., Otterbein L.E., Alam J., Wiegand G.W., Choi A.M. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 278(2):L312–L319.
- [316] Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J. Cell Mol. Med.* 2004; 8(4):432–444.
- [317] Piantadosi C.A. Biological chemistry of carbon monoxide. *Antioxid. Redox Signal* 2002; 4(2):259–270.
- [318] Piantadosi C.A., Zhang J., Levin E.D., Folz R.J., Schmechel D.E. Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat. *Exp. Neurol.* 1997; 147(1):103–114.
- [319] Pierce J.D., Pierce J., Stremming S., Fakhari M., Clancy R.L. The role of apoptosis in respiratory diseases. *Clin. Nurse Spec.* 2007; 21(1):22–28.
- [320] Pileggi A., Molano R.D., Berney T., Cattani P., Vizzardelli C., Oliver R. et al. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes* 2001; 50(9):1983–1991.
- [321] Pimstone N.R., Engel P., Tenhunen R., Seitz P.T., Marver H.S., Schmid R. Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism. *J. Clin. Invest.* 1971; 50(10):2042–2050.
- [322] Pimstone N.R., Tenhunen R., Seitz P.T., Marver H.S., Schmid R. The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages. *J. Exp. Med.* 1971; 133(6):1264–1281.
- [323] Podhorska-Okolow M., Dziegiel P., Gomulkiewicz A., Kisiela D., Dolinska-Krajewska B., Jethon Z. et al. Exercise-induced apoptosis in rat kidney is mediated by both angiotensin II AT1 and AT2 receptors. *Histol. Histopathol.* 2006; 21(5):459–466.

- [324] Pommier Y., Sordet O., Antony S., Hayward R.L., Kohn K.W. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 2004; 23(16):2934–2949.
- [325] Ponka P. Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.* 1999; 318(4):241–256.
- [326] Poss K.D., Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94(20):10919–10924.
- [327] Poss K.D., Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase-1 deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:10925–10930.
- [328] Prasad K.V., Prabhakar B.S. Apoptosis and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 2003; 36(6–7):323–330.
- [329] Prieto M., Dipp S., Meleg-Smith S., El-Dahr S.S. Ureteric bud derivatives express angiotensinogen and AT1 receptors. *Physiol. Genomics* 2001; 6(1):29–37.
- [330] Quan S., Yang L., Abraham N.G., Kappas A. Regulation of human heme oxygenase in endothelial cells by using sense and antisense retroviral constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98:12203–12208.
- [331] Quan S., Yang L., Shnouda S., Schwartzman M.L., Nasjletti A., Goodman A.I. et al. Expression of human heme oxygenase-1 in the thick ascending limb attenuates angiotensin II-mediated increase in oxidative injury. *Kidney Int.* 2004; 65(5):1628–1639.
- [332] Raingeaud J., Whitmarsh A.J., Barrett T., Derijard B., Davis R.J. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* 1996; 16(3):1247–1255.
- [333] Raju V.S., Maines M.D. Renal ischemia/reperfusion up-regulates heme oxygenase-1 (HSP32) expression and increases cGMP in rat heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 277(3):1814–1822.
- [334] Ratliff M., Zhu W., Deshmukh R., Wilks A., Stojiljkovic I. Homologues of neisserial heme oxygenase in gram-negative bacteria: degradation of heme by the product of the pigA gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2001; 183(21):6394–6403.
- [335] Redondo-Horcajo M., Lamas S. Oxidative and nitrosative stress in kidney disease: a case for cyclosporine A. *J. Nephrol.* 2005; 18(4):453–457.
- [336] Remuzzi G., Benigni A., Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(2):288–296.
- [337] Rickwood D., Graham J.M. *Biological Centrifugation*. Springer Verlag, 2001.
- [338] Robey R.B., Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* 2006; 25(34):4683–4696.
- [339] Roset R., Ortet L., Gil-Gomez G. Role of Bcl-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice. *Front Biosci.* 2007; 12:4722–4730.
- [340] Roucou X., Antonsson B., Martinou J.C. Involvement of mitochondria in apoptosis. *Cardiol. Clin.* 2001; 19(1):45–55.
- [341] Rupinder S.K., Gurpreet A.K., Manjeet S. Cell suicide and caspases. *Vascul. Pharmacol.* 2007; 46(6):383–393.
- [342] Rutkowski P., Malgorzewicz S., Slominska E., Renke M., Lysiak-Szydłowska W., Swierczynski J. et al. Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. *J. Ren. Nutr.* 2006; 16(3):190–193.
- [343] Ryter S.W., Alam J., Choi A.M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* 2006; 86(2):583–650.
- [344] Ryter S.W., Kim H.P., Hoetzel A., Park J.W., Nakahira K., Wang X. et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal* 2007; 9(1):49–89.
- [345] Ryter S.W., Kvam E., Tyrrell R.M. Heme oxygenase activity. Current methods and applications. *Methods Mol. Biol.* 2000; 99:369–391.
- [346] Ryter S.W., Otterbein L.E. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 2004; 26(3):270–280.

- [347] Sadoff L. Nephrotoxicity of streptozotocin (NSC-85998). *Cancer Chemother. Rep.* 1970; 54(6):457–459.
- [348] Saikumar P., Venkatachalam M.A. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin. Nephrol.* 2003; 23(6):511–521.
- [349] Salvesen G.S., Abrams J.M. Caspase activation – stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* 2004; 23(16):2774–2784.
- [350] Sarady J.K., Otterbein S.L., Liu F., Otterbein L.E., Choi A.M. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 27(6):739–745.
- [351] Sarafidis P.A., Whaley-Connell A., Sowers J.R., Bakris G.L. Cardiometabolic syndrome and chronic kidney disease: what is the link? *J. Cardiometab. Syndr.* 2006; 1(1):58–65.
- [352] Sardana M.K., Kappas A. Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84(8):2464–2468.
- [353] Sato K., Balla J., Otterbein L., Smith R.N., Brouard S., Lin Y. et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J. Immunol.* 2001; 166(6):4185–4194.
- [354] Satriano J. Kidney growth, hypertrophy and the unifying mechanism of diabetic complications. *Amino Acids* 2007; 33(2):331–339.
- [355] Schinzel A., Kaufmann T., Borner C. Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1644(2–3):95–105.
- [356] Schwertner H.A., Jackson W.G., Tolan G. Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clin. Chem.* 1994; 40(1):18–23.
- [357] Selivanova G. p53: fighting cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 2004; 4(5):385–402.
- [358] Shah S.V., Baliga R., Rajapurkar M., Fonseca V.A. Oxidants in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18(1):16–28.
- [359] Shi Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 2004; 117(7):855–858.
- [360] Shibahara S., Sato M., Muller R.M., Yoshida T. Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter. *Eur. J. Biochem.* 1989; 179(3):557–563.
- [361] Shivapurkar N., Reddy J., Chaudhary P.M., Gazdar A.F. Apoptosis and lung cancer: a review. *J. Cell Biochem.* 2003; 88(5):885–898.
- [362] Sikorski E.M., Hock T., Hill-Kapturczak N., Agarwal A. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2004; 286(3):F425–F441.
- [363] Singh K.K. Mitochondria damage checkpoint in apoptosis and genome stability. *FEMS Yeast Res.* 2004; 5(2):127–132.
- [364] Singh R., Singh A.K., Leehey D.J. A novel mechanism for angiotensin II formation in streptozotocin-diabetic rat glomeruli. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2005; 288(6):F1183–F1190.
- [365] Sjostrand T. The in vitro formation and disposal of carbon monoxide in blood. *Nature* 1951; 168(4278):729–730.
- [366] Sjostrand T. The formation of carbon monoxide by the decomposition of haemoglobin in vivo. *Acta Physiol. Scand.* 1952; 26(4):338–344.
- [367] Snyder S.H., Jaffrey S.R., Zakhary R. Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1998; 26(2–3):167–175.
- [368] Soares M.P., Seldon M.P., Gregoire I.P., Vassilevskaia T., Berberat P.O., Yu J. et al. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J. Immunol.* 2004; 172(6):3553–3563.

- [369] Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 1999; 11(3):431–444.
- [370] Song G., Ouyang G., Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell Mol. Med.* 2005; 9(1):59–71.
- [371] Song R., Mahidhara R.S., Zhou Z., Hoffman R.A., Seol D.W., Flavell R.A. et al. Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J. Immunol.* 2004; 172(2):1220–1226.
- [372] Song R., Ning W., Liu F., Ameredes B.T., Calhoun W.J., Otterbein L.E. et al. Regulation of IL-1beta -induced GM-CSF production in human airway smooth muscle cells by carbon monoxide. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2003; 284(1):L50–L56.
- [373] Song R., Zhou Z., Kim P.K., Shapiro R.A., Liu F., Ferran C. et al. Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(43):44327–44334.
- [374] Stein J.H., Fried T.A. Experimental models of nephrotoxic acute renal failure. *Transplant. Proc.* 1985; 17(4 Suppl 1):72–80.
- [375] Stephens L., Williams R., Hawkins P. Phosphoinositide 3-kinases as drug targets in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2005; 5(4):357–365.
- [376] Stevens B., Small R.D. Jr. The photoperoxidation of unsaturated organic molecules – XV. O₂Delta g quenching by bilirubin and biliverdin. *Photochem. Photobiol.* 1976; 23(1):33–36.
- [377] Stevens C.F., Wang Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase. *Nature* 1993; 364(6433):147–149.
- [378] Stewart R.D. The effect of carbon monoxide on humans. *Annu. Rev. Pharmacol.* 1975; 15:409–423.
- [379] Stocker R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic. Res. Commun.* 1990; 9(2):101–112.
- [380] Stocker R., Glazer A.N., Ames B.N. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84(16):5918–5922.
- [381] Stocker R., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. *Methods Enzymol.* 1990; 186:301–309.
- [382] Stocker R., Peterhans E. Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin: biologically relevant scavenging of hypochlorous acid. *Free Radic. Res. Commun.* 1989; 6(1):57–66.
- [383] Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235(4792):1043–1046.
- [384] Stone J.R., Marletta M.A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994; 33(18):5636–5640.
- [385] Storz P. Mitochondrial ROS – radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol.* 2007; 17(1):13–18.
- [386] Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 2000; 69:217–245.
- [387] Suesatsu M., Kashiwagi S., Sano T., Goda N., Shinoda Y., Ishimura Y. Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 205:1333–1337.
- [388] Sun M.H., Pang J.H., Chen S.L., Kuo P.C., Chen K.J., Kao L.Y. et al. Photoreceptor Protection against Light Damage by AAV-Mediated Overexpression of Heme Oxygenase-1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48(12):5699–5707.
- [389] Szewczyk A., Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol. Rev.* 2002; 54(1):101–127.

- [390] Taille C., El Benna J., Lanone S., Boczkowski J., Motterlini R. Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(27):25350–25360.
- [391] Taille C., El Benna J., Lanone S., Dang M.C., Ogier-Denis E., Aubier M. et al. Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(27):28681–28688.
- [392] Takahashi T., Morita K., Akagi R., Sassa S. Protective role of heme oxygenase-1 in renal ischemia. *Antioxid. Redox Signal* 2004; 6(5):867–877.
- [393] Takahashi T., Shimizu H., Morimatsu H., Inoue K., Akagi R., Morita K. et al. Heme oxygenase-1: a fundamental guardian against oxidative tissue injuries in acute inflammation. *Mini. Rev. Med. Chem.* 2007; 7(7):745–753.
- [394] Takayama S., Reed J.C., Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 2003; 22(56):9041–9047.
- [395] Talafant E. Bile pigment-phospholipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1971; 231(2):394–398.
- [396] Tamura J., Konno A., Hashimoto Y., Kon Y. Upregulation of renal renin-angiotensin system in mouse diabetic nephropathy. *Jpn. J. Vet. Res.* 2005; 53(1–2):13–26.
- [397] Tauskela J.S. MitoQ – a mitochondria-targeted antioxidant. *IDrugs* 2007; 10(6):399–412.
- [398] Tenhunen R., Marver H.S., Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 1969; 244(23):6388–6394.
- [399] Terry C.M., Clikeman J.A., Hoidal J.R., Callahan K.S. Effect of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 α on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1998; 274(3 Pt 2):H883–H891.
- [400] Thom S.R., Fisher D., Xu Y.A., Notarfrancesco K., Ischiropoulos H. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97(3):1305–1310.
- [401] Thompson J.E., Thompson C.B. Putting the rap on Akt. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22(20):4217–4226.
- [402] Thompson L.V. Oxidative stress, mitochondria and mtDNA-mutator mice. *Exp. Gerontol.* 2006; 41(12):1220–1222.
- [403] Thorup C., Jones C.L., Gross S.S., Moore L.C., Goligorsky M.S. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am. J. Physiol.* 1999; 277(6 Pt 2):F882–F889.
- [404] Tittel J.N., Steller H. A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol.* 2000; 1(3):REVIEWS0003.
- [405] Tracz M.J., Alam J., Nath K.A. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18(2):414–420.
- [406] Trakshel G.M., Ewing J.F., Maines M.D. Heterogeneity of haem oxygenase 1 and 2 isoenzymes. Rat and primate transcripts for isoenzyme 2 differ in number and size. *Biochem. J.* 1991; 275(Pt 1):159–164.
- [407] Trakshel G.M., Kutty R.K., Maines M.D. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J. Biol. Chem.* 1986; 261(24):11131–11137.
- [408] Tspiranlis G. Is inflammation the link between atherosclerosis and vascular calcification in chronic kidney disease? *Blood Purif.* 2007; 25(2):179–182.
- [409] Tu C.F., Kuo C.H., Juang J.H. Effects of heme oxygenase-1 transgenic islets on transplantation. *Transplant. Proc.* 2005; 37(8):3463–3467.
- [410] Ueda N., Kaushal G.P., Shah S.V. Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *Am. J. Med.* 2000; 108(5):403–415.
- [411] Unno M., Matsui T., Ikeda-Saito M. Structure and catalytic mechanism of heme oxygenase. *Nat. Prod. Rep.* 2007; 24(3):553–570.

- [412] Van Biesen W., Vanholder R., Lameire N. Defining acute renal failure: RIFLE and beyond. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 1(6):1314–1319.
- [413] Vander Heiden M.G., Thompson C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.* 1999; 1(8):E209–E216.
- [414] Vercellotti G.M., Balla G., Balla J., Nath K., Eaton J.W., Jacob H.S. Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 1994; 22(2):207–213.
- [415] Versteilen A.M., Di Maggio F., Leemreis J.R., Groeneveld A.B., Musters R.J., Sipkema P. Molecular mechanisms of acute renal failure following ischemia/reperfusion. *Int. J. Artif. Organs* 2004; 27(12):1019–1029.
- [416] Vogt B.A., Shanley T.P., Croatt A., Alam J., Johnson K.J., Nath K.A. Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury. *J. Clin. Invest.* 1996; 98(9):2139–2145.
- [417] Wagener F.A., da Silva J.L., Farley T., de Witte T., Kappas A., Abraham N.G. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 291(1):416–423.
- [418] Wagener F.A., Volk H.D., Willis D., Abraham N.G., Soares M.P., Adema G.J. et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55(3):551–571.
- [419] Wagner M., Cadetg P., Ruf R., Mazzucchelli L., Ferrari P., Redaelli C.A. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int.* 2003; 63(4):1564–1573.
- [420] Wang G., Reed E., Li Q.Q. Apoptosis in prostate cancer: progressive and therapeutic implications (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2004; 14(1):23–34.
- [421] Wang H.D., Yamaya M., Okinaga S., Jia Y.X., Kamanaka M., Takahashi H. et al. Bilirubin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 165(3):406–411.
- [422] Wang R. Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1998; 76(1):1–15.
- [423] Wang R., Wang Z., Wu L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 121(5):927–934.
- [424] Wang R., Wu L. The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:8222–8226.
- [425] Wang W.W., Smith D.L., Zucker S.D. Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats. *Hepatology* 2004; 40(2):424–433.
- [426] Wang X., Wang Y., Kim H.P., Nakahira K., Ryter S.W., Choi A.M. Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(3):1718–1726.
- [427] Wardle E.N. Mesangial cell dysfunction detected by accumulation of aggregated protein in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biomedicine* 1975; 23(8):299–302.
- [428] Watson S., Cailhier J.F., Hughes J., Savill J. Apoptosis and glomerulonephritis. *Curr. Dir. Autoimmun.* 2006; 9:188–204.
- [429] Wegele R., Tasler R., Zeng Y., Rivera M., Frankenberg-Dinkel N. The heme oxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(44):45791–45802.
- [430] Weil R. III, Nozawa M., Koss M., Weber C., Reemtsma K., McIntosh R. The kidney in streptozotocin diabetic rats. Morphologic, ultrastructural, and function studies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1976; 100(1):37–49.
- [431] Weiss R.B. Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat. Rep.* 1982; 66(3):427–438.
- [432] Wesche-Soldato D.E., Swan R.Z., Chung C.S., Ayala A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr. Drug Targets* 2007; 8(4):493–500.

- [433] Wieckowski M.R., Brdiczka D., Wojtczak L. Long-chain fatty acids promote opening of the reconstituted mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett.* 2000; 484(2):61–64.
- [434] Wiesel P., Patel A.P., Carvajal I.M., Wang Z.Y., Pellacani A., Maemura K. et al. Exacerbation of chronic renovascular hypertension and acute renal failure in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circ. Res.* 2001; 88(10):1088–1094.
- [435] Wilks A. Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxid. Redox Signal* 2002; 4(4):603–614.
- [436] Willis S., Day C.L., Hinds M.G., Huang D.C. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J. Cell Sci.* 2003; 116:4053–4056.
- [437] Wohlrab H., Ogunmola G.B. Carbon monoxide binding studies of cytochrome a3 hemes in intact rat liver mitochondria. *Biochemistry* 1971; 10(7):1103–1106.
- [438] Wojtczak L. Two faces of cytochrome c. *Postepy Biochem.* 2006; 52(2):122–128.
- [439] Wojtczak L., Wieckowski M.R. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999; 31(5):447–455.
- [440] Wolf G., Ziyadeh F.N. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron. Physiol.* 2007; 106(2):26–31.
- [441] Worthington M.T., Cohn S.M., Miller S.K., Luo R.Q., Berg C.L. Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001; 280(6):G1172–G1177.
- [442] Wu L., Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol. Rev.* 2005; 57(4):585–630.
- [443] Yachie A., Niida Y., Wada T., Igarashi N., Kaneda H., Toma T. et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 1999; 103:129–135.
- [444] Yamagishi S., Fukami K., Ueda S., Okuda S. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr. Drug Targets* 2007; 8(8):952–959.
- [445] Yamamoto K., Kobayashi M., Shimizu H. ATM, a paradigm for a stress-responsive signal transducer in higher vertebrate cells. *Subcell Biochem.* 2006; 40:327–339.
- [446] Yamashita K., McDaid J., Ollinger R., Tsui T.Y., Berberat P.O., Usheva A. et al. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J.* 2004; 18(6):765–767.
- [447] Yan N., Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005; 21:35–56.
- [448] Yan S.D., Schmidt A.M., Anderson G.M., Zhang J., Brett J., Zou Y.S. et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(13):9889–9897.
- [449] Yang L., Quan S., Nasjletti A., Laniado-Schwartzman M., Abraham N.G. Heme oxygenase-1 gene expression modulates angiotensin II-induced increase in blood pressure. *Hypertension* 2004; 43(6):1221–1226.
- [450] Yang T. Regulation of cyclooxygenase-2 in renal medulla. *Acta Physiol. Scand.* 2003; 177(4):417–421.
- [451] Yet S.F., Layne M.D., Liu X., Chen Y.H., Ith B., Sibinga N.E. et al. Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling. *FASEB J.* 2003; 17(12):1759–1761.
- [452] Yoo T.H., Li J.J., Kim J.J., Jung D.S., Kwak S.J., Ryu D.R. et al. Activation of the renin-angiotensin system within podocytes in diabetes. *Kidney Int.* 2007; 71(10):1019–1027.
- [453] Yoshida T., Noguchi M., Kikuchi G. Oxygenated form of heme. Heme oxygenase complex and requirement for second electron to initiate heme degradation from the oxygenated complex. *J. Biol. Chem.* 1980; 255(10):4418–4420.
- [454] Yu H.T. Progression of chronic renal failure. *Arch. Intern. Med.* 2003; 163(12):1417–1429.

- [455] Yu J., Zhang L. Apoptosis in human cancer cells. *Curr. Opin. Oncol.* 2004; 16(1):19–24.
- [456] Zakhary R., Gaine S.P., Dinerman J.L., Ruat M., Flavahan N.A., Snyder S.H. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93(2):795–798.
- [457] Zakhary R., Poss K.D., Jaffrey S.R., Ferris C.D., Tonegawa S., Snyder S.H. Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94(26):14848–14853.
- [458] Zhang F., Kaide J., Wei Y., Jiang H., Yu C., Balazy M. et al. Carbon monoxide produced by isolated arterioles attenuates pressure-induced vasoconstriction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281(1):H350–H358.
- [459] Zhang X., Sato M., Sasahara M., Migita C.T., Yoshida T. Unique features of recombinant heme oxygenase of *Drosophila melanogaster* compared with those of other heme oxygenases studied. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271(9):1713–1724.
- [460] Zhang X., Shan P., Alam J., Fu X.Y., Lee P.J. Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(10):8714–8721.
- [461] Zidar N., Jera J., Maja J., Dusan S. Caspases in myocardial infarction. *Adv. Clin. Chem.* 2007; 44:1–33.
- [462] Zimmermann K.C., Bonzon C., Green D.R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 2001; 92(1):57–70.
- [463] Zoccali C. Endothelial dysfunction and the kidney: emerging risk factors for renal insufficiency and cardiovascular outcomes in essential hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(4 Suppl 2):S61–S63.