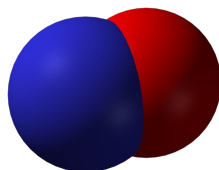


# Oxid dusnatý



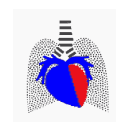
vaclav.hampI@lf2.cuni.cz

<http://fyziologie.lf2.cuni.cz>

<http://vh.cuni.cz>



UNIVERZITA KARLOVA  
2. lékařská fakulta



## Proč je NO zajímavé?



- Malá anorganická molekula, velký biologický význam
  - MW = 30 ( $O_2 = 31$ ,  $Ca^{2+} = 40$ )
- Účast na funkci všech hl. orgánových systémů
- 2 tváře: signalizace x toxicita
- Během pár let od základního objevu k fundamentálním pokrokům klinické praxe



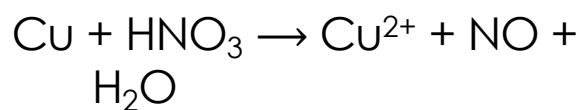
## Z historie: 1620

První příprava NO:



Jan Baptista van Helmont

(Vlám, 1577-1644)



(t.j. dříve než třeba kyslík - 1774)

## 1772

Chemická charakterizace:

Joseph Priestley

(objevitel kyslíku)



1800

Toxicita:

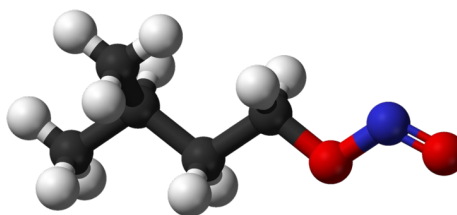
Sir Humphry Davy

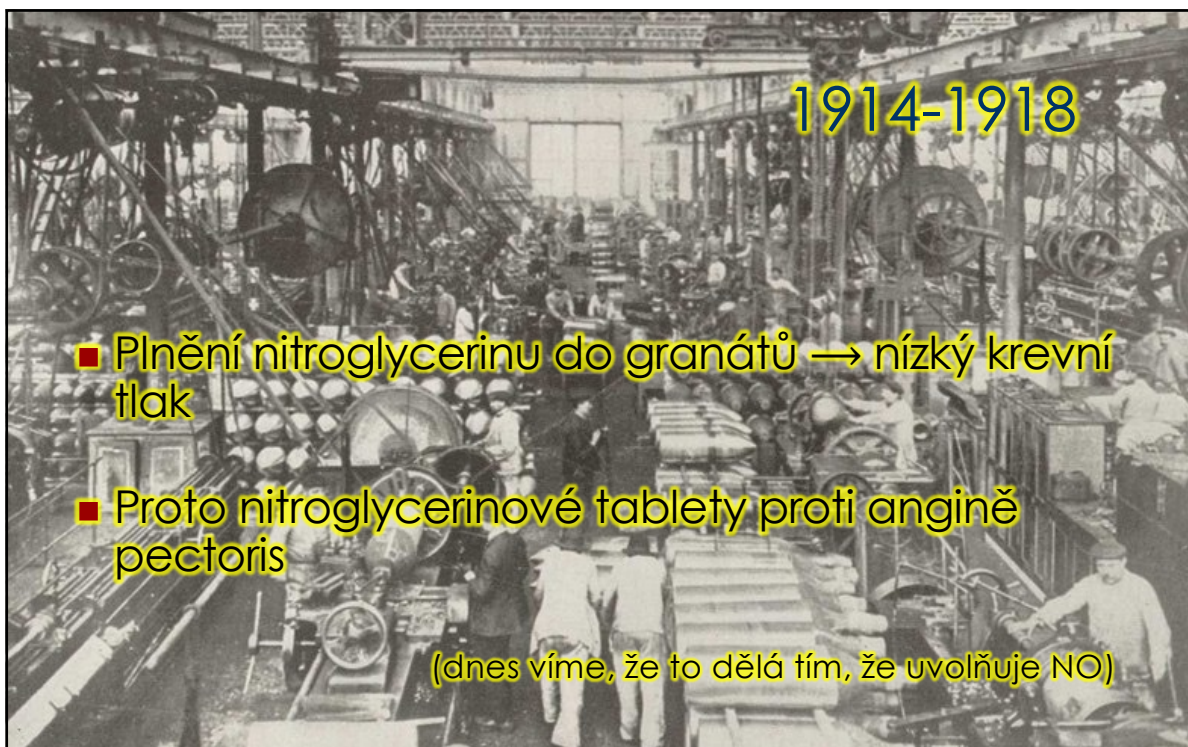
(málem umřel, když se toho  
nadýchal)

1867

Amylnitrit (dusitan amylnatý,  $C_5H_{11}ONO$ )  
snižuje krevní tlak při hypertenzi

(dnes víme, že to dělá tím, že uvolňuje NO)





1977

NO aktivuje guanylát cyklázu a tak zvyšuje intracelulární koncentraci cGMP:

Ferid Murad



1980

Endoteliální relaxační faktor (EDRF):

Robert Furchgott

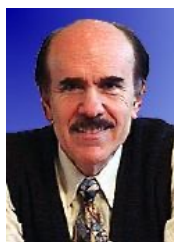


1987

EDRF = NO

t.j. eukaryotické buňky umí tvořit NO:

Louis Ignarro, Salvador Moncada

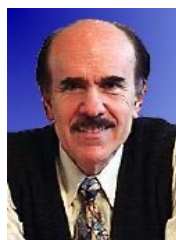




1998

Nobelova cena za fyziologii a lékařství

"Za klíčové objevy týkající se NO jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému"



## Chemie NO

- NO je plyn (bezbarvý)  
(kapalní při  $-152^{\circ}\text{C}$ , tuhne při  $-164^{\circ}\text{C}$ )

- NO je radikál
  - tj. lichý počet valenčních elektronů
  - má jich 11 ( $\text{N}_2$  má 10;  $\text{O}_2$  má 12)

Z  $\text{N}_2$  a  $\text{O}_2$  vzniká jen za zvláštních podmínek (např. blesk, spalovací motory, elektrárny)



## Rozpustnost NO

- Málo rozpustný ve vodě
  - $\sim 1.7$  mmol/l při  $25^{\circ}\text{C}$
  - t.j. podobně jako  $\text{O}_2$  či  $\text{N}_2$
- Lipofilita  $\rightarrow$  snadný průchod membránami



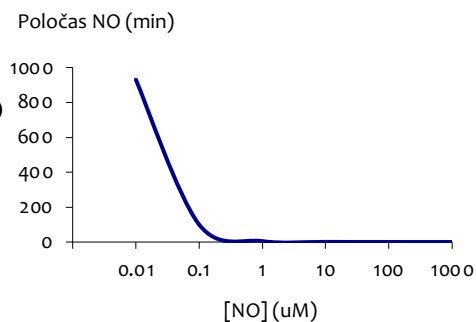
## Samovolný rozpad NO

- Pouze za vysokého tlaku
- Pozvolna vzniká toxický NO<sub>2</sub>  
(pozor na skladování v bombách!)



## Oxidace NO

- V přítomnosti O<sub>2</sub>:  
$$2 \text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2$$
- NO<sub>2</sub> je jedovatý radikál (hnědý plyn)
- Rychlá (několik sec),  
je-li NO i O<sub>2</sub> hodně
- Pomalá, je-li NO málo
  - to je většinou  
v tkáních  
(NO < 10 μM)





## Oxidace NO

- ~ 200x rychlejší v roztoku než v plynné fázi
- V roztoku jsou produktem autooxidace nitrity ( $\text{NO}_2^-$ ), resp.  $\text{HNO}_2$
- Jen v přítomnosti hemoproteinů (katalýza) oxidace až na nitráty ( $\text{NO}_3^-$ )



## Fyziologická role $\text{NO}_2^-$

- “Sklad” NO v krvi a tkáních
- Snadná redukce na bioaktivní NO
  - neenzymaticky
  - xantin oxidoreduktázy, NOS, cytochromy, deoxyhemoglobin, deoxymyoglobin
- ↑ redukce  $\text{NO}_2^-$  na NO při nedostatku  $\text{O}_2$  (napomáhá hypoxické vazodilataci)





## Nitráty ( $\text{NO}_3^-$ ) v jídle

- hodně v listové a některé kořenové zelenině
- redukovány na  $\text{NO}_2^-$  komensálními baktériemi na jazyce
- $\text{NO}_2^-$  v žaludku dále redukovány nízkým pH na NO → zabíjí skoro všechny baktérie spolknuté s jídlem
- podobně ochrana kůže před houbami:  $\text{NO}_3^-$  v potu redukován na  $\text{NO}_2^-$  komensálními organismy kůže a dále na NO lehce kyselým povrchem kůže
- $\text{NO}_3^-$  přispívají k + účinkům zeleniny (prevence kardiovaskulárních nemocí a diabetu 2. typu)

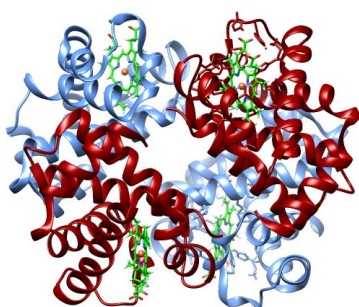


## Reakce NO se superoxidem

- $\text{O}_2^-$  je reaktivní kyslíkový radikál
  - vzniká trochu v respiračním řetězci
  - hodně v místech zánětu (NADPH oxidáza)
- S NO tvoří extrémně rychle peroxynitrit:
 
$$\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{OONO}^-$$
- $\text{OONO}^-$  není radikál, ale je vysoce reaktivní ( $>\text{O}_2^-$ ) a cytotoxický (také nitrosyluje)
  - vydrží déle v biologických systémech



## Inaktivace NO hemoglobinem



- Velká afinita NO k hemu
- Rychlá inaktivace NO oxidací s Fe oxyhemoglobinu za vzniku  $\text{NO}_3^-$

nitrosoHb  $\rightarrow$  metHb  $\rightarrow$   
 Hb reduktáza  $\rightarrow$  oxyHb

## S-nitrosylace proteinů

- reverzibilní vazba NO skupin k sulfydrylovým (-S-H) skupinám proteinů (posttranslační modifikace)
- ovlivňuje
  - receptory vázané na G proteiny
  - mitochondriální metabolismus
  - $[\text{Ca}^{2+}]_i$
  - buněčnou obranu proti oxidativnímu stresu a apoptóze





## Měření NO

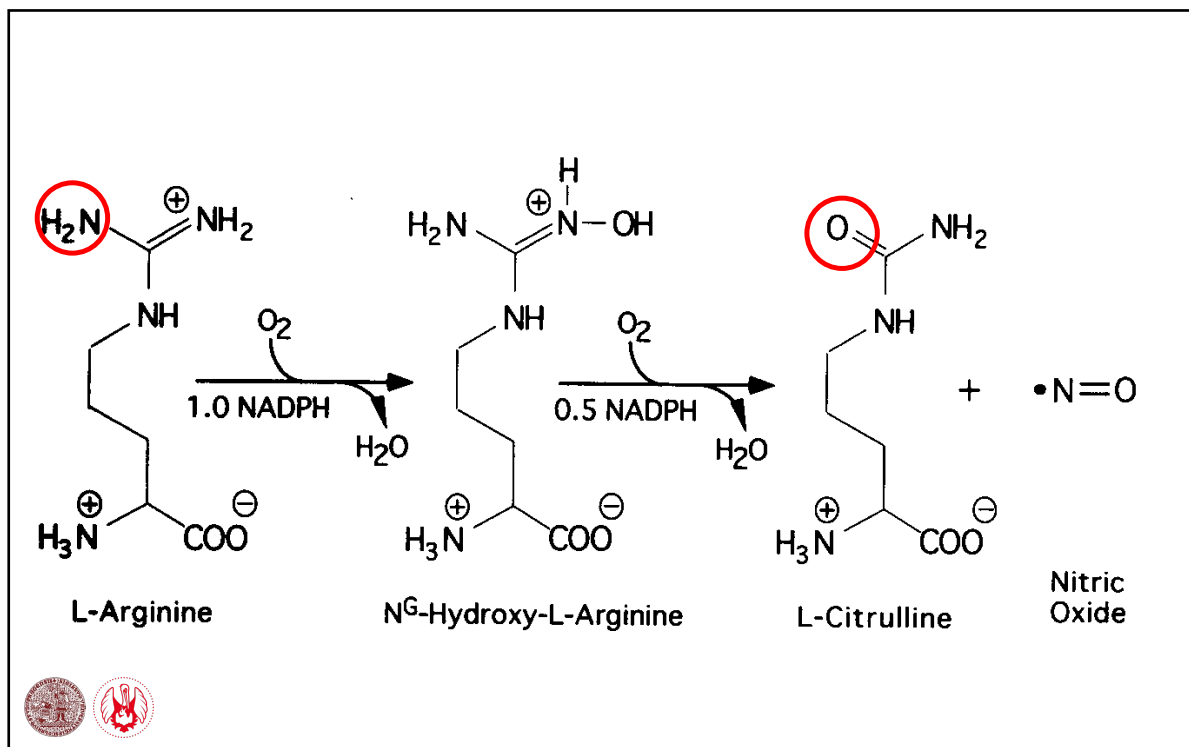
- Chemiluminescence ( $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^* + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{h}\nu$ )
  - plynná fáze
  - kapalná fáze (stripping)
  - oxidační produkty NO (předsazená redukční komora)
- Elektroanalýza (amperometrie) - NO reaguje s elektrodou  $\rightarrow \Delta$  proudu nebo napětí
- Spin trap: NO + Fe-dithiokarbamátové komplexy, pak detekce mono-nitrosyl-Fe komplexů elektronovou paramagnetickou resonancí (EPR)
- Fluorescenční indikátory: intracelulární měření (4,5-diaminofluorescein - DAF-2)



## Biosyntéza NO

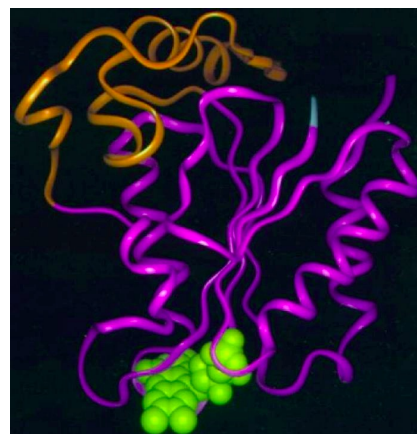
- 5-elektronová oxidace terminálního guanidino dusíku L-argininu molekulárním kyslíkem:
 
$$\text{L-arg} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO} + \text{L-cit}$$
- **NO syntáza** (NOS, EC 1.14.13.39)
- Stereospecificita

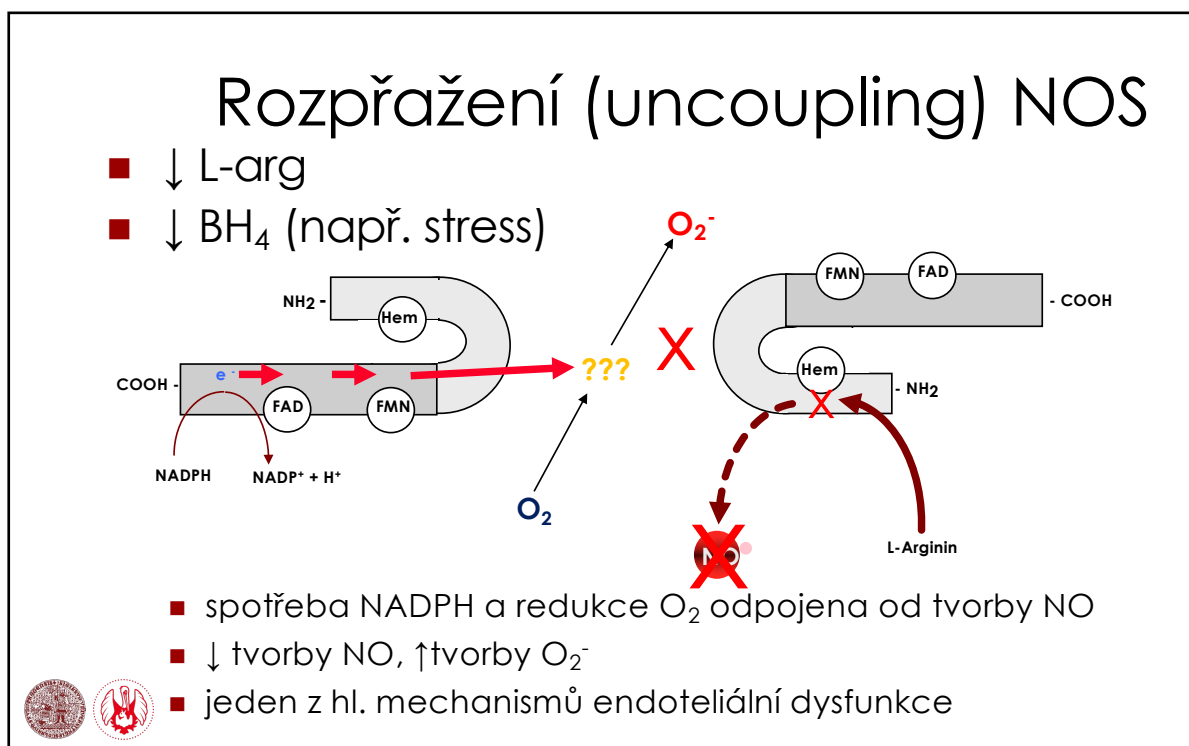
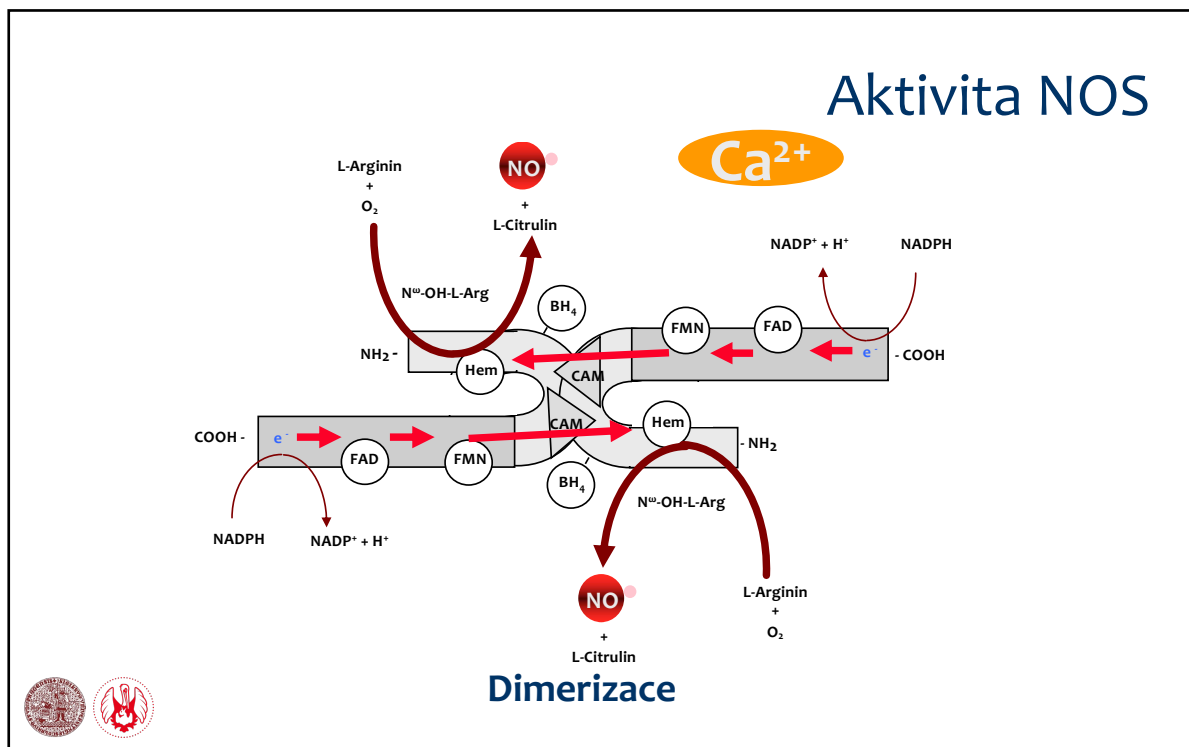


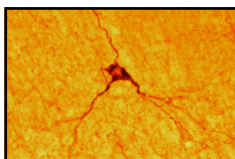


## NO syntáza

- 3 izoformy: I, II, III
  - obsahují v aktivním centru hem
  - aktivní jako homodimery
  - nutné kofaktory:
    - NADPH
    - 6(R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin
    - FAD
    - FMN
    - kalmodulin

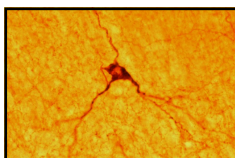






## NOS I (nNOS - neuronální)

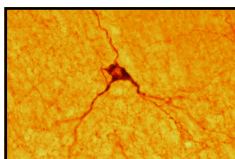
- ~160 kDa
- Gen na lidském chromosomu 12
- Rozpuštěná v cytosolu
- Konstitutivně exprimována:
  - centrální a periferní neurony
  - některý epitel, cévní hladký sval
  - kosterní sval



## NOS I

- Vyžaduje  $\text{Ca}^{2+}$   
(nutné pro vazbu kalmodulinu)
- Regulace aktivity:
  - $\text{Ca}^{2+}$
  - ser/tyr fosforylace
  - NO (zpětnovazební inhibice)

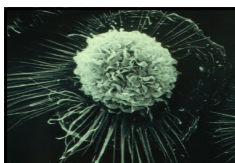




## NOS I

Hlavní uplatnění:

- neurotransmise
- neuromodulace

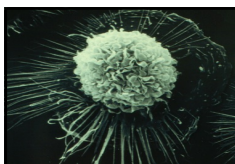


## NOS II (iNOS - inducibilní)

- ~130 kDa
- Gen na lidském chromosomu 17
- Rozpuštěná v cytosolu
- Exprese je inducibilní (cytokiny...):
  - makrofágy
  - glie, hepatocyty
  - endotel, epitel, srdeční myocyty, hladký sval,...

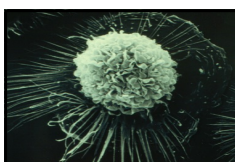






## NOS II

- Nepotřebuje  $\text{Ca}^{2+}$   
(váže kalmodulin trvale i bez  $\text{Ca}^{2+}$ )
- Regulace aktivity:
  - indukce exprese
  - NO (zpětnovazební inhibice)

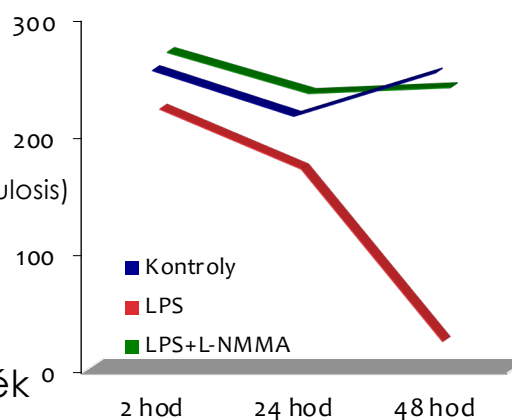


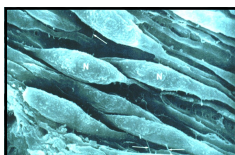
## NOS II

### Hlavní uplatnění:

- boj s infekcí
  - bakterie  
(i jinak obtížně zlikvidovatelné,  
např. *Mycobacterium tuberculosis*)
  - houby
  - paraziti
  - inhibice replikace virů
- zabíjení nádorových buněk<sup>0</sup>

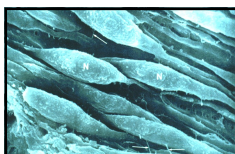
Baktérie/100 makrofágů





## NOS III (eNOS - endoteliální)

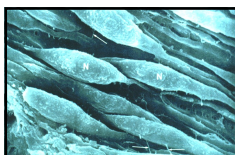
- ~133 kDa
- Gen na lidském chromosomu 7
- Vázaná na buněčnou membránu (kaveoly)
- Konstitutivně exprimována:
  - endotel
  - plicní a renální epitel; trombocyty
  - srdeční myocyty
  - hipokampus



## NOS III

- Vyžaduje  $\text{Ca}^{2+}$   
(nutné pro vazbu kalmodulinu)
- Regulace aktivity:
  - $\text{Ca}^{2+}$
  - ser/tyr fosforylace
  - modulace exprese
  - inhibice S-nitrosylací (thiolové skupiny cysteinů)

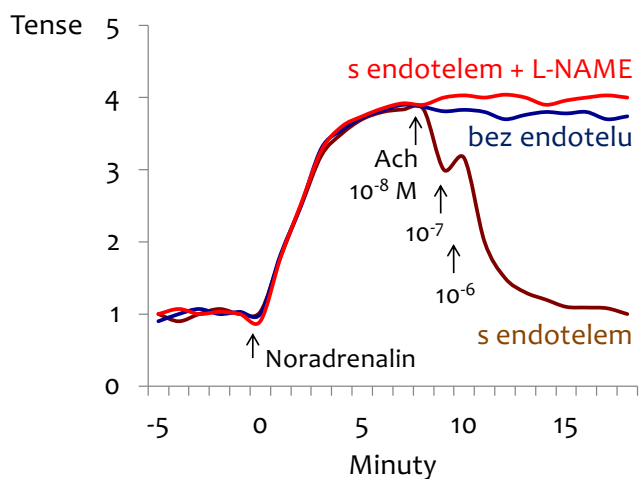




## NOS III

Hlavní uplatnění:

- regulace cévního tonu
- regulace krevního zásobení orgánů



## Mitochondriální NOS

- Podobná NOS I
- Nejasný význam



## Účinky NO na cílovou tkáň

1. Cytotoxicita
2. cGMP



## Účinky NO na cílovou tkáň

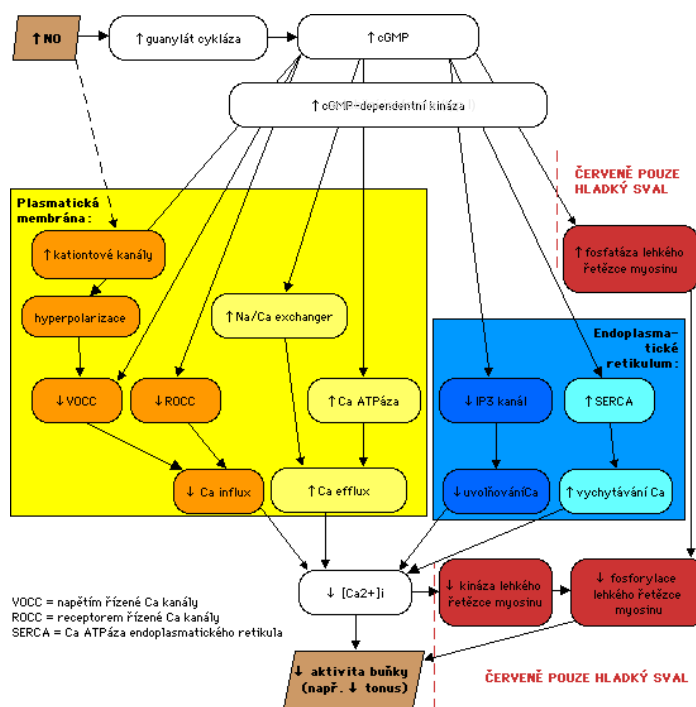
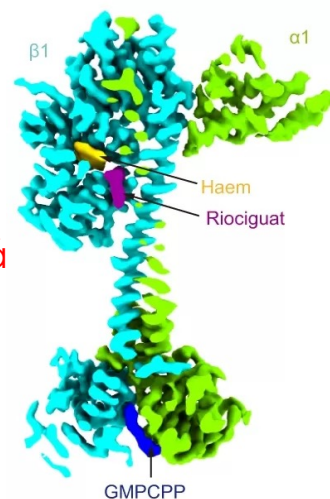
1. Cytotoxicita:
  - při vysoké koncentraci (NOS II)
  - poškození bílkovin, DNA, lipidů
  - oxidace ( $O_2$ ,  $O_2^-$ )
    - > reaktivní, toxické produkty ( $NO_2$ ,  $ONOO^-$ )
  - inhibice respirace
  - boj s infekcí a tumory

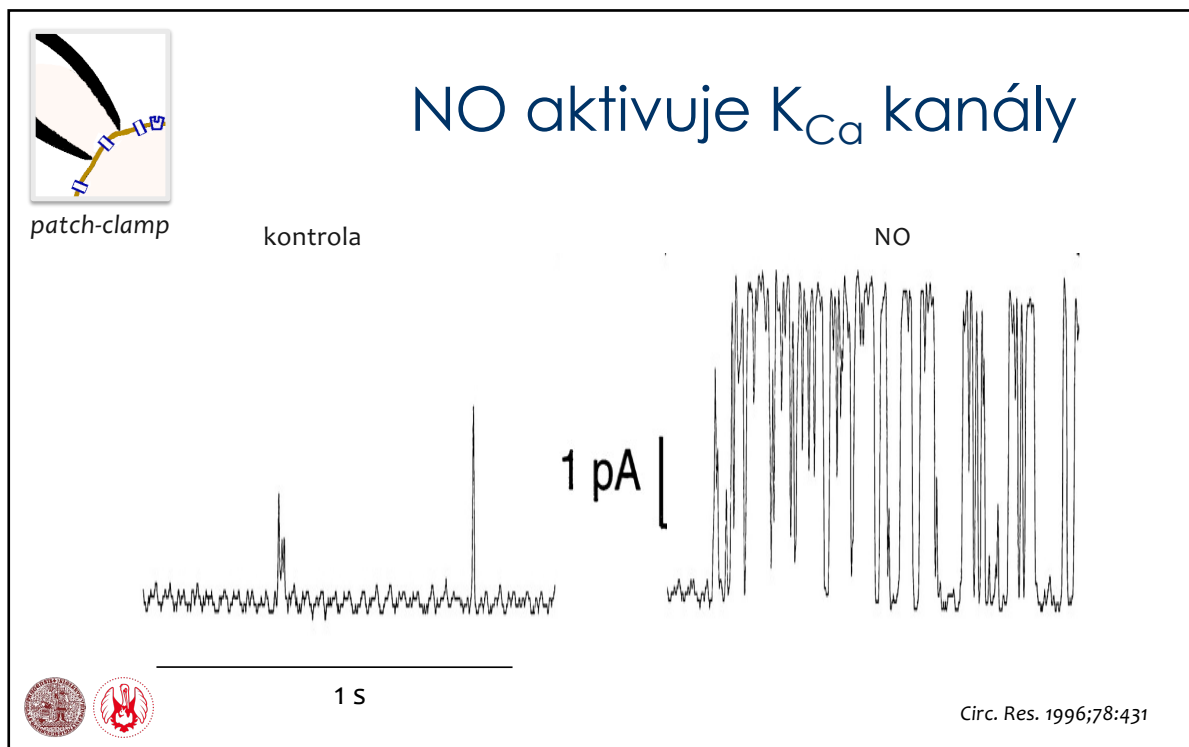


## Účinky NO na cílovou tkáň

### 2. Prostřednictvím cGMP:

- Při nižších (NOS I a III) Oxidace jen pomalá
- Přebývá vazba NO na hem solubilní isoformy **guanylátcyklá**
- ↑ cyklický guanosin-3',5' monofosfát (**cGMP**)
- cGMP aktivuje cGMP-dependentní protein kinázu (**G-kinázu**)





## Daší osud cGMP

Inaktivace cGMP:

Fosfodiesterázy cyklických nukleotidů

- zejména typ V.
- vzniká 5'-GMP

## Farmakologie NO

- Donory NO  
(nitroglycerin, nitroprusid, NOáty)
- Inhibitory NOS  
(L-NMMA, L-NAME, ADMA,  
aminoguanidin, 7-NINA)
- Aktivátory NOS III  
(endotel-dependentní vazodilatancia)
- Inhibitory fosfodiesterázy  
(sildenafil, zaprinast)



## Funkce NO: Neurotransmise

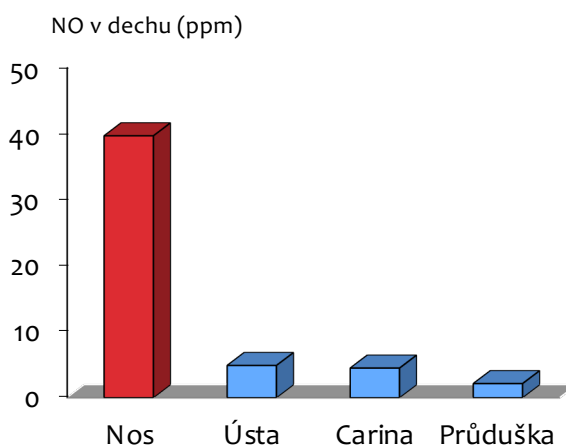
- Difusní modulace
- NANC
- Retrográdní messenger  
(zpětné potvrzení příjmu zprávy)
- Dlouhodobá potenciace  
(presynaptická buňka přistě vyšle silnější signál -  
podklad paměti)
- Bdění, učení, paměť, spánek, bolest,  
deprese



## NO v dechu

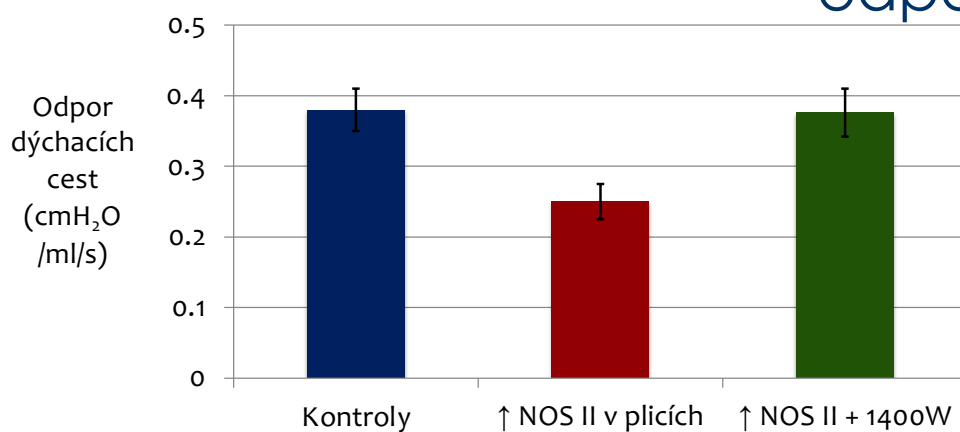
Nejvíc NOS je v nose a paranasálních dutinách

- hl. NOS II
- dezinfekce ?
- bronchodilatace
- regulace plicních cév ?
- mění se při některých nemocech (astma)



Dillon et al, Chest 1996

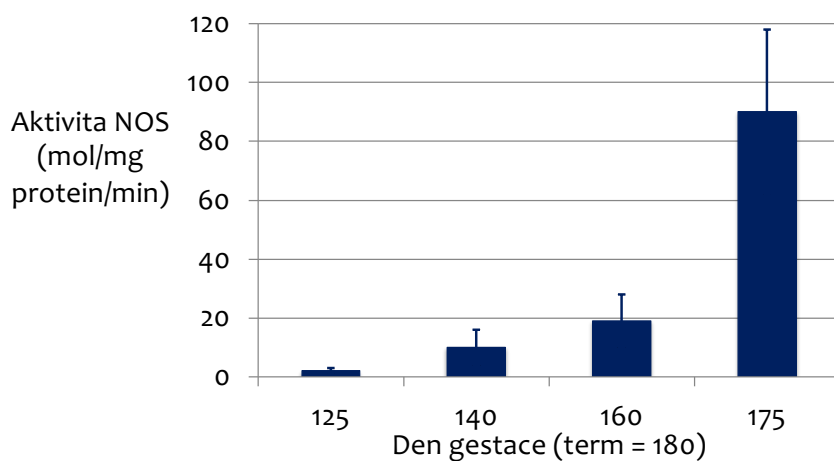
## NO v dých. cestách snižuje jejich odpor



Hjoberg et al: J Appl Physiol 2004



## NO v dých. cestách roste před narozením



*Shaul: Am J Physiol Lung 2002*

## NO není jediný plynný mediátor

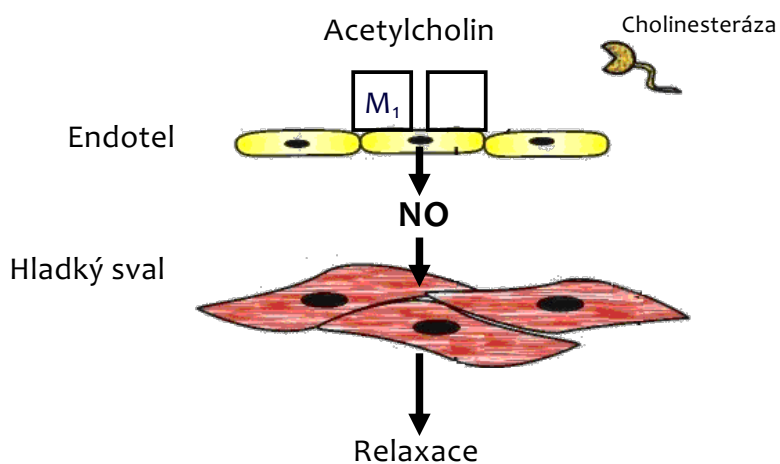
### ■ Další gasotransmittery:

■ H<sub>2</sub>S

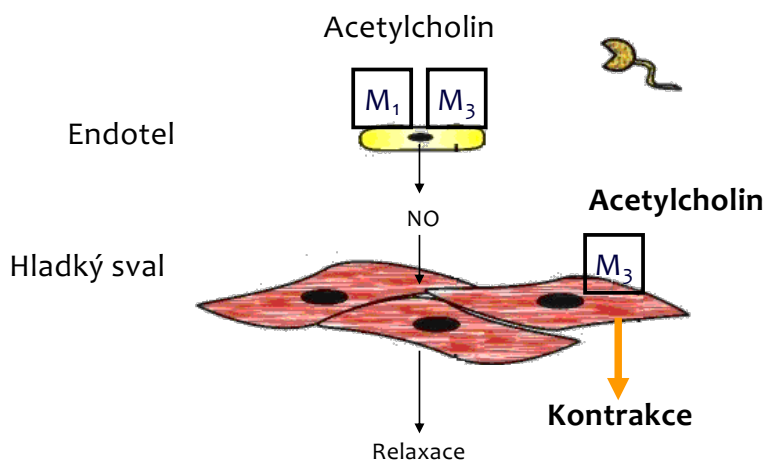
■ CO



## Vazodilatace závislá na endotelu



## Vazodilatace závislá na endotelu



## Vazodilatace závislá na endotelu

Potencují ji:

### ■ estrogeny

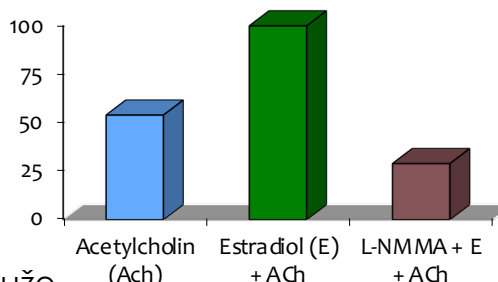
- ženy před menopauzou  
↓ riziko kardiovaskulárních chorob
- po menopauze doženou muže
- ↑ v těhotenství, zejména v děloze (narušeno při preeklampsii)



### ■ insulin

- ↑ nabídka glukózy tkáním díky ↑ prokrvení

% přírůstek koronárního průtoku



## Funkce NO: regulace cév

Průtokem indukovaná vazodilatace:

vazodilatace v periferních orgánech

→ ↑ rychlost proudu krve v proximálnějších cévách

→ ↑ střížné napětí (shear stress)

→ ↑ aktivita (a exprese) eNOS

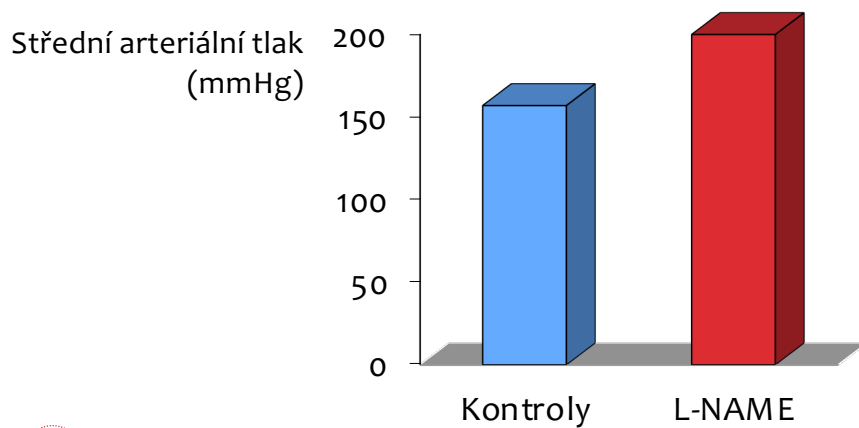
→ vazodilatace proximálnějších cév

NO je v tomto nenahraditelný

(porucha vede k hypertenzi)

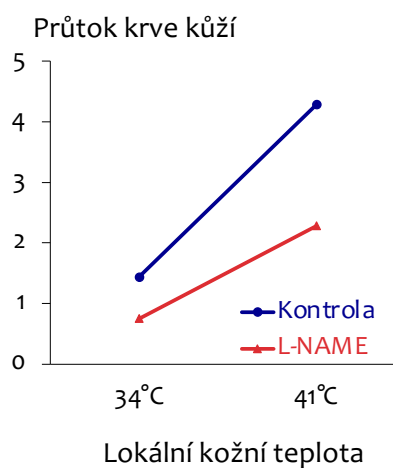
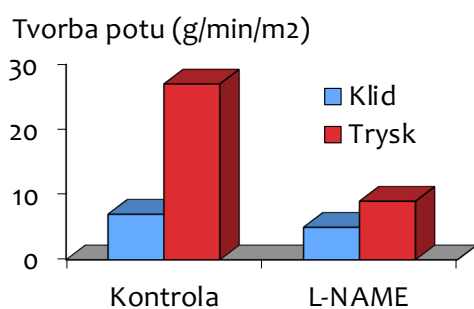


## „Tonická“ tvorba NO



Isacson et al: J Appl Physiol 1993

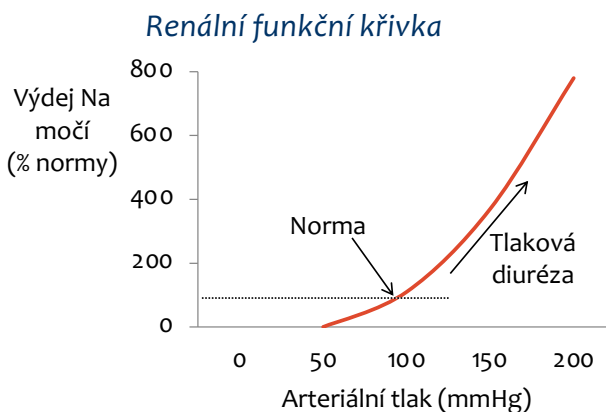
## NO a termoregulace



## NO v ledvinách

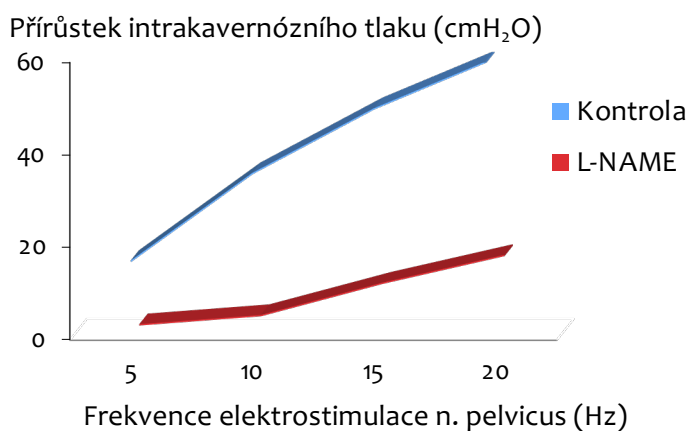
Zprostředkuje tlakovou diurézu:

- ↑ arteriální tlak
  - mechanické namáhání endotelu
  - ↑ syntéza NO
  - difuze k distálním tubulům
  - ↓ reabsorbce  $\text{Na}^+$



## NO a erekce

NO z terminál n. pelvici relaxuje kavernózní hladký sval





## NO a fertilizace

vstup spermie do vajíčka aktivuje NOS v jeho akrosomu → ↑NO ve vajíčku

esenciální pro další kroky:

- zablokování vstupu dalších spermií
- orientace projadere pro fúzi



## NO snižuje srážlivost krve

- Inhibice adheze, agregace a sekrece trombocytů
- Aktivované trombocyty také tvoří NO
  - zpětnovazební inhibice agregace

Fylogeneticky staré

- krabi před 500 milióny let  
(hodně dlouho před savci)



## NO inhibuje apoptózu

- Apoptóza: "fysiologický" způsob smrti
- Na rozdíl od nekrózy nepůsobí zánět
- NO ( $\rightarrow$  cGMP  $\rightarrow$  G kináza) inhibuje apoptotické fosforylační signály
- NO přímo inhibuje kaspázy  
(specifické proteázy apoptózy)



## Dvojí role NO při ischemii a reperfúzi

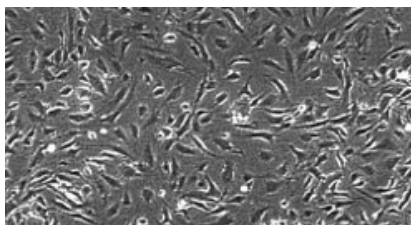
- NO v malém množství chrání před ischemickým poškozením
- NO je důležité pro preconditioning
- ale NO přispívá k reperfučnímu poškození (excesivní NO tvořené během reperfuse reaguje s  $O_2^- \rightarrow ONOO^-$ )



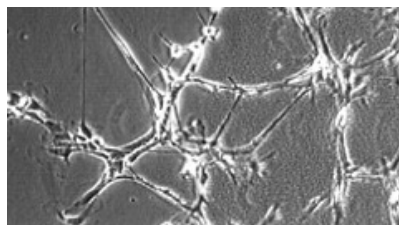
## NO podporuje angiogenesi

Endoteliální buňky *in vitro*:

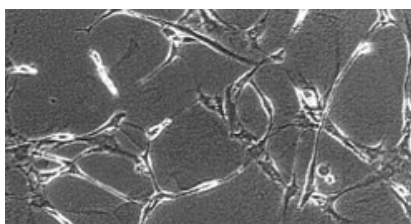
Kontroly:



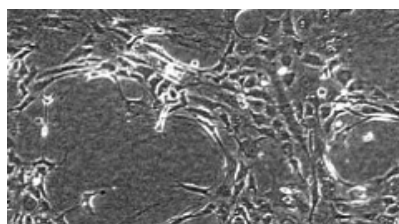
FGF:



NO donor:



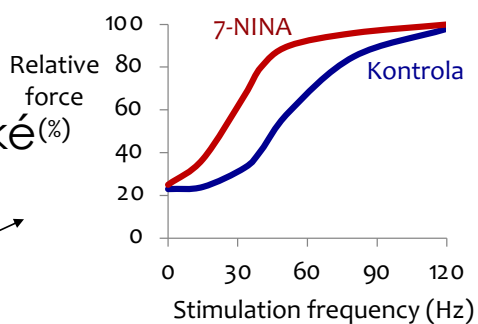
FGF +  
L-NAME:



Saeid Babaei et al: *Circ. Res.* 1998

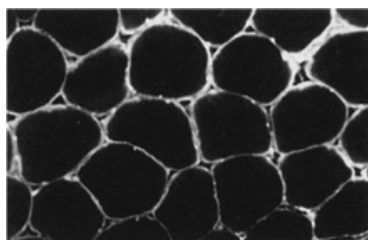
## NO v kosterním svalu

- sval má všechny izoformy NOS (vč. pro sval specifické splice varianty NOS I)
- NO tlumí kontrakci (E-C coupling)
- NO ovlivňuje autoregulaci průtoku krve, respiraci a glukózovou homeostázu
- NO moduluje diferenciaci myocytů

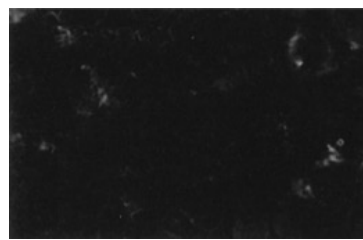




## Absence NOS I ve svalu u Duchennovy muskulární dystrofie



zdraví



nemocní



Stamler & Meissne: *Physiol Rev* 2001

## Další funkce NO

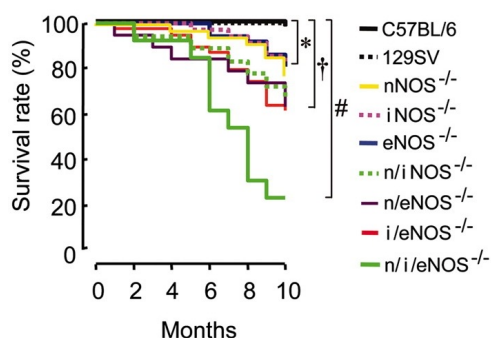
- NO z endokardu moduluje **srdeční** kontraktilitu
- **Kost:**
  - Hodně NO (např. estrogenem, namáháním):
    - inhibice resorpce (inhibicí tvorby a aktivity osteoklastů)
  - Málo NO:
    - potence resorpce indukované cytokiny
    - asi esenciální pro normální funkci osteoklastů
- Podíl na regulaci **laktace** (?)
- Esenciální negativní regulátor proliferace **při vývoji** (bez zastavení růstu není diferenciaci)



## NO a dlouhověkost

NOS<sup>-/-</sup> myši:

- předčasné stárnutí
- ↓dožití
- kalorická restrikce jim neprodlouží život



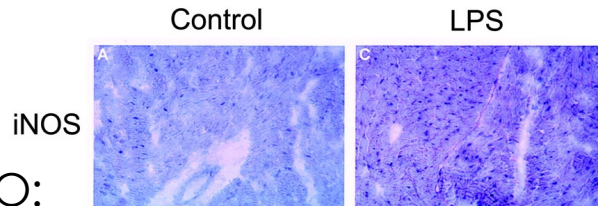
## Patofysiologie NO

- septický šok
- hypertenze (?)
- atheroskleróza
- angina pectoris
- záněty, autoimunita
- erektilní dysfunkce
- diabetes mellitus (?)
- mozková mrtvice, roztroušená skleróza, Alzheimer (?), Parkinson (?)



## Septický šok

- Infekce (endotoxin) indukuje expresi NOS II



- Vysoká tvorba NO:

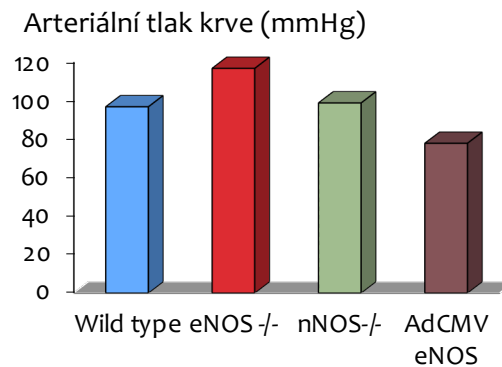
- likvidace infekce
- ale i vazodilatace → masivní hypotenze
- indukce NOS II i v myokardu → ↓ kontraktilita



## NO a hypertenze

- ↓ NOS III → hypertenze

Ale:  
syntéza NO  
nebývá při  
hypertenzi ↓  
(někdy je ↑)



## NO a hypertenze: $\Sigma$

- Dysfunkce NO  $\neq$  primární příčina hypertenze
- Poškození endotelu vysokým tlakem může sekundárně narušit tvorbu NO
- To pak hypertenzi dále zhoršuje



## NO a atheroskleróza

Atherosklerotický plát

→ endoteliální dysfunkce

→ ↓ tvorba NO

→ paradoxní vazokonstrikce

(např. koronární cévy při námaze - angina pectoris)

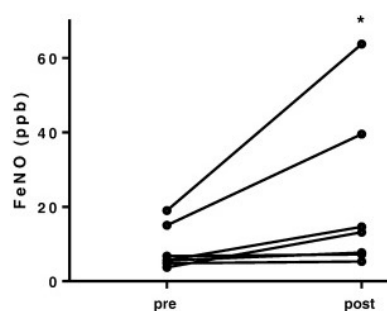
→ ↓ ochrana proti tvorbě trombů

→ např. až infarkt

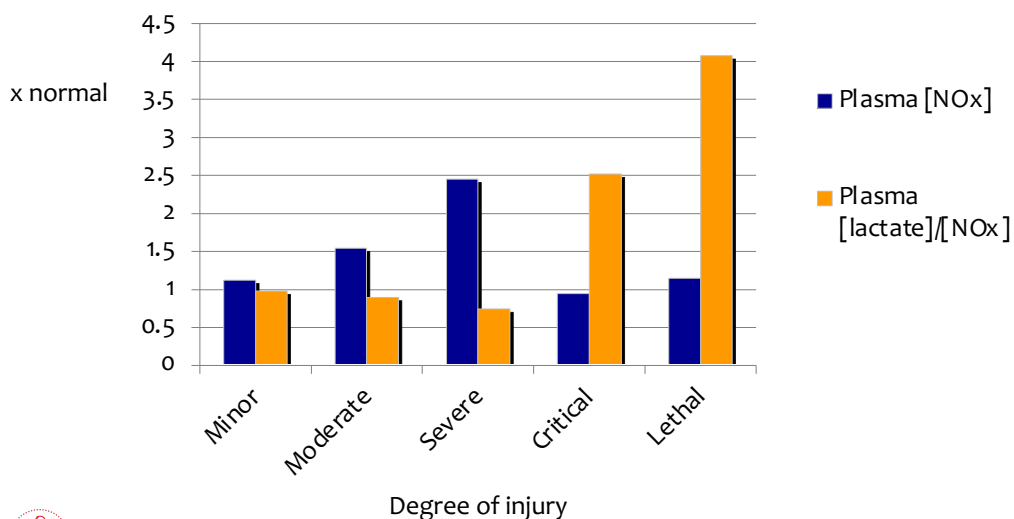


## NO v diagnostice

- Exhalovaný NO:
  - Záněty dýchacích cest
- NOx v plasmě
  - Polytrauma



## NOx v plasmě při polytraumatech



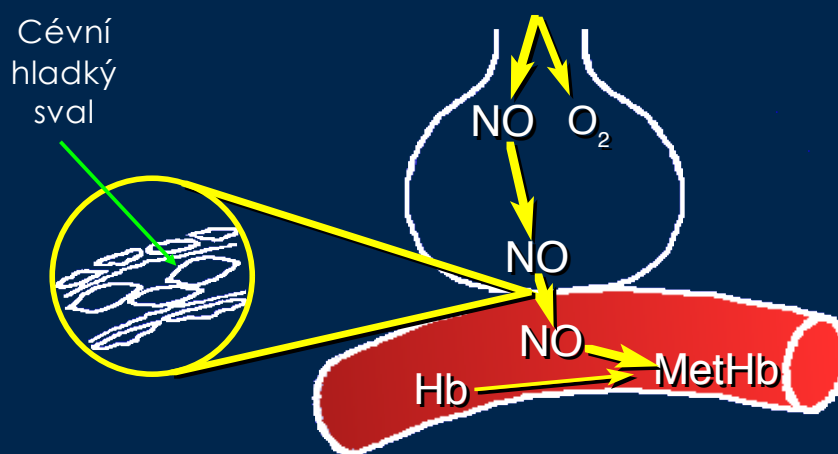
Beitl et al 2016

## NO v terapii

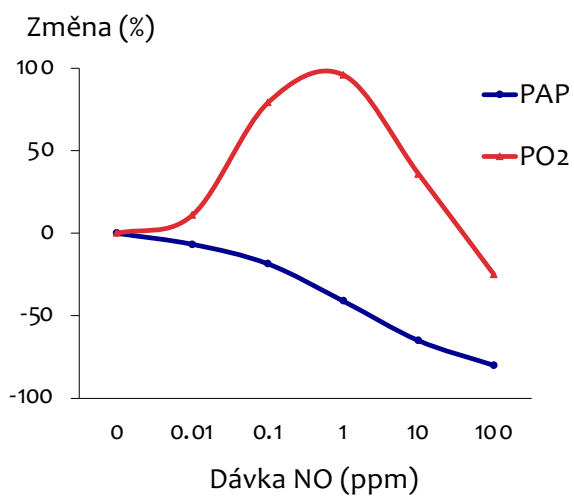
- Šok - pokusná terapie inhibitory NOS (aminoguanidin)  
(výsledky zatím nejednoznačné)
- Inhalace plynného NO:
  - PPHN
  - ARDS
- Erektální dysfunkce – Viagra (inhibitor PDE V.)
- NOáty



## Selektivita inhalovaného NO pro plicní cirkulaci



## Inhalace NO při ARDS



## Inhalace NO při PPHN

