

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE

FARMAKOLÓGIA

OXIDU DUSNATÉHO

Vysokoškolské skriptá

Martina Antošová

Martin 2013

Ústav farmakológie Univerzity Komenského v Bratislave
Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Recenzenti: Prof. MUDr. Dušan Dobrota, CSc.
Prof. RNDr. Magdaléna Kuželová, CSc.
Doc. MUDr. Martin Wawruch, PhD.

Mgr. Martina Antošová, PhD., MBA 2013

Vydanie: Prvé

ISBN 978-80-89544-42-4 čiarový kód EAN 9788089544424

Predhovor

Skriptá sú určené predovšetkým študentom pregraduálneho a postgraduálneho štúdia na lekárskech fakultách. Poskytujú základné informácie o oxide dusnatom (NO), ktorý bol pre svoje účinky vyhlásený „molekulou 20.storočia“.

V jednotlivých kapitolách je charakterizovaná syntéza, metabolizmus a mechanizmus účinku tohto mediátora. V ďalších častiach je rozpísaný jeho duálny – fyziologický a patologický efekt v najdôležitejších systémoch ľudského organizmu (nervový systém, imunitný systém, dýchací a tráviaci systém, urogenitálny systém a muskuloskeletárny systém). Zaujímavou je aj kapitola zameraná na možnosti detekcie oxidu dusnatého alebo jeho metabolitov, ktorá koncentruje najnovšie poznatky a ponúka prehľad najmodernejších technických riešení a metód detekcie využiteľných aj v klinickej praxi. V poslednej časti skríp sú zosumarizované súčasné možnosti ovplyvnenia homeostázy oxidu dusnatého a jeho potenciálne terapeutické využitie v klinickej praxi.

Aj napriek tomu, že funkcia oxidu dusnatého nie je stále úplne objasnená, veríme, že komplex prezentovaných poznatkov poskytne študentom ucelený pohľad na úlohu tejto unikátnej molekuly v ľudskom organizme a tiež na jej farmakologický potenciál.

Júl 2012

Autorka

OBSAH

1.	HISTÓRIA OXIDU DUSNATÉHO	6
2.	BIOSYNTÉZA OXIDU DUSNATÉHO	8
2.1	NO SYNTÁZY.....	9
2.1.1	Klasifikácia NO syntáz	11
2.1.2	Charakteristika NO syntáz	12
2.1.2.1	Neuronálna NO syntáza (NOS-I)	12
2.1.2.2	Induktívna NO syntáza (NOS-II)	13
2.1.2.3	Endotelová NO syntáza (NOS-III)	14
2.1.2.4	Mitochondriálna NO syntáza.....	15
2.1.2.5	Bakteriálna NO syntáza.....	16
2.2	ARGINÁZA.....	18
3.	FARMAKOKINETIKA OXIDU DUSNATÉHO	21
4.	MECHANIZMUS ÚČINKU OXIDU DUSNATÉHO	23
4.1	PRIAMY ÚČINOK NO	23
5.	ZÁKLADNÉ ÚČINKY OXIDU DUSNATÉHO	26
5.1	OXID DUSNATÝ A NERVOVÝ SYSTÉM	26
5.1.1	Centrálny nervový systém.....	26
5.1.2	Periférny nervový systém	27
5.2	KARDIOVASKULÁRNY SYSTÉM.....	29
5.2.1	Cievny systém.....	29
5.2.2	Srdce	31
5.3	DÝCHACÍ SYSTÉM.....	32
5.4	GASTROINTESTINÁLNY TRAKT (GIT)	35
5.5	UROGENITÁLNY SYSTÉM	37
5.5.1	Močový systém	37
5.5.2	Pohlavný systém	38
5.5.2.1	Ženský pohlavný systém	39
5.5.2.2	Mužský pohlavný systém	40
5.6	IMUNITNÝ SYSTÉM	41
5.7	POHYBOVÝ SYSTÉM	44
5.8	ENDOKRINNÝ SYSTÉM.....	46
6.	DETEKCIA NO.....	47
6.1	DETEKCIA NITRITOV A NITRÁTOV	47
6.2	ELEKTRONOVÁ PARAMAGNETICKÁ REZONANČNÁ SPEKTROSKOPIA (EPR)	49
6.3	VYDYCHOVANÝ OXID DUSNATÝ.....	50
6.4	REAL-TIME DETEKCIA	51
6.5	DETEKCIA NO SYNTETIZUJÚCICH ENZÝMOV	53
7.	FARMAKOLÓGIA OXIDU DUSNATÉHO.....	54
7.1	L-ARGINÍN.....	54
7.2	INHALOVANÝ NO.....	57
7.3	DONORY NO	59
7.3.1	Nitrovazodilatátory	62
7.3.2	Hybridné látky	69
7.4	INHIBITORY NO SYNTÁZ	75
7.4.1	Neselektívne inhibitory NO syntáz	77
7.4.2	Selektívne inhibitory indukívnej NO syntázy	78
7.4.3	Selektívne inhibitory konštitutívnych NO syntáz	80
7.5	ANTIOXIDANTY	81

7.5.1	Endogénne antioxidanty.....	82
7.5.2	Exogénne antioxidanty.....	83
7.5.3	Proteíny viažuce kovy.....	84
ZÁVER.....		85
LITERATÚRA		86

1. HISTÓRIA OXIDU DUSNATÉHO

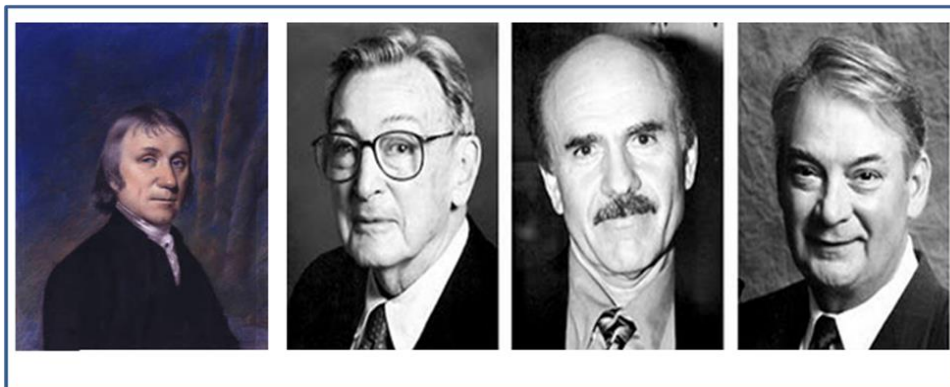
Oxid dusnatý (NO) – anorganická zlúčenina, ktorá sa skladá z jedného atómu dusíka a jedného atómu kyslíka, bol zaradený medzi desať najnestabilnejších molekúl v prírode. Je veľmi reaktívny, pričom vo vonkajších podmienkach najviac reaguje s kyslíkom za vzniku oxidu dusičitého. Za objaviteľa NO je považovaný **Joseph Priestley** (1733-1804; obr.1), ktorý už v roku 1772 dokázal túto molekulu identifikovať a popísať ako vysoko reaktívny plyn bez charakteristického zápachu a zafarbenia, ktorý sa vytvára v atmosfére počas búrky s výbojom blesku.

Do polovice 80-tych rokov 20-teho storočia sa o exogénnom NO hovorilo ako o zložke výfukových plynov či fotochemického smogu. V súčasnosti je ešte stále považovaný za jednu z hlavných komponent smogu, ktorá znečisťuje ovzdušie, poškodzuje ozónovú vrstvu a spôsobuje kyslé dažde. Okrem toho sa v malých, relatívne stabilných množstvách (10 – 100 ppb – parts per bilion) nachádza tiež v atmosférickom a izbovom vzduchu. V cigaretovom dyme sa tieto koncentrácie pohybujú medzi 400 – 1000 ppb. Vo vyšších množstvách môže byť toxický, pričom za dávku smrteľnú pre človeka sa v súčasnosti považuje koncentrácia nad 5000 ppb.

V 80-tych rokoch dvadsiateho storočia bola v endotelových bunkách cievneho systému detegovaná malá messengerová molekula. V roku 1980 Furchgott a Zawadzki označili túto molekulu ako relaxačný faktor uvoľňovaný endotelom (endothelium-derived relaxing factor - EDRF). O sedem rokov neskôr uvedení autori definitívne potvrdili vazodilatačné pôsobenie tohto faktora a označili ho za kľúčový článok zodpovedný za relaxáciu ciev. Poukázali tiež na to, že biologické vlastnosti EDRF sú si podobné s vlastnosťami NO. Táto domnienka bola neskôr potvrdená Palmerom, Ferrigom a Moncadom. Oxidu dusnatému sa začala venovať zvýšená pozornosť výsledkom čoho bolo zistenie, že existuje i endogénny NO. Skutočnosť, že plyn môže vznikať v bunke, preniknúť membránou a ovplyvňovať funkciu iných buniek bol novým objavom princípu prenosu signálov v živých organizmoch.

Prelom v histórii oxidu dusnatého nastal v 90-tych rokoch dvadsiateho storočia. V roku 1992 bol časopisom Science označený za „molekulu roka“. O ďalších 6 rokov - 10. decembra 1998 bola v Štokholme udelená **Robertovi Furchgottovi** (State University of New York, Brooklyn, USA), **Louisovi Ignarrovi** (University of

California, Los Angeles, USA) a **Feridovi Muradovi** (University of Texas, Huston, USA) Nobelova cena za fyziológiu a medicínu za prácu „*Oxid dusnatý ako signálna molekula v kardiovaskulárnom systéme*“ (obr.1).



Obrázok 1. Významní muži v histórii NO

(Joseph Priestley, anglický filozof a vedec - objaviteľ NO;

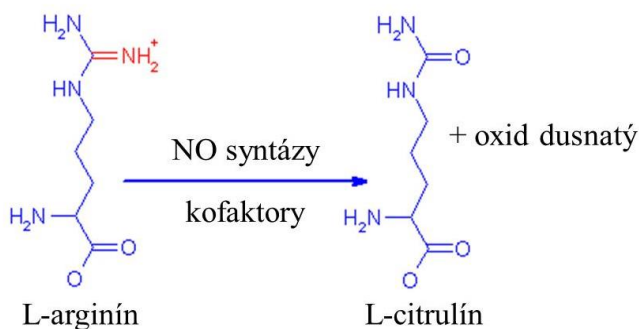
Robert Furchgott, Louis Ignarro a Ferid Murad – nositelia Nobelovej ceny)

Toto ocenenie spôsobilo obrovský záujem o výskum oxidu dusnatého a tak sa molekula dlho známa len ako „znečisťovateľ ovzdušia“ dostala do popredia významných časopisov a odborných periodík. Pre farmakológov sa objavila možnosť modulácie jeho tvorby, ktorá by mohla byť v budúcnosti základom pre vývoj nových liekov. Už v tej dobe sa zvažovali napr. možnosti inhibície tvorby NO pri septických stavoch spojených s hypotenziou či naopak možnosti zvýšenia tvorby či substitúcie u pacientov s hypertenziou. Realita je však zatiaľ iná.

Každoročne sa problematike NO celosvetovo venuje niekoľko desiatok tisíc prác. Len pre ilustráciu uvedieme že od roku 1994 do roku 2011 ich bolo celosvetovo publikovaných viac ako 100 000. A tak môžeme na úvod právom povedať že z „molekuly roka“ sa stala „molekula storočia“. Všetky účinky NO – či už fyziologické alebo patologické však ešte nie sú úplne objasnené a jeho diagnostický a terapeutický potenciál stále nie je naplnený.

2. BIOSYNTÉZA OXIDU DUSNATÉHO

Základným substrátom pre biosyntézu oxidu dusnatého je **L-arginín**. Táto semiesenciálna aminokyselina (kyselina 2-amino-5-guanidylvalérová) slúži ako prekursor nielen pre syntézu oxidu dusnatého, ale tiež rôznych proteínov, močoviny, polyamínov, prolínu, glutamátu, kreatínu a agmatínu. V bunkách ľudského organizmu je syntéza a katabolizmus L-arginínu ovplyvňovaný niekoľkými enzýmami ako sú arginín-sukcinát syntáza, dva arginázové izoenzýmy, štyri NO syntázy (NOS) a arginín dekarboxyláza. Ovplyvnenie aktivity jednotlivých enzýmov metabolizujúcich L-arginín je v konečnom dôsledku dôležité aj pre samotné ovplyvnenie tvorby oxidu dusnatého. V tomto smere je tiež dôležitá aj tzv. kompetícia o substrát – L-arginín. Pôsobením už spomenutých NO syntáz vzniká z L-arginínu **oxid dusnatý** a L-citrulín. Oxidácia L-arginínu prebieha pritom postupne. Prvým stupňom je vznik medziproduktu N^ω-hydroxy-L-arginínu (NOHA), druhým je oxidatívne rozštiepenie C=N väzby v NOHA za vzniku oxidu dusnatého a L-citrulínu. L-citrulín je následne recyklovaný znovu na L-arginín, čo sa označuje ako cyklus citrulín/oxid dusnatý alebo cyklus arginín/citrulín (obr.2).



Obrázok 2. Biosyntéza oxidu dusnatého

Optimálna hladina L-arginínu v ľudskom organizme postačuje pre kontinuálnu tvorbu NO. Intracelulárna koncentrácia L-arginínu v bunkách ľudského organizmu je vyššia ako 100 μmol/l. Jeho utilizácia závisí nielen na prítomnosti enzýmov, ktoré ho spracovávajú, ale tiež od rýchlosti ich katalytického účinku. Aj napriek tomu, že katalytická aktivita NO syntáz je pomerne nízka (K_{mL-Arg} 1,4 - 32,2 μmol/l v závislosti

na type izoformy), exogénny L-arginín môže len čiastočne zvýšiť biologickú dostupnosť oxidu dusnatého. Zvýšenie hladiny L-arginínu napríklad perorálnou substitúciou je spojené so zvýšením koncentrácie NO vo vydychovanom vzduchu a so zvýšením koncentrácie L-arginínu a nitrátov v plazme. To potvrdzuje, že zvýšením množstva substrátu dochádza i k zvýšeniu hladiny endogénneho NO. Do buniek je L-arginín transportovaný pomocou kationových aminokyselinových transportérov (CAT), pričom v súčasnosti poznáme 4 subtypy (CAT-1 až CAT-4). Ich aktivita závisí nielen od lokalizácie, ale aj od aktuálneho stavu organizmu. Syntéza NO však nie je závislá len na biologickej dostupnosti L-arginínu, ale i na rôznych kofaktoroch, ktoré využívajú najmä využívajúce enzýmy.

V niektorých prípadoch však môže byť NO vytvorený aj bez priameho účinku NO syntáz. Jedným z príkladov je NOHA, ktorý môže uvoľňovať NO pôsobením cytochrómu P-450.

2.1 NO syntázy

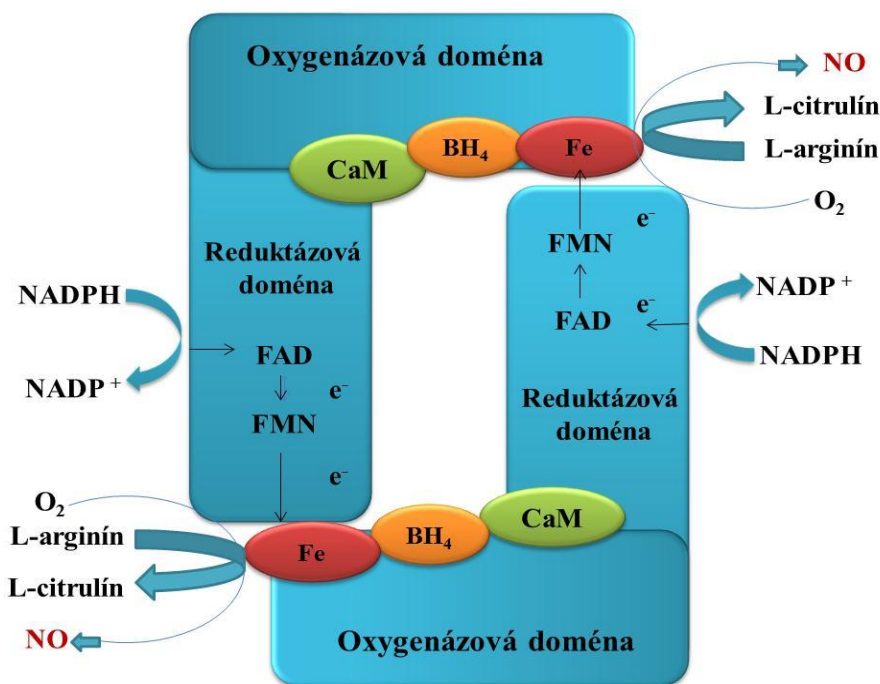
Oxid dusnatý je syntetizovaný prostredníctvom **NO syntáz**. Ide o skupinu enzýmov, ktoré sa v ľudskom organizme nachádzajú v niekoľkých izoformách. Poznanie ich štruktúry, funkcie a možností ich ovplyvnenia výrazne prispieva i k objasneniu pôsobenia samotného oxidu dusnatého. V rokoch 1989 až 1994 boli postupne popísané a charakterizované *tri hlavné izoformy* - neuronálna NOS (nNOS), endotelová NOS (eNOS) a indukčná NOS (iNOS). V roku 1996 bola popísaná aj štvrtá izoforma - mitochondriálna NOS (mtNOS).

NO syntázy majú dimérnu štruktúru – t.j. sú to dva identické monoméry, ktoré sú funkčne rozdelené na dve hlavné katalytické domény - **C-terminálnu reduktázovú doménu** a **N-terminálnu oxygenázovú doménu**. Pre svoju aktivitu vyžadujú niekoľko kofaktorov a prostetických skupín ako sú napr. tetrahydrobiopterín (BH₄), flavínadenín dinukleotid (FAD), flavínadenín mononukleotid (FMN), železnatý protoporfyrín IX – hem a systém Ca²⁺- kalmódulín (CaM).

C-doména obsahuje väzbové miesta pre nikotínamid adenín dinukleotid fosfát (NADPH), FAD a FMN, je homologická s cytochróm P-450 reduktázou a podieľa sa na transfere elektrónov z NADPH na oxygenázovú doménu. **N-doména** viaže hem a BH₄,

rovnako ako aj substrát pre syntézu NO – L-arginín a katalyzuje konverziu L-arginínu na L-citrulín a NO. Medzi týmito dvomi oblasťami sa nachádza sekvencia pre väzbu kalmodulínu, niekedy tiež označovaná ako **doména viažuca kalmodulín** (obr.3).

Po naviazaní kalmodulínu sa z dimérov stávajú tetraméry. Kalmodulín predstavuje akýsi senzor pre intracelulárnu hladinu Ca^{2+} a jeho aktivita sa prejavuje v závislosti od typu NO syntázy. Niektoré z izoforiem sú obzvlášť závislé na prítomnosti Ca^{2+} (neuronálna, endotelová), iné jeho prítomnosť pre svoju aktivitu nevyžadujú (induktívna).



Obrázok 3. Schematické znázornenie štruktúry NO-syntáz

O₂ – kyslík, NO - oxid dusnatý, NADP – nikotínamid adenín dinukleotid fosfát, NADPH – redukovaná forma nikotínamid adenín dinukleotid fosfátu, FAD – flavínadenín dinukleotid, FMN – flavínadenín mononukleotid, CaM - komplex kalcium/kalmodulín, BH₄- tetrahydrobiopterín, Fe – železo, e⁻ - elektróny,

Kofaktory pravdepodobne urýchľujú reakciu L-arginínu, NADPH a kyslíka za vzniku voľných radikálov, citrulínu a NADP. NO syntázy sú zároveň jediné z enzýmov, ktoré vyžadujú pre svoju aktivitu súčasne až 5 kofaktorov. Ovplyvnenie množstva substrátu pre syntézu NO, ale tiež ovplyvnenie prítomnosti či množstva kofaktorov môže významným spôsobom ovplyvniť aktivitu jednotlivých izoforiem NO syntáz, či tvorbu koncového produktu.

2.1.1 Klasifikácia NO syntáz

Každá z izoform NOS sa vyznačuje množstvom špecifických odlišností nielen z hľadiska ich štruktúry či lokalizácie, ale hlavne z hľadiska ich funkcie. Na základe ich charakteristických vlastností môžeme NOS rozdeliť do niekoľkých skupín.

Rozdelenie NO syntáz:

- neuronálna NO syntáza – nNOS (typ I, NOS-I alebo NOS-1),
- indukčná NO syntáza – iNOS (typ II, NOS-II alebo NOS-2),
- endotelová NO syntáza – eNOS (typ III, NOS-III alebo NOS-3),
- mitochondriálna NO syntáza – mtNOS,
- bakteriálna NO syntáza – bNOS.

Názvy týchto izoform sú odvodené jednak z názvu originálnych tkanív v ktorých boli enzýmy prvýkrát popísané (nNOS - v nervovom tkanive, eNOS - v endotelových bunkách ciev a pod.), prípadne odrážajú charakteristiku ich aktivity (iNOS - indukovaná širokým spektrom stimulov). Označenie mitochondriálnej NO syntázy súvisí s predovšetkým s lokalizáciou, ale do určitej miery na označení participujú aj deje, ktorých sa zúčastňuje. Označenie bakteriálnej NO syntázy je niekedy zamieňané s neuronálnou izoformou, ktorá je hlavne v anglickej literatúre označovaná ako „brain“ – t.j. mozgová.

Rozdelenie NO syntáz na základe expresie:

- konštitutívne – nNOS a eNOS – spoločne označované ako cNOS a mtNOS. Sú exprimované prevažne vo fyziologických podmienkach vo väčšine buniek a tkanív ľudského organizmu.
- induktívne – iNOS, bNOS sú exprimované po pôsobení zápalového alebo iného patologického spúšťača (napr. typickým induktorom iNOS sú cytokíny).

Rozdelenie izoform na základe expresie však nie je úplne ideálnym, nakoľko aj konštitutívne izoformy môžu byť exprimované v obdobných podmienkach ako indukčné izoformy a naopak.

Rozdelenie NO syntáz v závislosti na intracelulárnej hladine vápnika:

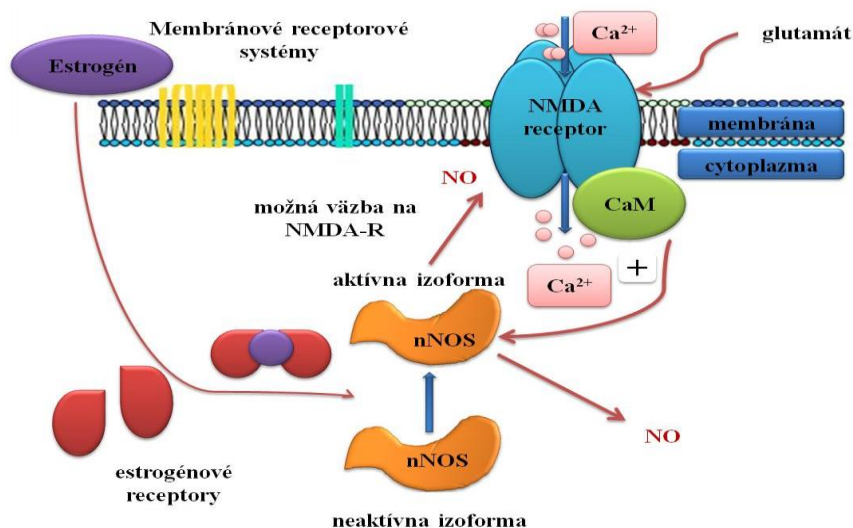
- závislé na intracelulárnej hladine vápnika (nNOS, eNOS, mtNOS)
- nezávislé na intracelulárnej hladine vápnika (iNOS).

2.1.2 Charakteristika NO syntáz

2.1.2.1 Neuronálna NO syntáza (NOS-I)

Neuronálna NO syntáza bola identifikovaná v cytozole buniek centrálného a periférneho nervového systému, v bunkách kostrového svalu, v terminálnych nervových zakončeníach myokardu a sietnici.

Uvoľnenie NO touto izoformou je rýchle, priestorovo a časovo ohraničené. Primárnym spôsobom regulácie jej aktivity je väzba kalmodulínu na doménu viažucu kalmodulín po zvýšení intracelulárnej hladiny Ca^{2+} približne na 500 nmol/l. Pri koncentráciách vápnika pohybujúcich sa okolo 100 nmol/l je izoforma inaktívna. Hoci je nNOS popisovaná ako konštitutívna izoforma, jej expresia je riadená podobne ako v prípade eNOS nielen fyziologickými (estrogén), ale aj patofyziologickými podnetmi (napr. poškodenie nervov; obr.4).



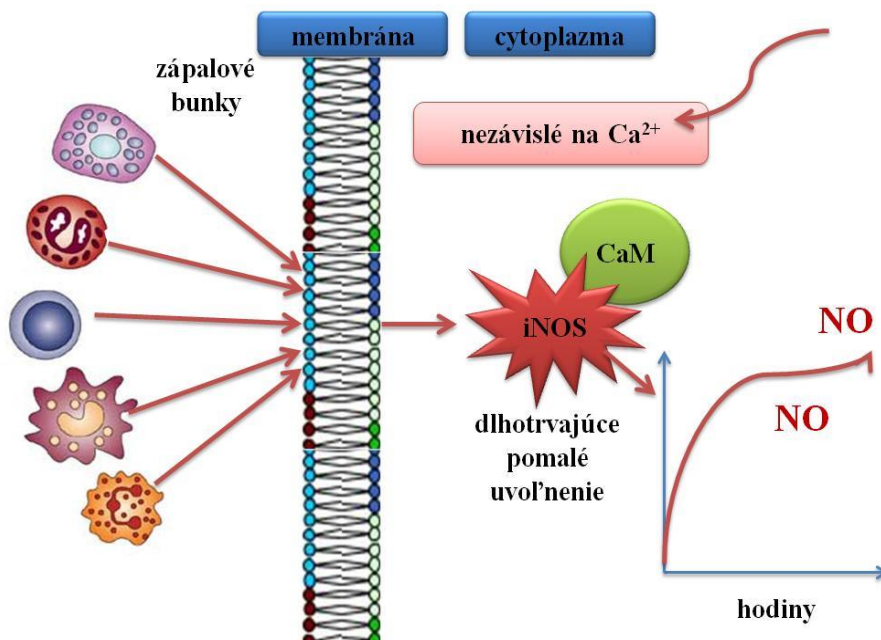
Obrázok 4. Neuronálna NO syntáza, lokalizácia a mechanizmy jej regulácie (vplyv intracelulárneho vápnika, aktivácia prostredníctvom estrogénov)

**NMDA-R – glutamátový receptor, CaM – komplex kalcium/kalmodulín, nNOS – neuronálna NO syntáza, NO-oxid dusnatý, Ca^{2+} - vápnik*

2.1.2.2 Induktívna NO syntáza (NOS-II)

Induktívna NO syntáza patrí k jedinečným izoformám vďaka svojej nezávislosti od prítomnosti Ca^{2+} a vysokej, indukovateľnej úrovne expresie, ktorá vo fyziologických podmienkach nemá výraznejší význam. Prvýkrát bola detegovaná v alveolárnych makrofágoch, kde bola jej aktivita zaznamenaná ako odpoveď na pôsobenie prozápalových cytokínov alebo endotoxínov. Je to cytoplazmatický enzým nachádzajúci sa v rôznych bunkách (napr. makrofágy, granulocyty a epitelové bunky), ktorý reaguje na prítomnosť mediátorov zápalu. Práve z tohto dôvodu býva označovaná tiež ako imunitný alebo zápalový typ NOS.

Aktivita iNOS síce závisí od naviazania kalmodulínu, avšak nezávisí od zmien hladiny intracelulárneho Ca^{2+} . Väzba je realizovaná aj pri veľmi nízkych koncentráciách vápnika, čo má za následok dlhodobé uvoľňovanie NO v množstvách vyšších než fyziologické (nmol). V patologických podmienkach môže iNOS produkovať až 1000 násobne väčšie množstvá NO, ktoré namiesto regulačného a protektívneho účinku pôsobia zvyčajne cytotoxicky (obr.5).



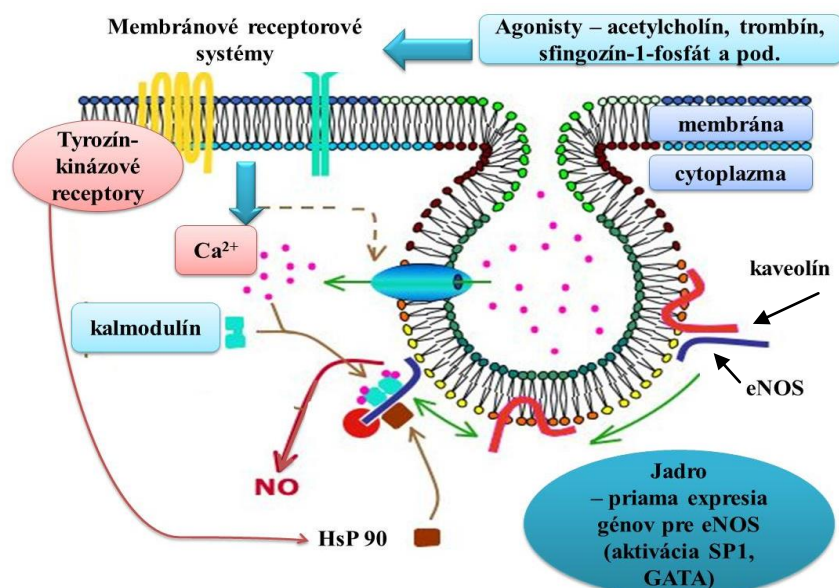
Obrázok 5. Princíp aktivácie a uvoľnenia NO prostredníctvom induktívnej NO-syntázy

* CaM – komplex kalcium/kalmodulín, iNOS – induktívna NO syntáza, NO – oxid dusnatý, Ca^{2+} -vápnik

2.1.2.3 Endotelová NO syntáza (NOS–III)

Funkcia eNOS bola prvýkrát popísaná v kardiovaskulárnom systéme a následne bola detegovaná vo vaskulárnych endotelových bunkách, v kardiomyocytoch a v epiteli viacerých štruktúr dýchacieho systému (trachea, bronchy, nos).

Endotelová NO syntáza patrí medzi membránové enzýmy s jedinečnou lokalizáciou. Je umiestnená cielene v kaveolách, malých membránových invagináciách charakterizovaných prítomnosťou kaveolínu. Oxygenázová doména eNOS obsahuje miesto pre väzbu kaveolínu-1 alebo kaveolínu-3, ktoré kompetitívne vytesňujú kalmodulín, čo má za následok aktiváciu eNOS. Väzba kalmodulínu je podobne ako pri nNOS regulovaná intracelulárnou hladinou vápnika, pričom uvoľnenie NO prebieha v krátkych pulzoch ako odpoveď na influx Ca^{2+} . Uvoľňovanie NO môže byť tiež vyvolané priamou fosforyláciou izoformy, ktorú môžu ovplyvniť špeciálne väzbové miesta napr. pre SP1 (Sephacryl phosphocellulose) a GATA (skupina transkripčných faktorov, pre ktoré je charakteristická ich schopnosť viazať sa na DNA sekvencie "GATA") a ďalšie faktory ako napr. niektoré zložky červeného vína, estrogény a pod. Dôležitá je tiež posttranslačná modifikácia eNOS, kde je popísaný napr. vplyv heat shock proteínu 90 (HsP 90; obr.6)

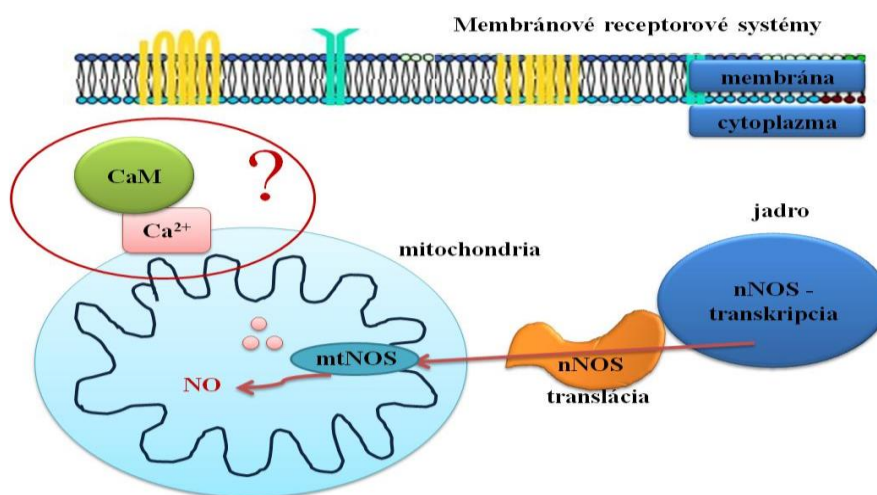


Obrázok 6. Endotelová NO syntáza, lokalizácia a mechanizmy jej regulácie
*SP1, GATA – faktory nevyhnutné pre bazálnu transkripciu v bunkách endotelu, HsP90 - heat shock proteín 90, eNOS – endotelová NO syntáza, NO – oxid dusnatý, Ca^{2+} - vápnik

Expresia tejto izoformy je ovplyvnená množstvom nielen fyziologických, ale i patofyziologických faktorov ako napr. nadmerná záťaž alebo niektoré ochorenia kardiovaskulárneho systému (poškodenie endotelu, chronická hypoxia, srdcové zlyhanie a pod.).

2.1.2.4 Mitochondriálna NO syntáza

Mitochondriálna NO syntáza bola prvýkrát identifikovaná v mitochondriách buniek pečene potkana. Experimenty vtedy potvrdili existenciu izoformy, ktorá je v úzkom kontakte s mitochondriálnou matrix, je umiestnená na vnútornej mitochondriálnej membráne a je závislá na intracelulárnej hladine Ca^{2+} . Táto závislosť podporuje názor, že mtNOS je jednou z foriem neuronálnej NO syntázy, ktorá vzniká ako jej posttranslačná modifikácia v rôznych bunkových typoch rôznych orgánov (obr.7). Mechanizmus internalizácie nNOS do mitochondrií je však neznámy. Mitochondriálna NO syntáza bola doteraz identifikovaná v mitochondriách buniek mozgu, obličiek, pečene a kostrového svalstva. Je zaujímavé, že v mitochondriách bola tiež detegovaná indukčná NO syntáza, ktorá na rozdiel od mtNOS prispievala v experimentálnych modeloch sepsy k poškodeniu mitochondrií.



Obrázok 7. Jedna z teórií existencie mtNOS ako posttranslačnej modifikácie neuronálnej izoformy NO

*CaM – komplex kalcium/kalmodulín, nNOS – neuronálna NO syntáza, mtNOS – mitochondriálna NO syntáza, NO-oxid dusnatý, Ca^{2+} - vápnik

O mitochondriálnej izoforme zatiaľ vieme že:

- je aktívna pri fyziologickej hladine O_2 a ovplyvňuje jeho využitie,
- množstvo enzýmu je transkripčne modulované prostredníctvom génu pre nNOS alebo posttranslačnými zmenami nNOS,
- je konšitutívne aktívna v závislosti na prítomnosti Ca^{2+} ,
- jej aktivita je regulovaná prítomnosťou superoxidových aniónov alebo NO samotným,
- modulácia aktivity tejto izoformy ovplyvňuje mitochondriálnu respiráciu, transmembránový potenciál a pH, čím sa podieľa na bioenergetických procesoch mitochondrie.

Úroveň expresie a aktivity mtNOS je podobne ako u predchádzajúcich izoformiem ovplyvňovaná viacerými faktormi. Je napr. nízka u embryí, počas postnatálneho života sa však jej hladina zvyšuje. Ovplyvňujú ju environmentálne faktory, chlad alebo pôsobenie niektorých hormónov.

2.1.2.5 Bakteriálna NO syntáza

S bakteriálnou NO syntázou sa v odbornej literatúre stretávame len v posledných rokoch a to najmä v spojení s biosyntézou bakteriálnych toxínov a ochranou pred voľnými radikálmi. Bakteriálna izoforma NOS je aj napriek niektorým zaujímavým rozdielom v potenciáli využitia kofaktorov či redoxného potenciálu veľmi podobná izoformám identifikovaných u človeka. Viaceré práce poukazujú na to, že NO produkovaný v baktériách ovplyvňuje účinok antibiotík a imunitnú odpoveď hostiteľa. Bakteriálna NOS je lokalizovaná predovšetkým v Gram pozitívnych baktériách, kde ňou vytvorený oxid dusnatý môže eliminovať účinok podaného antibiotika prostredníctvom priamej detoxikácie alebo sprostredkovane – cez reaktívne formy kyslíka.

V súčasnosti existuje o bakteriálnej NO syntáze len minimum údajov. Je však zrejmé, že výskum v tejto oblasti bude progredovať najmä s potenciálom hľadania selektívneho inhibítora tejto izoformy.

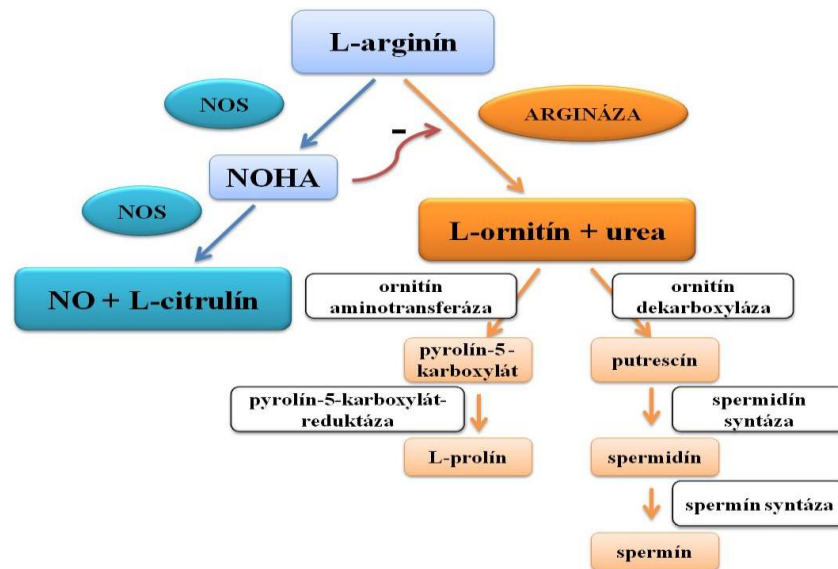
V nasledujúcej tabuľke ponúkame prehľad troch najdôležitejších izoforiem NO syntáz. Ich selektívna stimulácia alebo inhibícia umožňuje perspektívne naplno využiť ich unikátne vlastnosti v terapii viacerých ochorení ľudského organizmu. Ďalšie NO syntázy, akými sú mtNOS alebo bNOS sú stále predmetom intenzívneho výskumu.

Tabuľka 1. Izoformy NOS

	nNOS	iNOS	eNOS
Forma	konštitutívna	induktívna	konštitutívna
Počet aminokyselín	1431	1153	1203
Chromozóm	12	17	7
Typ buniek	<ul style="list-style-type: none"> neuróny neadrenergického necholinergického systému (NANC) mozgové neuróny bunky pankreasu epitel dýchacích ciest a gastrointestinálneho traktu bunky kostrového svalu 	<ul style="list-style-type: none"> imunitné a zápalové bunky bunky hladkého svalu ciev bunky hladkého svalu bronchov endotel respiračný epitel endo/myokard fibro/chondro blasty 	<ul style="list-style-type: none"> endotel epitel trombocyty endo/myokard niektoré neuróny
v bunke	cytoplazma	cytoplazma	membrána
Aktivácia	Ca ²⁺ závislá (koncentrácia Ca ²⁺ cca 500nmol/l)	Ca ²⁺ nezávislá	Ca ²⁺ závislá (koncentrácia Ca ²⁺ cca 500nmol/l)
Odpoveď	uvoľnenie NO pmol sekundy/minúty	uvoľnenie NO nmol do 2 – 6 hodín	uvoľnenie NO pmol sekundy/minúty
Induktory	<ul style="list-style-type: none"> hypoxia acetylcholín substancia P adenozíndifosfát adenozíntrifosfát serotonín glutamát β - amyloid 	<ul style="list-style-type: none"> lipopolysacharidy hypoxia TNF-α (tumor necrosis factor alfa), IL-1β (interleukín 1 beta), INF-γ (interferon gama) environmentálne polutanty alergény 	<ul style="list-style-type: none"> hypoxia acetylcholín substancia P adenozíndifosfát adenozíntrifosfát serotonín bradykinín trombín
Funkcia	regulačná	obranná / poškodzujúca	regulačná

2.2 Argináza

Ďalší z enzýmov, ktorý môže ovplyvniť syntézu oxidu dusnatého je argináza. Pôsobením tohto enzýmu vzniká z L-arginínu močovina a L-ornitín. Tie slúžia ako prekursor pre syntézu viacerých polyamínov, prolínu a glutamátu (obr.8).



Obr.8 L-arginín ako substrát pre arginázu (kompetícia s NO syntázami)

* NOS –NO syntázy, NOHA -N^o-hydroxy-L-arginín, NO – oxid dusnatý

V ľudskom organizme sa nachádzajú dve izoformy arginázy, ktoré sú exprimované konštitutívne alebo na základe viacerých indukčných podnetov v patofyziologických podmienkach.

- **Argináza I (hepatálny typ – cytozolový enzým)** je lokalizovaná prevažne v cytozole pečenečných buniek a jej deficit spôsobuje arginínémiu charakterizovanú zhoršením mentálnej úrovne, retardáciou rastu a spasticitou. V niektorých prípadoch je sprevádzaná hyperamonémiou a môže skončiť aj smrteľne.
- **Argináza II (extrahepatálny typ – mitochondriálny enzým)** je exprimovaná hlavne v obličkách a prostate a v malých množstvách tiež v pečeni, pľúcach, štítnej žľaze a tenkom čreve. Participuje na syntéze prolínu, ktorý tvorí súčasť bielkovín a rôznych polyamínov, ktoré kontrolujú bunkovú proliferáciu a produkciu kolagénu.

O argináze sa v posledných rokoch hovorí hlavne v súvislosti s patogenézou vzniku viacerých ochorení ako sú napr. pľúcne ochorenia (astma), cievne ochorenia (ateroskleróza), poruchy imunitného systému (infekcie) či onkologické ochorenia. V mnohých prípadoch táto pozícia súvisí s poruchou homeostázy NO.

Argináza a NO syntázy spolu súťažia o substrát – L-arginín a to vo fyziologických i v patologických podmienkach. Indukcia ktorejkoľvek izoformy arginázy môže znížiť biologickú dostupnosť L-arginínu pre syntézu NO a oslabiť tak účinky závislé na prítomnosti NO v organizme. V súčasnosti nie je úplne jasné, ktorá izoforma je v kompetícii o substrát dominantnejšia, predpokladá sa však, že do regulácie biologickej dostupnosti L-arginínu pre syntézu NO je zapojená prevažne argináza II. Afinita NO syntáz k L-arginínu je asi 1000 x väčšia ako afinita arginázy. Na druhej strane, maximálna aktivita arginázy už vo fyziologických podmienkach výrazne prevyšuje aktivitu NO syntáz. Kým aktivita pečenej arginázy u potkana je cca 1400 $\mu\text{mol/l/min/mg}$, aktivita NO syntáz je v tých istých podmienkach cca 1 $\mu\text{mol/l/min/}$. V patologických podmienkach sa táto rýchlosť môže ešte zvýšiť, čo urýchli utilizáciu substrátu arginázou a zníži produkciu oxidu dusnatého. NO syntázy sa bránia vyčerpaniu substrátu prostredníctvom medziproduktu tvorby NO - N^{ω} -hydroxy-L-arginínu (NOHA), ktorý pôsobí ako prirodzený kompetitívny inhibítor arginázy. Na regulácii sa tiež podieľa samotný NO, ktorý reakciou s voľnými radikálmi poškodzuje zvyšky cysteínu arginázy.

Literárne zdroje poukazujú i na fakt, že zvyčajne dochádza k súčasnému ovplyvneniu expresie a aktivity enzýmov spracujúcich L-arginín. Medzi faktory stimulujúce aktivitu oboch enzýmov patria napr. lipopolysacharidy. Ich pôsobením dochádza k indukcii expresie nielen indukčnej NO syntázy, ale zároveň oboch izoform arginázy. Interleukín- 1β zvyšuje expresiu iNOS, ale zároveň znižuje expresiu a aktivitu arginázy. Hyperoxia vyvoláva zvýšenie expresie oboch izoform arginázy, ale paralelný pokles iNOS. Hypoxia, alebo anoxia zvyšuje expresiu arginázy I a iNOS, ale znižuje expresiu mRNA arginázy II. Existencia ďalších faktorov ovplyvňujúcich expresiu a aktivitu uvedených enzýmov je viazaná na konkrétny systém, orgán či tkanivo, prípadne na stav organizmu.

Presné zapojenie jednotlivých izoform do fyziologických a patofyziologických procesov, v ktorých figuruje aj dysbalancia hladín resp. narušená homeostáza NO však

zatiaľ nie je známe. Nemožno však vylúčiť, že ovplyvnenie aktivity arginázy môže v budúcnosti predstavovať ďalšiu strategickú možnosť terapeutického ovplyvnenia viacerých závažných ochorení.

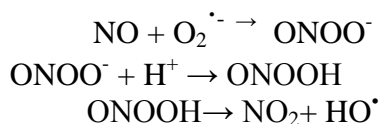
Kontrolné otázky:

1. Ako prebieha biosyntéza oxidu dusnatého?
2. Ako rozdeľujeme NO syntázy?
3. Ktoré NO syntázy patria medzi konštitutívne a prečo?
4. Aká je základná funkcia indukčnej NO syntázy?
5. Ako argináza participuje v biosyntéze NO a aké jej izoformy poznáte?

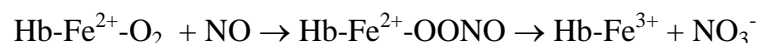
3. FARMAKOKINETIKA OXIDU DUSNATÉHO

Exogénny NO sa dostáva do tela prevažne inhalačne. Je veľmi lipofilný a ľahko prestupuje do buniek pasívnou difúziou. Približne 90% NO je absorbovaného počas inspirácie v pľúcnom vaskulárnom systéme. V pľúcnej cirkulácii sa veľmi rýchlo viaže na hem hemoglobínu v krvných elementoch. Jeho biologický polčas tvoria zlomky sekúnd (0,1 - 0,5 s). V cirkulácii pri dostatočnej saturácii kyslíka v rozmedzí 60 - 100% je konečným produktom metabolizmu NO methemoglobín a nitráty. Nitrát ako prevládajúci metabolit NO je následne vylúčený močom. Pri poklese saturácie NO reaguje s deoxyhemoglobínom za vzniku nitrozyhemoglobínu, ktorý sa následne mení na nitrit a methemoglobín. Premena NO na nitráty je hlavnou metabolickou cestou pre oxid dusnatý v ľudskom organizme.

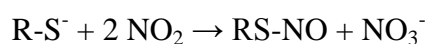
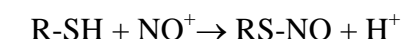
Endogénny NO má vlastnosti voľného radikálu. Jeho vysoká reaktivita závisí od jeho fyzikálnych vlastností. Je to veľmi malá molekula, vysoko difúzna, rozpustná v tukoch i vo vode, s veľmi krátkym biologickým polčasom (5 - 10 s), ktorá obsahuje jeden voľný elektrón. Tieto vlastnosti mu umožňujú ľahko prenikať do buniek a tkanív a zvyšujú možnosť interakcie s množstvom molekúl ako sú napr. proteíny obsahujúce tiolové skupiny, lipidy, superoxid, hem a železo. Reaguje s biologickými molekulami, ktoré majú nespárené elektróny, predovšetkým s kyslíkom za vzniku reaktívnych foriem kyslíka (ROS – reactive oxygen species). K nim patrí superoxidový anión ($O_2^{\cdot-}$), s ktorým NO vytvára cytotoxický peroxynitritový anión ($ONOO^-$). Z neho následne vzniká biologicky deštruktívny hydroxylový radikál (HO^{\cdot}) toxický pre základné substráty bunky – nukleové kyseliny, proteíny a lipidy.



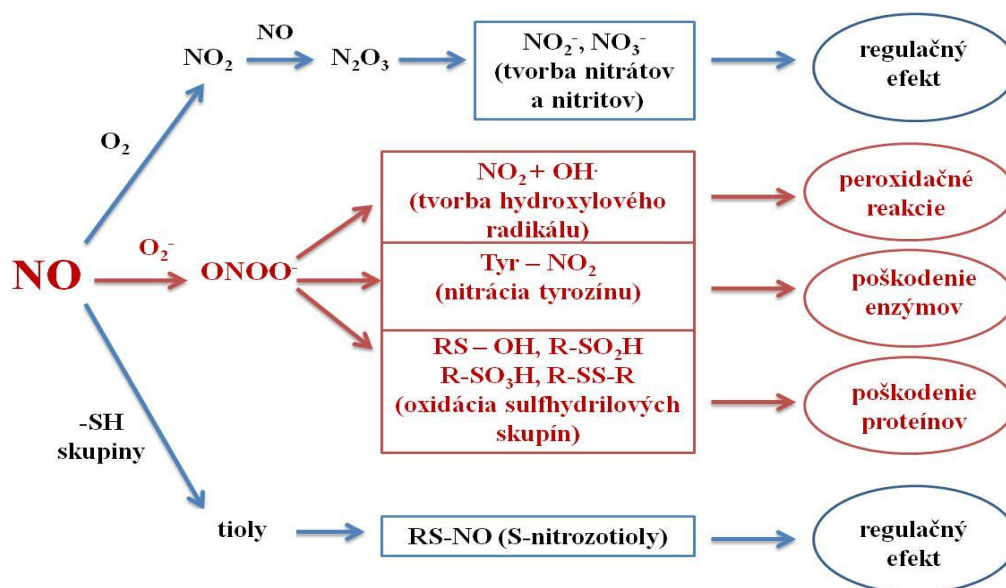
Aj endogénny, podobne ako exogénny NO sa viaže na hemoglobín a je metabolizovaný na nitrity a nitráty, ktoré sú následne vylúčené močom. Priemerná exkrécia nitrátov predstavuje 0,3-2 ml NO_3^- v priebehu 24 hodín.



Časť NO cirkuluje v plazme viazaná na -SH skupiny albumínu. Reakciou s tiolmi - cysteínom alebo glutatiónom sa vytvára zásobná a transportná forma NO - tzv. S-nitrozotiolu. Významnú úlohu v množstve rôznych enzýmových, ale aj neenzýmových antioxidačných reakcií je glutatión (GHS). Táto reakcia je napr. základom účinku nitroglycerínu.



Prehľad základných chemických reakcií NO vo vzťahu k predpokladanému účinku znázorňuje nasledujúci obrázok.



Obrázok 9. Hlavné chemické reakcie oxidu dusnatého

Kontrolné otázky:

1. Aký je biologický polčas exogénneho a endogénneho NO?
2. Hlavnými metabolickými produktami oxidu dusnatého sú...
3. Ktoré reaktívne formy kyslíka vznikajú v interakcii s NO?
4. Aký je hlavný význam reakcií NO s tiolmi?

4. MECHANIZMUS ÚČINKU OXIDU DUSNATÉHO

Účinok NO môžeme vo všeobecnosti charakterizovať ako duálny. Kým jeho „optimálne množstvá“ zabezpečujú viaceré fyziologické procesy prebiehajúce v ľudskom organizme, nadprodukcia NO sa objavuje v patogenéze mnohých lokálnych i systémových ochorení. Po stimulácii niektorej izoformy NO syntázy dochádza k tvorbe oxidu dusnatého, ktorý následne pôsobí buď vo svojej voľnej forme ($\text{NO}\bullet$), alebo viazaný na -SH skupiny tiolov, ktoré stabilizuje. Následne môže účinkovať priamo alebo nepriamo. **Priamy účinok** je zabezpečený buď aktiváciou rozpustnej guanylát cyklázy a následne druhým poslom - cyklickým guanozínmonofosfátom (cGMP), alebo priamymi interakciami na bunkovej úrovni (napr. aktivácia iónových kanálov). **Nepriamy účinok** je obvykle spojený s tvorbou reaktívnych foriem kyslíka.

4.1 Priamy účinok NO

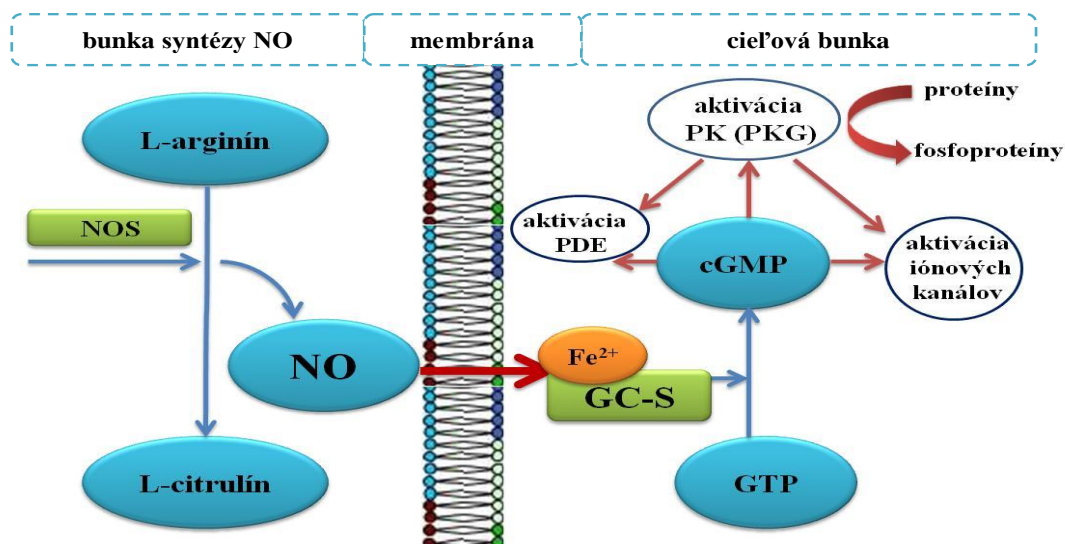
NO je uvoľňovaný po syntéze v bunkách do okolia. Táto difúzia je ovplyvnená napr. depolarizáciou membrány alebo pôsobením viacerých mediátorov. NO prechádza najmä cez membrány buniek v okolí, kde pôsobí ako signálna molekula k zmene funkcie cieľových proteínov a biologických procesov. Podobným mechanizmom pôsobí aj NO uvoľňovaný zo zásobných - tiolových foriem. Následne sa viaže na Fe^{2+} hemu rozpustnej guanylát cyklázy (GC-S) a mení jej aktivitu. Výsledkom je premena guanozíntrifosfátu (GTP) na cyklický guanozínmonofosfát. Ten následne aktivuje cGMP-závislé proteínkinázy. Proteínkinázové izoformy v ďalších fázach pôsobenia:

- katalyzujú fosforyláciu rôznych proteínov,
- aktivujú alebo inhibujú niektoré typy iónových kanálov (vápnikové, draslíkové),
- regulujú aktivitu fosfodiesteráz (obr.10).

Výsledkom toho sú rôzne bunkové procesy, ako napr. relaxácia buniek hladkého svalu ciev, bronchov a gastrointestinálneho traktu, zlepšenie permeability endotelu, neuronálna plasticita, zlepšenie kognitívnych funkcií, ovplyvnenie génovej transkripcie a mnohé iné.

Dôkladné pochopenie tejto signálnej cesty, jej vlastností a funkcií je dôležité pre využitie jej potenciálu pri nových farmakologických intervenciách predovšetkým

v oblasti terapie kardiovaskulárných ochorení ako je napr. systémová alebo pľúcna hypertenzia, ateroskleróza, endotelová dysfunkcia, erektilná dysfunkcia a pod.



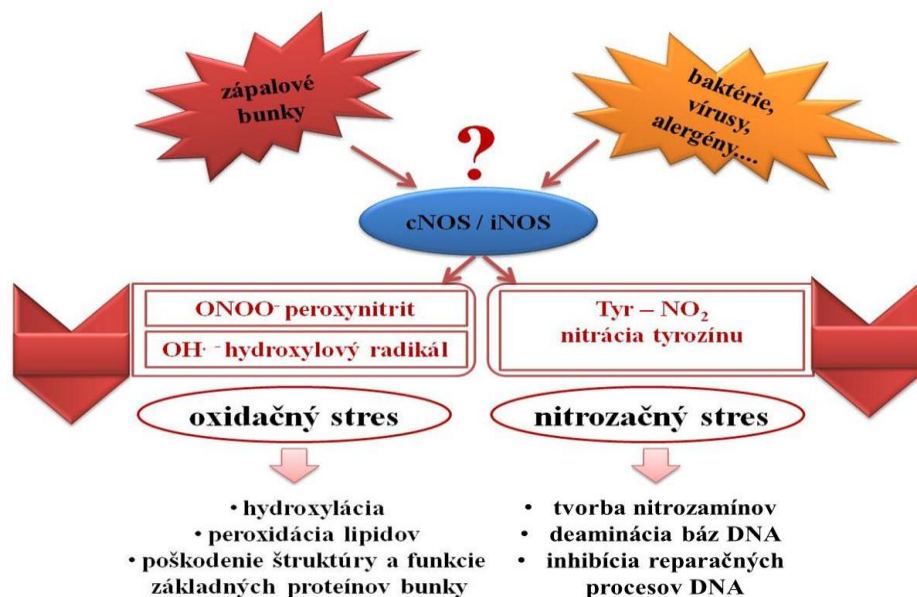
Obrázok 10. Účinok oxidu dusnatého sprostredkovaný signálnou cestou NO-GC-S
 *NO- oxid dusnatý, NOS – NO syntázy, PDE – fosfodiesterázy, cGMP – cyklický guanozínmonofosfát,
 GTP – guanozíntrifosfát, GS-S – rozpustná guanylát cykláza, Fe^{2+} - železo, PK – proteínkinázy,
 PKG – proteínkináza G

Z nedávnych štúdií vyplýva, že NO môže aktivovať draslíkové kanály (hlavne vysoko vodivý na vápniku závislý K^+ kanál - BK_{Ca}) a ATP senzitívny draslíkový kanál (K_{ATP}) v hladkom svalu, neurónoch, bunkách endotelu, bunkách črevného epitelu a pod. aj prostredníctvom **cGMP nezávislých mechanizmov**. Po aktivácii dochádza k hyperpolarizácii membrány a k zníženiu koncentrácie Ca^{2+} iónov, čo vedie napr. k relaxácii hladkého svalu ciev a bronchov.

4.2 Nepriamy účinok NO

Nepriamy účinok mnohí autori označujú ako účinok cytotoxický resp. účinok sprostredkovaný voľnými radikálmi. Nepriame účinky NO je možné ďalej rozdeliť na účinky vyvolané oxidačným stresom a účinky vyvolané nitrozačným stresom (obr.11). Kým oxidačný stres je popisovaný v patogenéze ochorení spojených napr. s chronickým zápalom, nitrozačný stres môže za určitých podmienok viesť k tvorbe karcinogénnych nitrozamínov. Tvorba produktov oxidačného a nitrozačného stresu je kontrolovaná množstvom NO, superoxidu, prítomnosťou mangánu, superoxiddismutázy (SOD)

a ďalších oxidantov. Hlavným výsledkom tohto pôsobenia je poškodenie lipidov, proteínov a DNA s následnou patologickou dysfunkciou na úrovni tkanív a orgánov.



Obrázok 11. Schematické znázornenie nepriameho účinku oxidu dusnatého
 *DNA – deoxyribonukleová kyselina, cNOS – konštitutívne NO syntázy, iNOS – indukčná NO syntáza

Pri tzv. nepriamych reakciách pôsobí NO aj ako modulátor génovej expresie, pričom uplatňuje svoju schopnosť meniť štrukturálnu integritu a aktivitu transkripčných faktorov, z ktorých najdôležitejší je nukleárny faktor- κ B (NF- κ B). Je to proteínový transkripčný faktor potrebný pre transkripciu mnohých prozápalových molekúl, enzýmov (iNOS a COX-2), cytokínov (IL-1 β , TNF- α a IL-6) a chemokínov (IL-8). Aktivácia tohto faktora môže vyvolať procesy, na konci ktorých je zvýšená expresia iNOS (ale aj ďalších molekúl a enzýmov), zvýšená tvorba NO a ďalších produktov, ktoré môžu byť dôležitým faktorom tkanivového poškodenia napr. v podmienkach chronického zápalu.

Kontrolné otázky:

1. Akými mechanizmami je zabezpečený priamy účinok NO?
2. Aké procesy sú výsledkom priameho účinku NO sprostredkovaného cGMP?
3. Akými mechanizmami je zabezpečený nepriamy účinok NO?
4. Aké procesy sú výsledkom nepriameho účinku NO?

5. ZÁKLADNÉ ÚČINKY OXIDU DUSNATÉHO

V ľudskom tele je NO dôležitým regulátorom fyziologických funkcií ako je napr. vazodilatácia či prenos nervových vzruchov. V patologických podmienkach môžu jeho vysoké koncentrácie pôsobiť buď priaznivo (napr. antibakteriálne, antiparazitárne a antivírusové), alebo môžu byť škodlivé (prozápalové). Preto je potrebné podrobne poznať účinky NO v jednotlivých systémoch ľudského organizmu a pri farmakologickej modulácii používať látky ovplyvňujúce jeho hladinu tak, aby boli maximalizované pozitívne účinky a minimalizované negatívne dopady. Mechanizmy endogénnej produkcie NO a jeho účinku sú zložité a práve z tohto dôvodu je nevyhnutné venovať príslušnú pozornosť základom fyziológie a patofyziológie tohto mediátora.

5.1 Oxid dusnatý a nervový systém

Oxid dusnatý významne ovplyvňuje centrálny i periférny nervový systém. V tomto systéme patrí NO k najatypickejším neurotransmiterom. Pretože je plyn, nie je uskladňovaný v synaptických vezikulách a syntetizovaný na základe požiadaviek neurónov. Vytvára sa na základe požiadaviek organizmu, nepôsobí na receptory ale difúziou rýchlo preniká do blízkych neurónov. Signálna funkcia NO je inter- i intracelulárna. V nervovom systéme má množstvo fyziologických i patologických účinkov a je možné ho v tomto kontexte označiť ako neuromodulačnú, neuroprotektívnu ale i neurotoxickú látku.

5.1.1 Centrálny nervový systém

V centrálnom nervovom systéme je NO syntetizovaný prevažne prostredníctvom nNOS. Tá je exprimovaná hlavne v oblasti mozgovej kôry, claustra, čuchového jadra, striata, amygdaly, hippocampu, hypotalamu, talamu a cerebella. Neuronálna izoforma bola tiež detegovaná v astrocytoch a cievach zásobujúcich mozog.

K základným fyziologickým účinkom NO v centrálnom nervovom systéme patrí regulácia alebo kontrola neuronálnej morfogénzy, kontrola sexuálneho a agresívneho správania, kontrola príjmu potravy, kontrola vzniku a vnímania bolesti,

regulácia krátkodobej a dlhodobej synaptickej plasticity pri kontrole spánku, termoregulácie, neurosekrécie a prietoku v mozgu.

Veľmi zaujímavým je prepojenie NO s NMDA (kys. N-metyl- D-asparágová) receptormi. Časté a pravidelné uvoľňovanie NO môže byť dôležitým faktorom potenciácie synaptického prenosu v tomto spojení. NMDA v experimentálnych podmienkach aktivuje syntézu oxidu dusnatého z L-arginínu a NO môže sprostredkovať odpovede na excitačné aminokyseliny (aspartát, glutamát). Vo vzťahu k NMDA má NO neuroprotektívny i neurotoxický efekt. Neuroprotektívny účinok je spôsobený down reguláciou NMDA receptorov. Pri nadmernej tvorbe NO môže prostredníctvom S-nitrozylácie na tiolovom mieste NMDA receptora zablokovat' receptor a tým aj glutamátovú neurotransmisii. Neurotoxický efekt je spôsobený cestou tvorby voľných radikálov – hlavne superoxidového aniónu.

Oxid dusnatý sa čiastočne podieľa aj na *kontrole príjmu potravy*. Opakované podávanie látok blokujúcich syntézu tohto mediátora znížilo chuť do jedla a telesnú hmotnosť obéznych experimentálnych zvierat (potkany, myši).

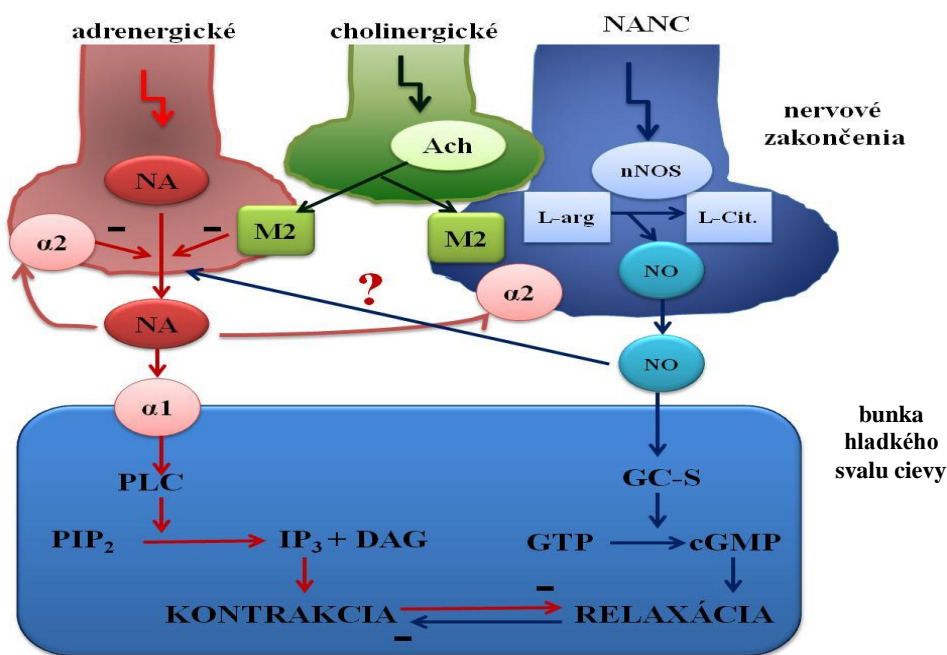
Vysoké koncentrácie NO pôsobia tiež prokonvulzívne a vyvolávajú migrenózne bolesti. Oxid dusnatý produkovaný v spinálnej mieche spolu s NO v periférnom nervovom systéme sa podieľa aj na *proprioceptívnej a nociceptívnej transmisii*. Z literárnych údajov je známe, že inhibítory NO syntáz dokážu inhibovať účinky opiátových analgetík.

V patologických podmienkach sa účinky NO spájajú s neuronálnym poškodením a neurodegeneratívnymi ochoreniami vrátane Parkinsonovej choroby, Alzheimerovej demencie, Huntingtonovej choroby a pod. V patogenéze týchto ochorení je popisovaná súvislosť NO predovšetkým s nitrozyláciou tyrozínu, excitotoxicitou, inhibíciou mitochondriálneho respiračného komplexu, fragmentáciou bunkových organel a pod.

5.1.2 Periférny nervový systém

Nervové vlákna produkujúce a uvoľňujúce NO nepatria k sympatikovej ani k parasympatikovej vetve autonómneho nervového systému a bývajú často označované ako neadrenergické – necholinergické (NANC). Tento systém môžeme podľa

prevažujúcej aktivity rozdeliť na excitačný (eNANC) a inhibičný (iNANC). Oxid dusnatý je hlavným mediátorom iNANC systému. Na periférii je nNOS lokalizovaná predovšetkým v iNANC zakončeníach dýchacích ciest, gastrointestinálneho traktu (GIT) a urogenitálneho systému (UGS). V periférnom nervovom systéme reguluje NO predovšetkým relaxáciu buniek hladkého svalstva čriev (hlavne relaxácia sfinkterov), močového mechúra, UGS (inervácia corpus cavernosum penisu a klitoris) a relaxáciu ciev. Ako významný neurotransmitter inhibičného NANC systému sa oxid dusnatý spolu s cholinergickým a adrenergickým systémom zúčastňuje regulácie krvného prietoku, bronchiálneho tonusu a hrá tiež modulačnú úlohu pri zápalových ochoreniach (obr.12). Jeho aktivita je závislá na mnohých faktoroch ako je napr. množstvo a aktivita syntetizujúcich enzýmov, kofaktorov, úroveň oxidačného stresu alebo rýchlosť metabolismu antioxidantných molekúl. Jednotlivé oblasti jeho pôsobenia budú podrobnejšie rozpracované v ďalších kapitolách.



Obrázok 12. Koordinácia regulácie krvného prietoku (na úrovni buniek hladkého svalstva ciev prevažne s adrenergickým systémom)

*NA-noradrenalin, α_2 -presynaptický adrenergický receptor, α_1 -postsynaptický adrenergický receptor, Ach-acetylcholin, M2-presynaptický muskarínový receptor, PLC-fosfolipáza C, PIP_2 -fosfatidylinozitol 4,5 bifosfát, IP_3 -inozitoltrifosfát, DAG-diacylglycerol, NO-oxid dusnatý, L-arg-L-arginín, L-cit.-L-citrulín, nNOS-neuronálna NO syntáza, GTP-guanozíntrifosfát, cGMP-cyklický guanozínmonofosfát, GC-S-rozpustná guanylát cykláza

V patologických podmienkach môže NO vyvolať neuronálny blok pri skleróze multiplex, alebo dokonca spôsobiť totálnu stratu prenosu akčného potenciálu v myelinizovaných i nemyelinizovaných vláknach periférneho nervového systému. Z literatúry je známe, že toto ochorenie sa okrem iného vyznačuje aj rozšírením zápalu v centrálnom a periférnom nervovom systéme, pričom za jeden z dôležitých faktorov zápalu v týchto podmienkach je považovaný práve oxid dusnatý.

5.2 Kardiovaskulárny systém

5.2.1 Cievny systém

Pozícia oxidu dusnatého ako signálnej molekuly v kardiovaskulárnom systéme je veľmi aktuálna nielen v oblasti základného výskumu ale aj v klinickej kardiológii. Väčšina odborníkov sa zhoduje v tom, že NO je veľmi účinný a silný marker kardioprotekcie a preto má táto molekula aj veľkú budúcnosť tak v prevencii ako aj terapii ochorení KVS akou je napr. ischemická choroba srdca.

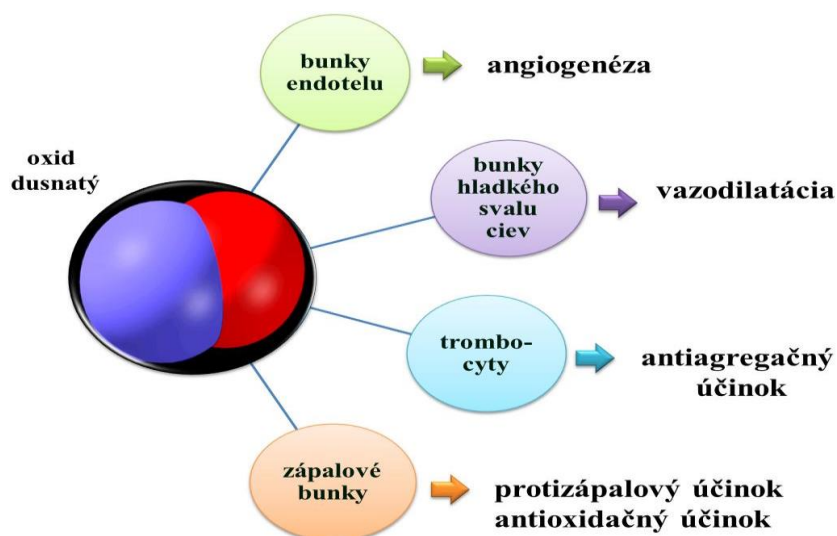
Jedným zo **základných fyziologických účinkov NO** je vazodilatačný efekt. Účinok bol demonštrovaný pomocou inhibítorov NO syntáz, ktoré vyvolali kontrakciu ciev v pokusoch in vitro a hypertenziu po aplikácii in vivo. Oxid dusnatý je v kardiovaskulárnom systéme vytváraný prevažne endotelovou izoformou NOS. Bazálne uvoľňovanie NO z L-arginínu hrá dôležitú úlohu v *regulácii krvného prietoku a krvného tlaku*. Oxid dusnatý je kontinuálne uvoľňovaný v arteriálnej časti vaskulárneho systému človeka a reguluje tonus v mikrocirkulácii. Za *hlavné stimuly* jeho tvorby a následného uvoľnenia sú považované prúdenie krvi a tlak v cievach. Úloha NO v udržiavaní cievnej homeostázy je dobre definovaná. Vychádza z pôvodnej teórie, ktorá hovorí o tom, že po vytvorení NO v endoteli ciev sa tento mediátor jednoduchou difúziou alebo pomocou zatiaľ neznámeho transportného systému šíri do buniek hladkého svalstva ciev. Tam sa naviaže na Fe^{2+} hemu v GC-S, zvýši hladinu cGMP v bunkách hladkého svalstva, zníži intracelulárnu koncentráciu Ca^{2+} a výsledkom je relaxácia ciev.

Endotelové bunky majú množstvo receptorov reagujúcich na rôzne chemické podnety (hormóny, mediátory). Majú tiež vyvinutý systém detekcie fyzikálnych zmien

vrátane zmien elasticity, tlaku a viskozity. Relatívne rýchla adaptácia krvných ciev na tieto signály je zabezpečená práve produkciou a uvoľnením NO. To znamená, že krvné cievy nie sú len pod kontrolou nervového a hormonálneho systému, ale do značnej miery sú ovplyvňované lokálnym autonómnym systémom, ktorý je zastúpený hlavne oxidom dusnatým. Bazálna produkcia NO sa zúčastňuje regulácie krvného prietoku v mozgu, srdci, pľúcach, GITe a obličkách. Je tiež možné, že táto regulácia je sprostredkovaná otvorením kalciových kanálov v endotelových bunkách (napr. vplyvom sily prietoku), čo vedie ku Ca^{2+} -závislej aktivácii eNOS a zvýšeniu lokálnej produkcie oxidu dusnatého.

Okrem toho má NO aj *účinnok antitrombotický a protizápalový*, pričom kombinácia týchto účinkov bráni poškodeniu endotelu. Kým inhibícia adhézie trombocytov je sprostredkovaná cGMP, pri inhibícii agregácie sa uplatňuje cyklický adenosínmonofosfát (cAMP). Inhibuje tiež adhéziu a agregáciu leukocytov.

Prehľad základných fyziologických účinkov NO v cievnom systéme prezentuje nasledujúci obrázok.



Obrázok 13. Základné fyziologické účinky oxidu dusnatého v cievnom systéme

V prípade zníženia biologickej dostupnosti NO dochádza k porušeniu jeho fyziologickej akcie a vzniku **endotelovej dysfunkcie**. Tento symptóm sa objavuje pri viacerých prevažne metabolických ochoreniach ako napr. diabetes,

hypercholesterolémia, ale tiež pri hypertenzii, malárii či u fajčiarov a je jedným zo základných faktorov v patofyziológii aterosklerózy. Endotelová dysfunkcia môže spôsobiť lokálny deficit NO, ktorý vedie k agregácii trombocytov. Je tiež známe, že deficit NO vedie k zvýšeniu vaskulárnej kontrakcie a zvyšuje možnosť bunkovej adherencie a infiltrácie v cievach. V experimentoch na zvieratách sa zistilo, že inhibícia NO syntézy spôsobí zväčšenie aterosklerotických plátov.

Pri zvýšení produkcie NO môže dôjsť k prehĺbeniu vaskulárnej relaxácie s následným poklesom tlaku. Tento mechanizmus sa uplatňuje pravdepodobne pri septickom šoku v podmienkach, kde infekcia vedie ku kardiovaskulárnemu kolapsu.

5.2.2 Srdce

Úloha oxidu dusnatého v srdci je definovaná menej. V súvislosti s myokardom sú stále zaznamenávané mnohé protichodné experimentálne pozorovania v rámci fyziologických i patofyziologických experimentov, čo vedie k „frustrácii“ viacerých výskumníkov. V myokarde boli detegované všetky tri izoformy NOS. Sú lokalizované v endotelových bunkách koronárnych ciev alebo priamo v kardiomyocytoch. Neuronálna izoforma NOS je prítomná v sinoatriálnom uzle a predstavuje dôležitý modulátor presynaptického vplyvu vagu facilitáciou uvoľňovania acetylcholínu.

Fyziologický účinok NO na činnosť srdca sa výrazne líši v závislosti od toho, ktorá izoforma je aktivovaná. Podobne ako v ostatných systémoch aj v súvislosti s myokardom sú vo fyziologických podmienkach aktívnejšie konštitutívne izoformy, kým v patologických podmienkach je to izoforma indukčná. Vtedy dochádza k zvýšeniu reaktivity NO s viacerými molekulami, tvorbe reaktívnych foriem kyslíka a poškodeniu myokardu. V srdci oxid dusnatý pôsobí cGMP závislými i nezávislými mechanizmami. Bol popísaný klasický cGMP-PKG sprostredkovaný účinok, ale aj nitrozylácia viacerých srdcových proteínov. Okrem toho boli v srdci detegované aj externé zdroje oxidu dusnatého, ktorý sa tam dostáva difúziou z plazmy a intersticiálnej tekutiny.

Základné **fyziologické účinky NO** sa dajú rozdeliť podľa lokalizácie na účinky týkajúce sa:

- *koronárneho obehu* – zlepšenie vazodilatácie, resp. zlepšenie koronárnej perfúzie, zníženie agregácie trombocytov, zvýšenie protizápalovej funkcie a zníženie endotelovej dysfunkcie;
- *kardiomyocytov* – zníženie apoptózy, zvýšenie prežívania, zníženie spotreby kyslíka;
- *myokardu* – fetálny a postnatálny rast a vývoj, antihypertrofický efekt, zvýšenie ischemickej tolerance resp. kardioprotektívny efekt proti ischemickému poškodeniu, rast a proliferácia buniek
- *prevodového systému srdca* – ovplyvnenie srdcového rytmu - negatívny chronotropný efekt,
- *ovplyvnenie kontrakility* – negatívny inotropný efekt.

Tieto účinky sú pravdepodobne spôsobené cestou NO/cGMP, ale tiež ovplyvnením lokálneho mitochondriálneho metabolizmu, reguláciou koncentrácie vápnikových iónov v kardiomyocytoch a reguláciou vplyvu autonómneho nervového systému.

V experimentálnych štúdiách boli dokázané protektívne účinky NO na ischémiu myokardu. Tento efekt by mohol byť dôležitým pre hľadanie nových možností kardioprotektívnej liečby. Existuje niekoľko predpokladaných mechanizmov „protektivity“ NO, väčšina z nich je však sprostredkovaná druhým poslom, signálnou dráhou NO/cGMP.

O patologickom pôsobení oxidu dusnatého v myokarde existujú rozporuplné údaje. Súvisia predovšetkým s tvorbou voľných kyslíkových radikálov, ktoré poškodzujú srdce a vedú k apoptóze a následnej nekróze kardiomyocytov. Pri poruche homeostázy NO boli tiež pozorované poruchy rytmu a poškodenie srdca v súvislosti s ischemickými príhodami, prípadne endotelovou dysfunkciou koronárnych ciev.

5.3 Dýchací systém

Endogénny ako aj exogénny NO má výrazne pozitívny vplyv v prevencii kontrakcie hladkého svalstva hlavne vo veľkých dýchacích cestách. V súvislosti s tým sa tiež predpokladá priaznivé pôsobenie S-nitrozotiolov, ktoré sa ako zásobná forma NO môžu podieľať na regulácii bronchodilatácie. Regulácia bronchomotorického

tonusu patrí k hlavným fyziologickým účinkom NO v dýchacích cestách. Ďalšie účinky sú prezentované v nasledujúcej tabuľke:

Tabuľka 2. Základné fyziologické a patologické účinky NO v dýchacích cestách

Cieľ pôsobenia	Fyziológia	Patofyziológia
Hladký sval dýchacích ciest	Relaxácia - bronchodilatácia	<ul style="list-style-type: none"> • $\uparrow\downarrow$ hyperreaktivity v závislosti od stupňa aktivity iNOS • proliferácia a obštrukcia
Hladký sval ciev	Relaxácia - vazodilatácia	<ul style="list-style-type: none"> • \uparrow odplavovanie bronchokonstrikčných mediátorov • \uparrow exudácia a vznik edému
Imunitný systém	Protizápalový účinok: <ul style="list-style-type: none"> • \downarrow funkcie a chemotaxie leukocytov • \downarrow aktivácie mastocytov Antivírusový, antibakteriálny a antiparazitický účinok	Prozápalový účinok: <ul style="list-style-type: none"> • \uparrow infiltrácie eozinofilmi • \uparrow cievnej permeability • \uparrow zúženie dýchacích ciest
Epitel	Regulácia mukociliárneho klirensu: <ul style="list-style-type: none"> • \uparrow frekvencie pohybu riasiniek • \downarrow viskozity hlienu 	Regulácia mukociliárneho klirensu: <ul style="list-style-type: none"> • $\downarrow\uparrow$ sekrécia hlienu

Je samozrejmé, že aj v pľúcach *reguluje NO cievny tonus* a prietok krvi pľúcami. Uvoľnenie NO bunkami endotelu v pľúcnej cirkulácii reguluje bazálny cievny tonus a bráni vazokonstrikcii. Na pôsobenie NO na mikrovaskulatúru a cievnu permeabilitu však zatiaľ neexistuje jednoznačný názor.

Je známe, že oxid dusnatý produkovaný najmä konštitutívnymi izoformami má svoju úlohu aj *pri vývine pľúc*. Zvýšená aktivita týchto izoformiem bola pomocou imunohistochemických vyšetrení detegovaná v bronchiálnom epiteli plodu. Predpokladá sa, že vzostup expresie predovšetkým eNOS môže prispievať k angiogenéze a tým k rastu pľúc. Niektorí autori tiež podporujú názor, že zvýšenie aktivity oboch konštitutívnych izoformiem bezprostredne po pôrode môže zlepšiť funkciu respiračného systému.

Pri inhibícii tvorby NO znížením aktivity NOS dochádza aj k inhibícii tvorby surfaktantu. Inhibíciou cGMP ako druhého posla došlo k poklesu tvorby surfaktantu až o 64%. Tieto závery potvrdzujú, že pre adekvátnu produkciu pľúcneho surfaktantu sú

potrebné fyziologické koncentrácie NO, pričom tento vzťah je sprostredkovaný do určitej miery zvýšením hladiny cGMP a aktiváciou proteínkinázy G. Nadprodukcia NO spojená s tvorbou voľných radikálov však môže na druhej strane inhibovať funkciu pľúcneho surfaktantu vyvolaním peroxidácie lipidov a poškodením proteínov surfaktantu.

Endogénny NO *stimuluje aktivitu submukózných žliaz* dýchacieho systému s následným zvýšením tvorby hlienu. Tieto zistenia boli potvrdené aplikáciou donorov NO, po ktorých sa sekrécia hlienu výrazne zvýšila a tiež použitím inhibítorov NO syntáz, ktoré sekréciu hlienu potlačili. Tým sa potvrdil názor, že sekrécia hlienu v dýchacích cestách je sprostredkovaná mechanizmom zahrňujúcim intracelulárnu produkciu NO. Tvorba a vlastnosti hlienu výrazne *ovplyvňujú mukociliárny transport*, na kontrole ktorého sa v dýchacích cestách zúčastňuje aj NO. Mukociliárny klírens je dôležitým obranným mechanizmom, ktorý je zvýšený napr. pôsobením prozápalových cytokínov. Stimulačný efekt cytokínov bol v experiment potlačený podaním inhibítorov NO syntáz a stimulovaný aplikáciou L-arginínu, čo potvrdzuje zapojenie NO do regulácie ciliárnej motility.

V patogenéze ochorení respiračného systému (vrátane alergických) je dôležité pôsobenie oxidu dusnatého na úrovni imunitného systému, konkrétne signálnych procesov medzi T-lymfocyty a makrofágmi spolu s moduláciou produkcie a funkcie nimi produkováných cytokínov, chemokínov a rastových faktorov. Konečný efekt jeho pôsobenia (protektívny alebo toxický) aj v tomto prípade závisí na type aktivovanej izoformy NOS, jeho koncentrácii, mieste produkcie, prípadne reakcii s ďalšími substrátmi.

Z patologického pôsobenia NO je zaujímavá aj jeho významná pozícia v ovplyvnení *proliferatívnej funkcie hladkého svala* predovšetkým v stene bronchov, čo sa prejaví ich zúžením a obštrukciou. K zvýšeniu proliferácie prispieva okrem zvýšenej aktivity proliferatívnych faktorov napríklad aj priama inhibícia NO. Niektorí autori dokázali, že exogénne podanie NO alebo aplikácia donorov NO znížilo proliferáciu hladkého svala dýchacích ciest prostredníctvom mechanizmov závislých, ale aj nezávislých na cGMP.

Účasť NO bola potvrdená v patogenéze astmy, chronickej obštrukčnej choroby pľúc, kašľa, primárnej ciliárnej diskinezy a akútnych respiračných ochorení.

5.4 Gastrointestinálny trakt (GIT)

Oxid dusnatý má svoju pozíciu aj vo fyziologických funkciách GITu, kde pôsobí predovšetkým ako neurotransmitter. Aj tu môžeme pozorovať jeho duálny efekt. Je uvoľňovaný periférnym nervovým systémom reprezentovaným v tomto prípade iNANC nervovými vláknami. Prehľad základných účinkov oxidu dusnatého v GITe prezentuje nasledujúca tabuľka:

Tabuľka 3. Základné fyziologické a patologické účinky NO v gastrointestinálnom trakte

Cieľ pôsobenia	Fyziológia	Patofyziológia
Hladký sval	<p>Relaxácia – hlavný neurotransmitter NANC</p> <p>Zabezpečenie krvného prietoku v sliznici</p>	<ul style="list-style-type: none"> • spazmus pažeráka, • gastroparéza, • chronická črevná pseudoobštrukcia • ileus • toxický megakolon • vredová choroba
Sfinktery	Relaxácia	<ul style="list-style-type: none"> • gastroezofageálny reflux • achalázia • pylorostenóza • dysfunkcia Oddiho zvierača • Hirsprungova choroba • análne fisúry
Imunitný systém	<p>Protizápalový účinok:</p> <ul style="list-style-type: none"> • stabilizácia mastocytov • inhibícia tvorby Th1 cytokínov • baktericídny efekt • antitumorózny efekt 	<p>Prozápalový účinok:</p> <ul style="list-style-type: none"> • tvorba reaktívnych foriem kyslíka • zápalové ochorenia čreva, mikroskopické kolitídy • divertikulída • infekčné hnačky
Epitel	<ul style="list-style-type: none"> • zvýšenie tvorby protektívneho hlienu • inhibícia agregácie a adhézie leukocytov • ochrana sliznice proti zápalu a poškodeniu 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ ↑ sekrécia chloridových iónov • ↑ permeability pri sepe • intestinálna metaplázia • polypy • nádorové ochorenia GITu

Oxid dusnatý bol detegovaný v myenterickom plexe žalúdka a čriev, dolnom pažerákovom, ileokolickom a vnútornom análnom zvierači a jeho uvoľnenie je **vo fyziologických podmienkach** zodpovedné za adaptívnu dilatáciu žalúdka, reguláciu peristaltiky a stimuláciu sekrécie hlienu v črevách. Do určitej miery ovplyvňuje tvorbu inzulínu, ale pri nadmernej produkcii NO sa tieto účinky môžu zmeniť na poškodenie sliznice a β -buniek pankreasu.

Motilita GITu je riadená črevnými excitačnými a inhibičnými neurónmi, ktoré inervujú bunky hladkej svaloviny. K distenzii čreva dochádza po prijatí potravy po podráždení črevných aferentných neurónov. Tieto kontaktujú ďalšie interneuróny orálnym alebo aborálnym smerom. Interneuróny sú taktiež stimulačné a inhibičné. Stimulačné interneuróny vyvolávajú kontrakciu a ich hlavným mediátorom je acetylcholín. Inhibičné interneuróny črevo relaxujú a k ich hlavným mediátorom patrí somatostatín, kys. gama aminomaslová (GABA), vazoaktívny intestinálny peptid a NO. Viaceré práce poukazujú na to, že oxid dusnatý je najdôležitejší inhibičný neurotransmitter v črevnom NANC. Reguluje predovšetkým motilitu GITu a kontroluje činnosť sfinkterov, napr. dolného pažerákového zvierača, Oddiho zvierača, či análneho zvierača. Potlačenie endogénnej produkcie NO zlepšuje kontraktilitu sfinkterov, zatiaľ čo zvýšenie hladiny NO substitúciou znižuje kontraktilitu sfinkterov. Látky modulujúce homeostázu NO priaznivo ovplyvňovali kontrakciu sfinktera v distálnom pažeráku, čo by mohlo byť využívané napr. v terapii refluxnej choroby pažeráka.

V čreve sa NO rýchlo rozkladá na nitráty a nitrity. Biologický polčas je menej ako 6 s. Veľmi rýchlo difunduje do epitelu, kde aktivuje kaskádu sGC-cGMP s následným zvýšením črevnej sekrécie. Na zvýšení sekrécie tiež participuje oxidom dusnatým aktivovaná tvorba prostaglandínov, hlavne PGE₂. Vysoké hladiny NO sa tak môžu objaviť v patogenéze hnačkových ochorení, hlavne tých, ktoré sú spojené so zápalom.

GIT je veľmi dobre chránený pred pôsobením dráždivých potravín (napr. alkohol), ale aj pred nepriaznivým vplyvom zvýšenej endogénnej sekrécie (kyseliny, proteolytické enzýmy, žlč). Slizničná bariéra je vytvorená vrstvou črevných epiteliálnych buniek a nešpecifickými ochrannými látkami ako sú hlien a lyzozým. K týmto látkam patrí aj NO. Reguluje prekrvenie sliznice, znižuje adhérenciu leukocytov, inhibuje aktiváciu žírnych buniek a stimuluje sekréciu žalúdočného hlienu. Toto všetko sa využíva napríklad v syntéze hybridných donorov oxidu dusnatého (NO-NSAID).

Dôležitou je aj úloha NO v *slizničnej imunitnej odpovedi*, kde má oxid dusnatý veľmi dôležitú obrannú funkciu. Na druhej strane bola pri zápalových ochoreniach čreva dokázaná indukcia iNOS v epiteli. Otázka pôsobenia vysokých hladín NO v GITe však ostáva otvorená. Na jednej strane zvyšuje črevnú permeabilitu, indukuje apoptózu

a stimuluje vylučovanie, na strane druhej vysoké množstvá tohoto mediátora apoptózu blokujú a majú tiež antimikrobiálne účinky.

Oxid dusnatý sa zúčastňuje aj *regulácie viacerých metabolických procesov v pečeni*. Jeho účasť bola pozorovaná najmä pri metabolických cestách využívajúcich cytochróm P450. Pri poškodení pečene alebo zápalových ochoreniach pečene stúpa produkcia tohto mediátora spolu s tvorbou voľných radikálov. Výsledkom je downregulácia cytochrómu P450, zníženie tvorby bielkovín, potlačenie syntézy DNA, apoptóza a nekróza hepatálnych buniek.

V súčasnosti existuje aj niekoľko zaujímavých teórií o zapojení NO do *procesu tvorby tumorov v GITe*. Opäť sa tu stretávame s duálnym účinkom – protumoróznym v súvislosti s angiogenezou a na druhej strane antikarcinogénnym spôsobeným cytotoxickým poškodením nádorových buniek.

5.5 Urogenitálny systém

Účinok oxidu dusnatého je odrazom regulácie tonusu ciev a prietoku krvi v jednotlivých častiach tohto systému. Protektívny účinok v obličkách sa prejavuje v ovplyvnení glomerulárnej perfúzie a sekrécie renínu. Na regulácii homeostázy tekutín a elektrolytov v obličkách sa NO podieľa ovplyvnením vazokonstrikcie renálnych ciev. Pri nadprodukcii NO dochádza ku glomerulonefritíde a tiež k akútnemu obličkovému zlyhaniu. Zaujímavá je aj pozícia v pohlavnom systéme muža a ženy, kde oxid dusnatý reguluje reprodukčné schopnosti, podieľa sa na syntéze pohlavných hormónov, ale má vplyv i na libido, zmenu potencie či sexuálne správanie a má mnoho ďalších funkcií, ktoré sú výsledkom pôsobenia NO na centrálnu i periférnu úroveň.

5.5.1 Močový systém

Oxid dusnatý, ale i ďalšie produkty metabolismu L-arginínu (prolín, polyamíny) majú dôležité postavenie pri zabezpečení fyziologickej funkcie obličiek. Zvýšenie počtu vedeckých a odborných prác v tejto oblasti poukazuje na viaceré účinky oxidu dusnatého tak v renálnej fyziológii ako aj v patofyziológii. V imunohistochemických štúdiách bolo dokázané, že v urogenitálnom systéme sa nachádzajú všetky tri izoformy NO-syntáz. Zdrojom eNOS je hlavne mikrovaskulatúra, glomerulárne endotelové

bunky, bunky proximálneho tubulu, Henleho kľučky a zberných kanálikov. Neuronálna izoforma sa nachádza tiež v macula densa, hlavných bunkách zberných kanálikov a panvových nervoch. Funkčné štúdie potvrdili prítomnosť iNOS napr. v proximálnom tubule hoci presná lokalizácia iNOS v podmienkach in vivo je stále neznáma.

Fyziologická hladina NO reguluje glomerulárnu hemodynamiku, medulárnu sekréciu renínu, tubuloglomerulárnu spätnú väzbu a objem extracelulárnej tekutiny. Na základe dostupných literárnych údajov môžeme konštatovať, že oxid dusnatý sa v obličkách podieľa na:

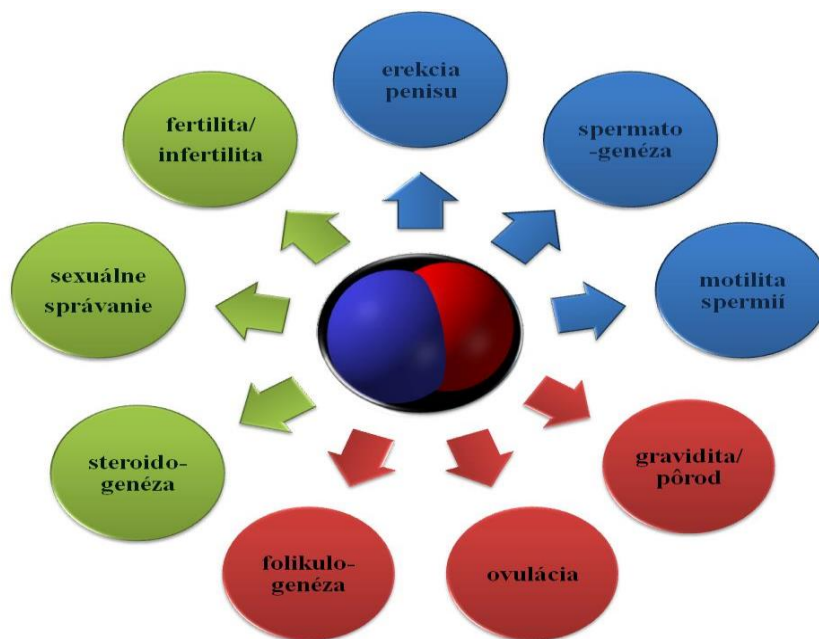
- regulácii mikro a makrovaskulárnej hemodynamiky,
- stimulácii rezorpcie sodíka, bikarbonátu (HCO_3^-) a vody v proximálnom tubule,
- stimulácii acidifikácie v proximálnom tubule,
- inhibícii reabsorpcie sodíka, HCO_3^- a vody v distálnom tubule,
- inhibícii reabsorpcie sodíka v zberných kanálikoch,
- inhibícii H^+ -ATPázy v zberných kanálikoch

Výsledkom tohto pôsobenia je zvýšenie prekrvenia obličiek a glomerulárnej filtrácie, zvýšenie diurézy a natriurézy.

V patologických podmienkach, napr. v podmienkach zápalu sa vytvára superoxidový anión, peroxyinitrit a ďalšie radikály, ktoré môžu prispievať napr. k autoimunitným glomerulonefritídami či postischemickému poškodeniu obličiek. V súvislosti s patológiou nachádzame NO tak pri akútnych ako aj chronických poškodeniach obličiek. Zaujímavé boli napr. pokusy s aplikáciou inhibítorov NO syntáz pri glomerulonefritídach. Účinok bol dvojfázový. Kým v akútnej fáze bol zaznamenaný renoprotektívny efekt, chronické podávanie urýchlilo poškodenie obličiek. Práve tieto výsledky nútia k ďalšiemu výskumu fyziologického účinku NO v obličkách.

5.5.2 Pohlavný systém

Oxid dusnatý participuje aj na regulácii ženského a mužského reprodukčného systému. Podobne ako v ostatných systémoch, aj tu sa podieľa na fyziologických i patofyziologických procesoch a ovplyvnenie jeho aktivity môže mať veľký klinický význam (obr.14).



Obrázok 14. Základné fyziologické procesy v pohlavnom systéme ovplyvnené oxidom dusnatým

*modré – účinky na mužský pohlavný systém, červené – účinky na ženský pohlavný systém, zelené – účinky na mužský i ženský pohlavný systém

5.5.2.1 Ženský pohlavný systém

Vo vaječníkoch **reguluje** NO dozrievanie folikulov a ovuláciu. Hladina NO koreluje s hladinou estrogénov. Estrogény, ako dôležité hormonálne stimuly aktivujú hlavne konštitutívne izoformy - eNOS a nNOS. Tento pozitívny vzťah bol potvrdený aplikáciou inhibítorov NO syntáz, ktoré zabránili ovulácii u experimentálnych zvierat. Nie je však jasné, či je účinok NO na ovuláciu vyvolaný oxidom dusnatým vytvoreným v cievach a neurónoch vaječníka alebo špeciálnymi folikulárnymi bunkami. Zaujímavá je aj pozícia iNOS, ktorá môže mať vo vaječníkoch fyziologický význam. Jej aktivita nie je stimulovaná zápalovým podnetom, skôr reaguje na syntézu steroidných hormónov. Fyziologický význam expresie iNOS vo vaječníkoch teda ostáva zatiaľ nejasný. Je možné, že v podmienkach neustálej tvorby a rastu folikulov pôsobí iNOS a mediátor ňou tvorený ako regulačná rastová molekula.

Uvažuje sa, že oxid dusnatý má *dôležitú funkčnú úlohu* pri podpore oplodnenia vo vajcovodoch. Bazálne uvoľňovanie NO stimuluje pohyb spermií. Reguluje

kontrakcie vajcovodu a môže do určitej miery ovplyvniť aj kinetiku riasiniek vajcovodu. Oxid dusnatý môže tiež zvyšovať vylučovanie vaginálneho sekrétu.

Všetky izoformy NO syntáz boli tiež detegované v žľazách epitelu maternice, endometriálnych stromálnych bunkách a bunkách myometria. Maternica je orgánom, ktorý prekonáva dôležité štrukturálne zmeny počas menštruačného cyklu i počas gravidity. Vzhľadom k tomu, že NO reguluje kontraktilitu hladkého svalstva a teda aj spontánne kontrakcie a dilatáciu uteru v priebehu gravidity, otázka úlohy NO v tejto oblasti si postupne získava pozornosť odborníkov v danej oblasti. Na základe literárnych údajov môžeme povedať, že oxid dusnatý má dôležitú regulačnú pozíciu tak v priebehu tehotenstva ako aj pri pôrode.

V patologických podmienkach, ako je napr. zápal môže poškodiť spermie i vajíčko prostredníctvom zvýšenej tvorby voľných radikálov a úplne zastaviť pohyb riasiniek. Jeho nedostatok je spájaný so stavmi preeklampsie s hypertenziou a substitúcia donorov NO sa doporučuje gravidným ženám s hrozbou predčasného pôrodu.

5.5.2.2 Mužský pohlavný systém

Najlepšie popísaným *fyziologicalkým účinkom* NO v mužskom pohlavnom systéme je regulácia erekcie prostredníctvom neadrenergetickej necholinergickej neurotransmisie. Oxid dusnatý tak môžeme považovať za fyziologický mediátor erekcie, ktorá je regulovaná prevažne prostredníctvom druhého posla – cGMP. Jednotlivé izoformy NO syntáz boli identifikované nielen v NANC (nNOS), ale tiež endoteli *corpora cavernosa* penisu (eNOS).

Na L-arginín a NO sú bohaté i semenníky. Konštitutívne NO syntázy boli detegované v Leidigových bunkách, Sertoliho bunkách a endotelových bunkách semeníkov. Tieto zistenia poukazujú na zapojenie NO/cGMP signálnej dráhy do *regulačnej funkcie semenníkov*, hlavne do spermatogenézy vo všetkých jej fázach. Zaujímavý je aj vplyv na syntézu steroidov, kde NO pôsobí skôr ako autokrinný/parakrinný mediátor. Okrem spermatogenézy moduluje v semenníkoch prietok krvi, bunkovú permeabilitu a kontraktilitu myofibroblastov.

Oxid dusnatý ovplyvňuje aj *motilitu spermií*. Nízka koncentrácia NO (cca 25-100 nM nitroprusidu sodného) zrýchľuje ich pohyb, stredná alebo vysoká koncentrácia oxidu dusnatého (cca 25–125 μM čistého NO alebo 0,25–2,5 mM nitroprusidu sodného) ich pohyblivosť znižuje, prípadne úplne inhibuje. V ľudských spermiách sa však žiadne izoformy NO syntáz nenachádzajú, mechanizmus modulácie preto zatiaľ nie je presne objasnený. Je možné, že k inhibícii pohybu dochádza len v ženskom vajcovode, kde sa spúšťa po ejakulácii imunitná reakcia podobná reakcii pri bakteriálnej infekcii či pri transplantácii orgánov. Pri tejto reakcii sa výrazne zvyšuje expresia iNOS a nadmerne sa tvorí NO, ktorý je pre spermie toxický.

Dysbalancia v homeostáze NO v mužskom pohlavnom systéme je opäť najviac popísaná v súvislosti s erekciou. Pri znížení expresie nNOS sa objavuje erektilná dysfunkcia a preto látky selektívne modulujúce aktivitu tejto izoformy môžu byť prínosom v jej terapii. V terapii tejto poruchy môžu byť tiež účinné donory NO.

5.6 Imunitný systém

Tvorba oxidu dusnatého patrí k významným funkciám imunitného systému. NO je tu tvorený v širokom spektre zápalových, imunitných i štrukturálnych buniek ako sú napr. dendritické bunky, NK bunky, fagocytárne bunky, leukocyty, neutrofily, endotelové bunky, epitelové bunky a pod.

V imunitnom systéme je najaktívnejšia indukčná izoforma NO syntáz. Oxid dusnatý vytvorený iNOS má antimikrobiálne, cytostatické a cytotoxické účinky (tab.4), ktoré sú spojené prevažne s produkciou voľných radikálov (superoxid, peroxynitrit). Tieto spôsobujú inaktiváciu enzýmov obsahujúcich železo a rôzne modifikácie proteínov vedúce k cytostatickému alebo cytotoxickému pôsobeniu voči patogénom. Cytotoxický efekt NO bol tiež pozorovaný voči nádorovým bunkám (tab. 4). Zvýšená aktivita iNOS má protektívnu úlohu pri rôznych bakteriálnych a parazitárnych infekciách a v odpovedi na zápal, kedy voľné radikály cestou oxidácie lipidov a DNA veľmi efektívne ničia pôvodcu ochorenia ako sú baktérie a parazity, ale tiež huby, plesne a vírusy.

Tabuľka 4. Základné účinky NO v imunitnom systéme

Základný účinok	Bunka imunitného systému	Molekulárny mechanizmus
Antimikrobiálny efekt – usmrtenie alebo redukcia replikácie infekčných agens (vírusov, baktérií, parazitov a húb)	<ul style="list-style-type: none"> • makrofágy • mikroglia, astroglia • neutrofily • eozinofily • fibroblasty • bunky endotelu a epitelu 	<ul style="list-style-type: none"> • priame pôsobenie NO na patogén • nepriame pôsobenie – cez reaktívne formy kyslíka
Antitumorózny účinok – usmrtenie alebo spomalenie rastu nádorových buniek	<ul style="list-style-type: none"> • makrofágy • eozinofily 	<ul style="list-style-type: none"> • inhibícia esenciálnych enzýmov pre rast tumorov • zastavenie rastu cez iNOS depléciu L-arginínu • zvýšenie apoptózy • zvýšenie citlivosti nádorových buniek na cytotoxicitu indukovanú TNF-α
Imunopatologický efekt – poškodenie tkaniva (nekróza alebo fibróza parenchýmu)	<ul style="list-style-type: none"> • makrofágy • mikroglia, astroglia • keratinocyty • mesangiálne bunky 	<ul style="list-style-type: none"> • apoptóza buniek parenchymatóznych orgánov • degradácia extracelulárnej matrix • proliferácia mezenchýmových buniek • regulácia influxu zápalových buniek prostredníctvom regulácie cytokínov
Protizápalový účinok – imunosupresia (inhibícia T a B lymfocytov, produkcie protilátok a inhibícia extravazácie, chemotaxie a adhézie leukocytov)	<ul style="list-style-type: none"> • makrofágy 	<ul style="list-style-type: none"> • apoptóza T lymfocytov • downregulácia kostimulačných molekúl cytokínov • narušenie signálnych kaskád a transkripčných faktorov • inhibícia syntézy DNA • downregulácia adhezívnych molekúl a chemokínov
Modulácia produkcie a funkcie cytokínov, chemokínov a rastových faktorov – up a downregulácia napr. IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β a pod.	<ul style="list-style-type: none"> • makrofágy • T lymfocyty • bunky endotelu • fibroblasty 	<ul style="list-style-type: none"> • modulácia signálnych kaskád (MAP kinázy, kaspázy, proteín fosfatázy a pod.) a transkripčných faktorov (NF-κB, Sp1 a pod.) • proteínová regulácia stability a translácie mRNA • modulácia latentných cytokínových prekurzorových komplexov a ich enzýmov

Cytotoxický účinok NO sa neprejavuje len v procesoch obranyschopnosti, ale v niektorých prípadoch pôsobí oxid dusnatý ako významná prozápalová molekula.

Patologická *nadprodukcia NO pri neprítomnosti infekčného agens* je jednou z možností vzniku autoimunitných ochorení akými sú napr. reumatoidná artritída, autoimunitný diabetes, skleróza multiplex, systémový lupus a pod. Vysoké hladiny NO sa tiež podieľajú na procesoch rejekcie transplantátu, pri vzniku septického šoku a objavujú sa tiež v patogenéze viacerých chronických zápalových ochorení.

V imunitnom systéme sa oxid dusnatý podieľa na regulácii viacerých procesov:

- diferenciácia, proliferácia a apoptóza imunitných buniek,
- produkcia cytokínov a ďalších mediátorov,
- modulácia chemotaxie a adhézie leukocytov,
- modulácia kostimulačných a adhezívnych molekúl (cievne bunkové adhézne molekuly-1 (VCAM-1), medzibunkové adhézne molekuly-1(ICAM-1), E-selektín (CD62E) a P-selektín (CD62P),
- imunomodulácia nešpecifických a špecifických imunitných odpovedí a pod.

V špecifickej imunitnej odpovedi majú svoje významné postavenie najmä lymfocyty typu T, zabezpečujúce tzv. humorálny typ odpovede. Majú niekoľko subtypov, ktoré po aktivácii produkujú lymfokíny (cytokíny) regulujúce ďalšie bunky imunitného systému. Lymfocyty Th₁ produkujú interleukín 2 (IL-2), interleukín 12 (IL-12), faktor nekrotizujúci tumory – alfa (TNF- α) a interferon gamma (INF- γ). Lymfocyty Th₂ produkujú interleukín 4 (IL-4), interleukín 5 (IL-5), interleukín 6 (IL-6), interleukín 10 (IL-10) a interleukín 13 (IL-13). Je dokázané, že cytokíny produkované lymfocytmi Th₁ zvyšujú produkciu NO, kým cytokíny produkované lymfocytmi Th₂ produkciu NO naopak znižujú. Na druhej strane, oxid dusnatý môže inhibovať tvorbu Th₁ cytokínov, ale na produkciu Th₂ cytokínov priamy vplyv nemá. Rovnováha medzi produkciou Th₁ a Th₂ cytokínov je podobná kompetícii spracovávaní L-arginínu iNOS a arginázou.

Vo vzťahu k imunitnému systému je zaujímavý aj *pro a antiapoptotický účinok* oxidu dusnatého. NO môže podporovať apoptózu v niektorých bunkách tým, že inhibuje apoptózu v ostatných bunkách. Zložitosť tohto procesu je výsledkom rýchlosti interakcie NO s molekulami železa, bielkovinami tyrozínu a tvorbou reaktívnych foriem kyslíka. Dlhodobá zvýšená tvorba NO pôsobí *preapoptoticky* prostredníctvom aktivácie kaspáz cez mitochondriálny cytochróm c a zmenami v expresii s apoptózou

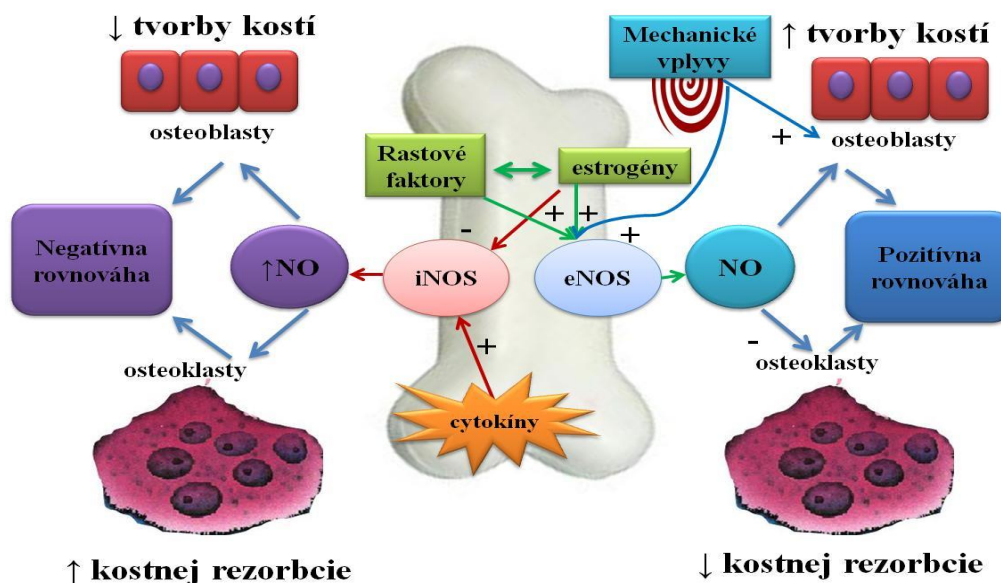
asociovaných proteínov (vrátane Bcl-2). Na druhej strane, nízke hladiny NO majú *antiapoptotický* účinok, ktorý je spájaný s indukciou génovej transkripcie tzv. ochranných proteínov ako napr. heat shock proteínu, hemoxygenázy alebo COX-2 a tiež s priamou inhibíciou apoptotických výkonných kaspáz S-nitrozyláciou cysteín tiolovej skupiny na ich katalytickom mieste.

Duálny efekt sa prejavuje aj v interakcii s nádorovým tkanivom. Zvýšenie hladiny NO prispieva k angiogenéze a „upregulácii“ vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru - VEGF. Neovaskularizácia vedie k zvýšenému rastu nádoru, zvyšuje jeho invázivnosť a metastatické schopnosti. Tento proces je obyčajne urýchlenný v podmienkach chronického zápalu. Na druhej strane ale vysoká hladina NO v nádorových bunkách priamo poškodzuje DNA, inhibuje ribonukleotid reduktázu alebo inaktivuje cytoplazmatické enzýmy a proteíny. Oxid dusnatý však môže línie nádorových buniek ovplyvňovať aj prostredníctvom ďalších regulačných mechanizmov ako napr. „upregulácie“ reparačných mechanizmov DNA, poly-(ADP-ribóza)-polymerázy, DNA dependentných proteínov, blokády apoptózy a pod.

Intravenózna aplikácia L-arginínu, ako prekursoru NO dokázala v experimente zvýšiť počet cirkulujúcich CD56+ lymfocytov, čo podporuje možnosť využitia tejto látky pri rôznych imunosupresívnych stavoch vrátane rakoviny a tiež AIDS.

5.7 Pohybový systém

Pozícia oxidu dusnatého v muskuloskeletárnom systéme je popísaná veľmi málo. V kostiach boli detegované všetky izoformy NO syntáz. Existujú určité informácie o tom, že NO *vplýva na činnosť osteoklastov a osteoblastov* a tak sa podieľa na tvorbe kostí. Osteoblasty sú hlavnými producentmi NO v kostiach. Z experimentálnych prác je známe, že zvýšená hladina NO, rovnako ako donory NO bránia rezorbcii kostnej hmoty. Okrem toho, oxid dusnatý reguluje v kostiach účinky prostaglandínov a zápalových cytokínov, ktoré podporujú kostnú rezorbciu. Hlavným podnetom k formovaniu kostí je telesná hmotnosť, gravitácia a svalová kontrakcia, pričom oxid dusnatý môže v pohybovom systéme vystupovať ako sprostredkovateľ osteogénnej odpovede na mechanické podnety (obr.15).



Obrázok 15. Zapojenie NO v metabolizme kostí. Interakcia cytokínov, estrogénov, rastových faktorov a mechanických podnetov v stimulácii izoform NO syntáz
**iNOS – indukčná NO syntáza, eNOS – endotelová NO syntáza, NO – oxid dusnatý*

Pri osteoporóze bola detekovaná zvýšená expresia indukčnej izoformy, čo môže poukazovať na zapojenie NO do patogenézy tohto ochorenia. Osteoporóza je ochorenie, ktoré je podmienené multifaktoriálne. Objavuje sa hlavne u žien a je charakterizované zhoršením mikroarchitektúry kostí, znížením kostnej denzity a zvýšeným rizikom zlomenín. Primárna osteoporóza súvisí s deficitom estrogénov po menopauze alebo s vekom, sekundárna je spôsobená napr. glukokortikoidmi, zápalovými ochoreniami a pod. Predpokladá sa, že antiosteoporotický účinok estrogénov, raloxifénu či statínov môže sprostredkovať práve oxid dusnatý.

Oxid dusnatý sa podieľa aj na *hojení zlomenín*. Po zlomení kosti výrazne stúpnou expresia iNOS, ktorá aktivuje proces opravy. Stimuluje osteocyty, lokálne prekrvenie a aktivuje rastové faktory v mieste poranenia. Tento efekt bol dokázaný aj podaním NOS inhibítorov, ktoré hojenie zlomenín spomaľovali.

Nadprodukcia NO sa prejaví v poruche kostnej tvorby a je spojená napr. s osteopéniou, nádorovou osteolýzou a periodontálnymi ochoreniami. Je tiež považovaný za jednu z kľúčových molekúl v patogenéze artritídy.

V kostrovom svale boli taktiež identifikované všetky izoformy NO syntáz. Ich expresia je závislá na veku, inervácii a aktivite svalu. Sú aktivované vplyvom rastových faktorov, cytokínov a tiež na základe mechanických vplyvov ktoré sú odpoveďou na

kontrakciu svalových vlákien. *V kostrovom svalu sa oxid dusnatý vo fyziologických podmienkach* podieľa na regulácii kontrakcie, krvného prietoku, diferenciácie myocytov, bunkovej respirácie a glukózovej homeostázy. *Nadprodukcia NO* a následná tvorba reaktívnych foriem kyslíka je spájaná s vznikom muskulárnej dystrofie.

5.8 Endokrinný systém

Poznatky z oblasti hormonálnej fyziológie naznačujú, že oxid dusnatý je „všadeprítomná“ molekula funkčne zapojená skutočne do všetkých známych regulačných systémov. Väčšina dostupných prác sa však venuje konkrétnym experimentálnym modelom a tak je sumarizácia pôsobenia NO na jednotlivé hormonálne oblasti viac než problematická. Dostupné literárne zdroje poukazujú na to, že viaceré metabolické resp. endokrinné poruchy sú spájané so zmenou homeostázy NO ako napr. diabetes mellitus, ochorenia štítnej žľazy, metabolický syndróm či obezita.

V rámci fyziologickej regulácie sú dostupné údaje o regulácii β buniek pankreasu, ovplyvnení metabolizmu lipidov a glukózy a na druhej strane vznik rezistencie na inzulín po pôsobení reaktívnych foriem kyslíka.

Oxid dusnatý sa prostredníctvom nNOS zúčastňuje uvoľňovania hypofyzárnych hormónov. Všetky tri izoformy NO syntáz boli tiež detegované v štítnej žľaze a ich aktivita je prepojená so správnou funkciou tohto orgánu a tvorbou thyroidálnych hormónov. S deficitom NO sú spájané napr. kongenitálne hypothyreózy.

Dôležité je tiež postavenie oxidu dusnatého v steroidogenéze. Inhibítory NOS zvyšujú bazálnu i luteinizačným hormónom stimulovanú sekréciu testosteronu. Estrogény majú opačný vplyv – t.j. stimulujú expresiu prevažne konštitutívnych izoform NOS, čím sa podieľajú na stimulácii tvorby NO a naopak.

Kontrolné otázky:

1. Popíšte základné účinky NO v jednotlivých systémoch ľudského organizmu.

6. DETEKCIA NO

Presná detekcia a kvantifikácia oxidu dusnatého je rozhodujúca pre pochopenie niektorých súvislostí a regulačných postupností vo fyziologických a patologických procesoch, na ktorých sa NO podieľa. Vzhľadom k jeho extrémne nízkemu biologickému polčasu a následnej tvorbe voľných radikálov je detekcia pomerne problematická. Preto boli vyvinuté predovšetkým nepriame metódy detekcie. Najlepšia metóda detekcie je obvykle taká, ktorá zodpovedá fyziologickým podmienkam v čo najväčšej možnej miere. To je však často nepraktické, pretože väčšina experimentov je realizovaná v podmienkach „*in vitro*“. Preto je pri analýze potrebné vziať do úvahy niekoľko faktorov:

- 1) správne „fyziologické“ nastavenie experimentu,
- 2) ovplyvnenie hladiny NO resp. stability vzoriek až po dobu analytického hodnotenia,
- 3) eliminácia faktorov potenciálne ovplyvňujúcich hladinu NO,
- 4) vhodnosť zvoleného analytického systému v podmienkach experimentu.

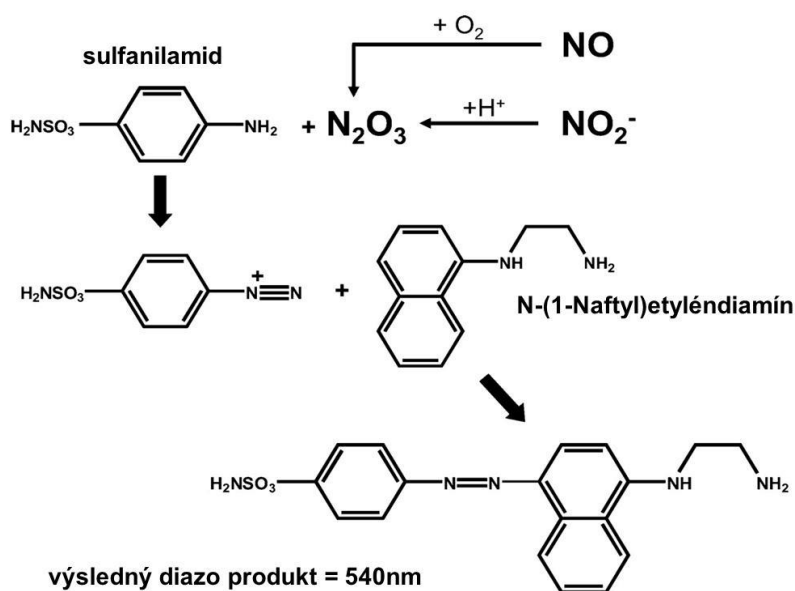
Tieto a mnohé ďalšie otázky stále stoja v centre pozornosti pri voľbe správnej analytickej metódy detekcie oxidu dusnatého v bunkách, tkanivách a orgánoch. Aj napriek tomu, že možnosti identifikácie NO významne pokročili a v súčasnosti poznáme moderné techniky, z ktorých sa niektoré v plnej miere využívajú aj v klinickej praxi (napr. vydychovaný NO), ešte stále existuje otvorený priestor na vytvorenie optimálnej metódy kvantifikácie tohto mediátora.

6.1 Detekcia nitritov a nitrátov

Nitrity a nitráty sú produktami metabolizmu oxidu dusnatého a slúžia ako dôležité „ukazovatele“ aktivity NO. Na ich detekciu najčastejšie využívame krv alebo moč, je však možné ich detegovať aj v iných tekutinách alebo tkanivách (napr. likvor, punkáty a pod.). Jedným z najdôležitejších krokov pri kvantifikácii NO prostredníctvom jeho metabolitov je príprava vzoriek. Nitrity rovnako ako aj nitráty sa rýchlo metabolizujú, preto je potrebné získať tkanivo a krv pri zachovaní ich integrity – t.j. musíme uskutočniť rýchly odber, rýchlu homogenizáciu tkaniva a následnú fixáciu

v izotonickom roztoku. V experimentálnych podmienkach to znamená, že krv zvieratá by mala byť odobratá v priemere do 1 minúty a centrifugovaná do 2 minút, aby sa minimalizoval vplyv hypoxie. Odber a analýza by mali byť realizované v prítomí, aby sa zabránilo fotolytickému rozkladu tkaniva. Ideálne je vykonať analýzu okamžite po odobratí vzorky. Pokiaľ to nie je možné, vzorka sa po spracovaní zmrazuje v tekutom dusíku. Na stanovenie nitritov a nitrátov využívame v súčasnosti niekoľko metód:

- **Kolorimetrická detekcia** - je jednou zo základných metód pre nepriame stanovenie NO. Využíva detekciu nitritov a nitrátov s využitím Griessovej metódy pomocou klasického spektrofotometra, pričom sa merajú stabilné produkty rozkladu NO_3 a NO_2 pri vlnovej dĺžke 540 nm (obr.16).



Obrázok 16. Griessova reakcia. Detekcia nitritov a nitrátov. N_2O_3 , ktorý vzniká autooxidáciou NO alebo reakciou NO^{2-} s vodíkovými protónmi reaguje so sulfanilamidom za vzniku diazónového derivátu, ktorý po reakcii s N-(1-Naftyl)etyléndiamínom vytvorí farebný diazo produkt absorbujúci svetlo pri vlnovej dĺžke 540 nm.

- **Vysoko účinná kvapalinová chromatografia (HPLC)** umožňuje citlivé a selektívne meranie nitritov a nitrátov vo všetkých biologických materiáloch s ľahkou a vysokou priepustnosťou.

- **Fluorometrická detekcia** využíva na stanovenie aromatickú zlúčeninu, nefluorescenčný diamino-2,3-diaminoftalén (DAN), ktorý indikuje tvorbu NO. Po interakcii s NO vytvára fluorescenčný produkt – 2,3 naftotriazol, ktorý môže byť použitý na kvantifikáciu NO.
- **Chemiluminiscenčné metódy** zaznamenávajú reakciu NO s ozónom v chemiluminiscenčnom detektore za vzniku oxidu dusičitého (NO₂). Po návrate do základného stavu NO₂ vyžaruje svetlo, ktoré je potom zachytené fotonásobičom.
- **Kvantifikácia 3-nitrotyrozínu (3NT)** prostredníctvom imunohistochemických techník, ktoré využívajú protilátky špecifické pre 3NT. Tento radikál je tiež možné detegovať s využitím viacerých nových techník ako napr. s využitím hmotnostnej spektrometrie, HPLC v kombinácii s UV absorpciou, elektrochemickou detekciou a fluorescenčnou spektroskopiou.

6.2 Elektrónová paramagnetická rezonančná spektroskopia (EPR)

Táto metóda je schopná identifikovať komplexy voľných radikálov (ich nespárených elektrónov) ako je napr. NO alebo superoxid. EPR môže byť využitá napr. na detekciu NO v plynnej fáze (napr. meranie NO v znečistenom ovzduší), v kvapalnej fáze je však detekcia už problematická. V rovnovážnom stave, t.j. **vo fyziologických podmienkach** je totiž množstvo NO v biologických systémoch pod merateľnou hranicou EPR. Z tohto vyplýva, že EPR zatiaľ nie je možné použiť v žiadnom fyziologicky významnom experimente. V patologických podmienkach môže byť táto metóda použitá na detekciu superoxidu, hydroxylového radikálu, alebo iných radikálových zlúčenín s unikátnym spektrom.

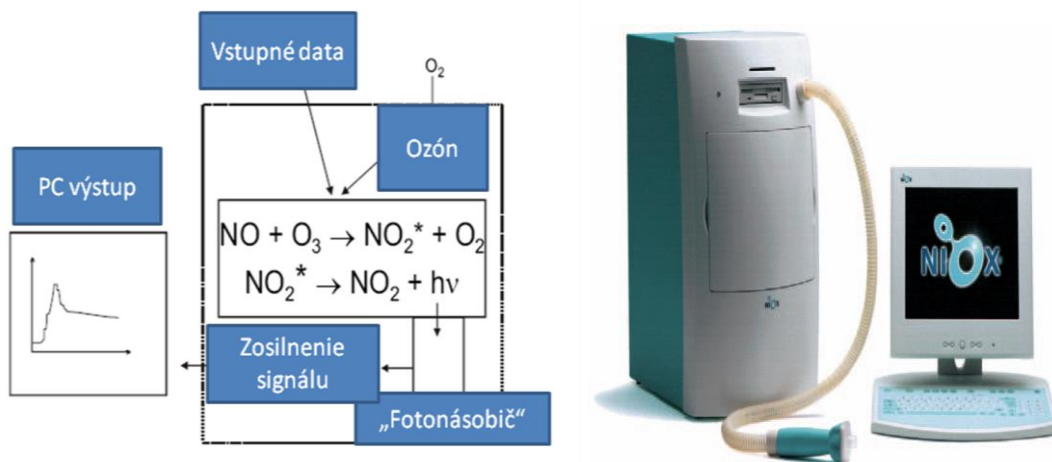
Otázkou je, či je EPR výhodnejšia oproti iným metódam detekcie. Jej kľúčovou výhodou je detekcia nespárených elektrónov a teda aj detekcia prítomnosti radikálových foriem. Na druhej strane, nepriame metódy detekcie NO (kolorimetrické, chemiluminiscenčné a pod.) sú často citlivejšie a nevyžadujú takéto špecializované zariadenie.

6.3 Vydychovaný oxid dusnatý

Metóda bola prvýkrát popísaná v roku 1991, kedy Gusstafson a spol. dokázali s využitím chemiluminiscenčnej metódy identifikovať oxid dusnatý vo vydychovanom vzduchu laboratórnych zvierat (eNO – z anglického exhaled nitric oxide).

Ako každá z uvedených metód, aj táto má svoje výhody aj nevýhody. Obrovskou **výhodou** je to, že ako jedinej metóde sa podarilo v neuveriteľne krátkom čase zaujať popredné miesta v diagnostike zápalových ochorení dýchacích ciest. Detekcia vydychovaného NO sa stala v klinickej praxi najmodernejšou neinvazívnou metódou detekcie a kontroly zápalu v dýchacích cestách a v súčasnosti sa už riadi komplexnými odporúčaniami Európskej respirologickej spoločnosti a Americkej hrudnej spoločnosti z roku 2005. K detekcii eNO sa využíva viacero sériovo vyrábaných chemiluminiscenčných analyzátorov, ktoré sú prepojené s počítačovým systémom (obr.17). Lekár tak po vyšetrení vidí výslednú hodnotu NO na monitore PC. Táto hodnota koreluje s úrovňou zápalu v dýchacích cestách a je indikátorom exacerbácií predovšetkým pri chronických zápalových ochoreniach dýchacích ciest.

Hladina oxidu dusnatého vo vydychovanom vzduchu je podmienená produkciou NO v rôznych bunkách dýchacích ciest a v pľúcnom parenchýme, difúziou NO do kapilárnej cirkulácie a alveolárnou ventiláciou. Predovšetkým je však ovplyvnená aktivitou jednotlivých izoforiem NO syntáz, aktivitou arginázy a iných, napr. RS-NO metabolizujúcich enzýmov. Pľúca zdravých jedincov produkujú nízke, ale detekovateľné množstvo NO, ktoré pravdepodobne odráža aktivitu cNOS. Koncentrácia NO vo vydychovanom vzduchu je zvýšená u pacientov s bronchiálnou astmou, bronchiektáziami alebo infekciou horných dýchacích ciest. Je zrejmé, že vysoká hladina NO vo vydychovanom vzduchu je spôsobená zvýšenou aktivitou iNOS v zápalových bunkách a môže sa podieľať na regulácii zápalovej odpovede. Znížená hladina oxidu dusnatého vo vydychovanom vzduchu je pozorovaná napr. pri sínusitídach, hypoxii, pľúcnej hypertenzii, cystickej fibróze alebo u fajčiarov. Predpokladá sa, že časť vydychovaného NO pochádza z nosovej dutiny a prínosných dutín a približne 40-45% pochádza z pľúc resp. z dolných dýchacích ciest. Je možné, že časť oxidu dusnatého tvoreného v horných dýchacích cestách môže byť následne vdýchnutá do dolných dýchacích ciest, kde potom NO pôsobí ako mediátor.



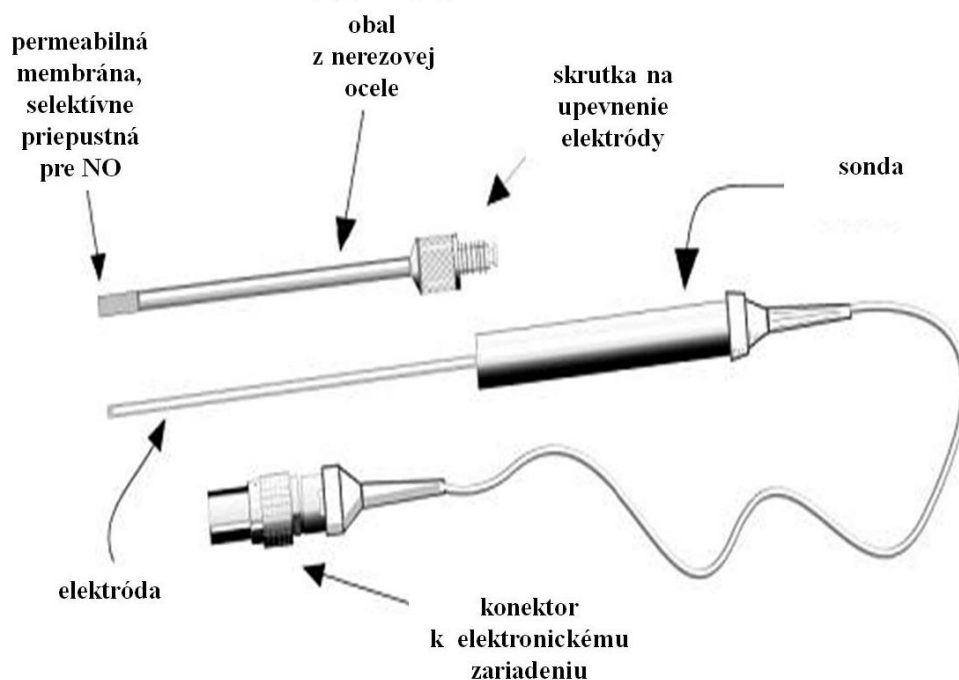
Obrázok 17. Detekcia vydychovaného NO. Vľavo schéma chemiluminiscenčnej detekcie eNO, vpravo komerčne používaný analyzátor na detekciu eNO – NIOX (®Aerocrine, Sweden)

V experimentálnej praxi je hodnotenie vydychovaného NO pomerne komplikované. Z literatúry je známych viacero techník monitorovania eNO u malých laboratórnych zvierat. V podstate by sme ich mohli rozdeliť do dvoch skupín. Prvú predstavuje invazívny monitoring s využitím tracheostómie, mechanickej ventilácie a paralelného zachytávania preventilovaného vzduchu, ktorý je následne analyzovaný. Druhou možnosťou je neinvazívne monitorovanie s využitím tzv. statickej komory pre zvieratá. Neinvazívne monitorovanie má v tomto smere značnú výhodu, pretože umožňuje jednak opakované vyšetrenie identického zvierat'a v čase – napr. s postupným rozvojom zápalu a jednak umožňuje vykonávať u zvierat'a rôzne doplnkové vyšetrenia.

6.4 Real-time detekcia

Jednou z posledných metód detekcie NO je metóda detekcie v reálnom čase alebo tzv. priama metóda. Detekcia pomocou tzv. NO-selektívnych elektród patrí medzi najspoľahlivejšie a najcitlivejšie metódy detekcie oxidu dusnatého v podmienkach „in vivo“. Prvé experimenty s využitím nemodifikovaných elektród poukázali na zlú selektivitu, preto sa výskum v tejto oblasti orientoval na zlepšenie kvality detekčných elektród (obr.18). S využitím najmodernejších techník boli vytvorené elektródy s brómfenolovým filmom, vrstvou aktívneho uhlia, platinové alebo zlaté mikroelektrody s mikromembránami umožňujúcimi selektívnu priepustnosť pre NO a elimináciu iných

látok. Za veľmi vhodné materiály pre povrch detekčných elektród sú v súčasnosti považované elektropolymerizované metaloporfyríny, ktoré bránia oxidácii nitrátov, nitrozylu a NO vo vodnom roztoku. Použitie mikroelektród tak otvára možnosť elektrochemickej detekcii NO v živých bunkách a tkanivových kultúrach.



Obrázok 18. Schéma sondy na real-time detekciu NO
ISO-NOP-NO ®Word Precision Instruments)

Citlivosť elektródy závisí do značnej miery od charakteru povrchu a veľkosti snímacej plochy. Elektródy s malou snímacou plochou sú vo všeobecnosti menej citlivé. Elektródy by tiež mali byť selektívne pre konkrétny typ experimentálneho merania. Pri detekcii NO sa využívajú aj viacvrstvové membrány, ktoré zabránia detekcii iných molekúl a zvýšia selektivitu a citlivosť pre NO.

V súvislosti s real-time detekciou sú popísané viaceré postupy. Napr. ampérometrická detekcia NO zahŕňa oxidáciu oxidu dusnatého na povrchu elektródy a meranie následne vytváraných (redoxných) prúdov. Množstvo prúdu generované oxidáciou NO v biologickom systéme je veľmi malé (napr. 1 pA až 10 pA). Konštrukcia ampérometrických elektród preto vyžaduje veľmi citlivú elektroniku a ultra zosilnenie.

Mikroelektródy boli použité vo viacerých experimentoch na detekciu NO v reálnom čase napr. v mozgu, obličkách, či niektorých bunkových štruktúrach ako

mitochondrie. Z literatúry je známe napr. real-time monitorovanie produkcie NO v žalúdku a pažeráku, pri ktorej proband prehltol dve elektródy, ktoré boli potom každé 2 minúty posúvané o 1 cm a monitorované. Následne bol vytvorený profil koncentrácie oxidu dusnatého v GITe.

6.5 Detekcia NO syntáz

Určitý obraz o množstve NO v organizme nám môže poskytnúť aj detekcia NO syntáz. Enzymatická detekcia má svoje zaužívané metódy, ku ktorým patria napr. imunohistochemické metódy, imuno fluorescenčné metódy a metódy molekulárnej biológie využívajúce v poslednej dobe najmä PCR (polymerázovú reťazovú reakciu). K detekcii sa používajú štandardné, sériovo vyrábané kity, prípadne sa metodika nadizajnuje podľa charakteru experimentu. Génová banka v súčasnosti obsahuje sekvencie mRNA všetkých izoforiem NO syntáz, čo je možné efektívne využiť pre sledovanie expresie príslušného enzýmu vo vybraných tkanivách. Uvedené metódy sa bežne využívajú v rámci lekárskej biochémie alebo molekulárnej biológie.

Kontrolné otázky:

1. Aké metódy detekcie NO poznáte?
2. Poznate spôsoby detekcie nitritov a nitrátov? Na čom je založená kolorimetrická metóda?
3. Čím je ovplyvnená hladina vydychovaného NO?
4. Aké sú výhody detekcie neinvazívnej detekcie eNO u človeka a u zvierat?
5. Od čoho závisí citlivosť elektródy pre real-time detekciu NO?

7. FARMAKOLÓGIA OXIDU DUSNATÉHO

Objavenie oxidu dusnatého výrazne prispelo k poznaniu viacerých fyziologických procesov a pomohlo tiež identifikovať niektoré mechanizmy vzniku ochorení v už popísaných systémoch ľudského organizmu. Práve zapojenie NO do patogenézy ochorení otvára cestu pre vývoj látok modulujúcich jeho homeostázu. Jednou zo základných otázok pri vývoji farmakoterapie býva otázka: „Čo je podmienkou vzniku ochorenia?“. Aj napriek tomu, že fyziologické účinky NO sú z roka na rok lepšie popísané, vývoj liekov, ktoré modulujú hladinu tohto mediátora je stále veľmi náročný. V snahe dodržať určitý logický rámec vychádzajúci z predpokladu negatívneho účinku vysokých hladín NO sa vedci zameriavajú predovšetkým na látky blokujúce NO syntázy a znižujúce množstvo dostupného NO. Pri tejto postupnosti je však namieste opatrnosť vyplývajúca z rizika totálnej blokády jeho tvorby. Na druhej strane je žiaduca práve zvýšená hladina NO (napr. vazodilatácia) pri minimalizácii potenciálu nežiaducich účinkov napr. z tvorby voľných radikálov. Priama aplikácia NO je problematická najmä z hľadiska farmakokinetiky.

Výskum v oblasti farmakomodulácie nitrergického systému sa zameriava predovšetkým na ochorenia, v patogenéze ktorých sa dokázateľne objavuje porucha homeostázy NO, prípadne narušenie niektorej z jeho signálnych dráh. V súčasnosti sa vo farmakoterapii týchto ochorení testuje a používa 5 skupín farmák:

- L-arginín – prekursor syntézy oxidu dusnatého,
- samotný NO – ako látka plyného charakteru určená na inhaláciu,
- donory NO, prípadne látky zvyšujúce aktivitu tejto molekuly,
- inhibítory NO-syntáz,
- antioxidanty.

7.1 L-arginín

L-arginín je základným substrátom pre vznik oxidu dusnatého. Je to semiesenciálna aminokyselina, ktorej prirodzeným zdrojom sú napr. mliečne výrobky, hovädzie mäso, pšeničné klíčky, sója či orechy.

Normálne plazmatické koncentrácie L-arginínu sú 80-120 μM a intracelulárne koncentrácie sú ešte väčšie (do 1 mM). Aj pri absencii príjmu z potravy by tak mali intracelulárne zásoby L-arginínu postačovať na zachovanie homeostázy NO. Pri poruchách tvorby oxidu dusnatého, hlavne znížení jeho hladín sa v prvých etapách farmakologickej modulácie uvažovalo nad substitúciou substrátu, ktorá by mohla „normalizovať“ nedostatočné hladiny oxidu dusnatého v organizme. Viaceré experimentálne práce poukázali na to, že podávanie exogénneho substrátu zvyšuje hladinu endogénneho oxidu dusnatého. Po infúzii L-arginínu zdravým dobrovoľníkom bolo zaznamenané rýchle zníženie systolického i diastolického krvného tlaku a podobne tomu bolo aj u pacientov s rôznymi formami hypertenzie. V experimentoch L-arginín zlepšil endoteliálnu dysfunkciu, znížil reaktivitu trombocytov a znížil hyperpláziu intimy ciev. Taktiež mal pozitívny vplyv na zlepšenie funkcie trávenia, antiulcerózný efekt, urýchlil črevnú regeneráciu, zlepšil bakteriálny klírens a zlepšil ischemicko-reperfúzne poškodenie pečene.

Veľmi zaujímavé je pôsobenie L-arginínu na zlepšenie hojenia rán. Suplementácia prekursoru NO zlepšuje hojenie rán pravdepodobne dvomi mechanizmami. Oxid dusnatý vytvorený z L-arginínu zlepší krvný prietok v rane a tým aj zásobenie rany živinami. Zároveň sa zvýši obsah hydroxyprolínu a polyamínov v rane. Tento faktor by sa dal využiť napr. v terapii rán u diabetikov

V súčasnosti sa L-arginín najmä v zahraničí využíva ako doplnková terapia u pacientov:

- s kongestívnym srdcovým zlyhaním (v dávke 6-20 g denne v troch čiastkových dávkach),
- s ischemickou chorobou srdca spojenou so stenokardiami (3-6 g trikrát denne po dobu jedného mesiaca)
- užívajúcich glyceroltrinitrát ako prevencia vzniku tolerancie (700 mg štyrikrát denne),
- s erektilnou dysfunkciou (5g denne), neplodnosťou a sexuálnymi problémami,
- s intermitentnými klaudikáciami,
- po chirurgických zákrokoch,
- po transplantácii obličky (posilnenie imunitného systému a zlepšenie funkcie obličiek),

- so zápalom močového mechúra,
- s HIV/AIDS,
- so zápalovými ochoreniami GITu
- u predčasne narodených detí 261 mg / kg po dobu prvých 28 dní života,
- s neurodegeneratívnymi ochoreniami alebo u starších osôb so zníženými mentálnymi funkciami,
- s nádorovými ochoreniami prsníka, hlavy a krku
- s chronickými ranami.

Zdraví jedinci ho často užívajú na:

- zlepšenie športového výkonu (fitness, body-building), kde L-arginín prostredníctvom stimulácie rastového hormónu podporuje tvorbu svalovej hmoty,
- na zlepšenie sexuálneho výkonu u mužov a zvýšenie sexuálnej vzrušivosti u žien,
- ako “spaľovač tukov” – pri dávke 500 mg denne, pričom účinok je potencovaný pri podávaní s L-karnitínom,
- alebo ako prevenciu nachladnutia a migrény, napr. v kombinácii s ibuprofénom.

Aj napriek tomu, že sa L-arginín nachádza v kategórii doplnkov výživy nie je vhodný pri všetkých ochoreniach. ***Jeho užívanie sa nedoporučuje a v niektorých prípadoch je kontraindikované:***

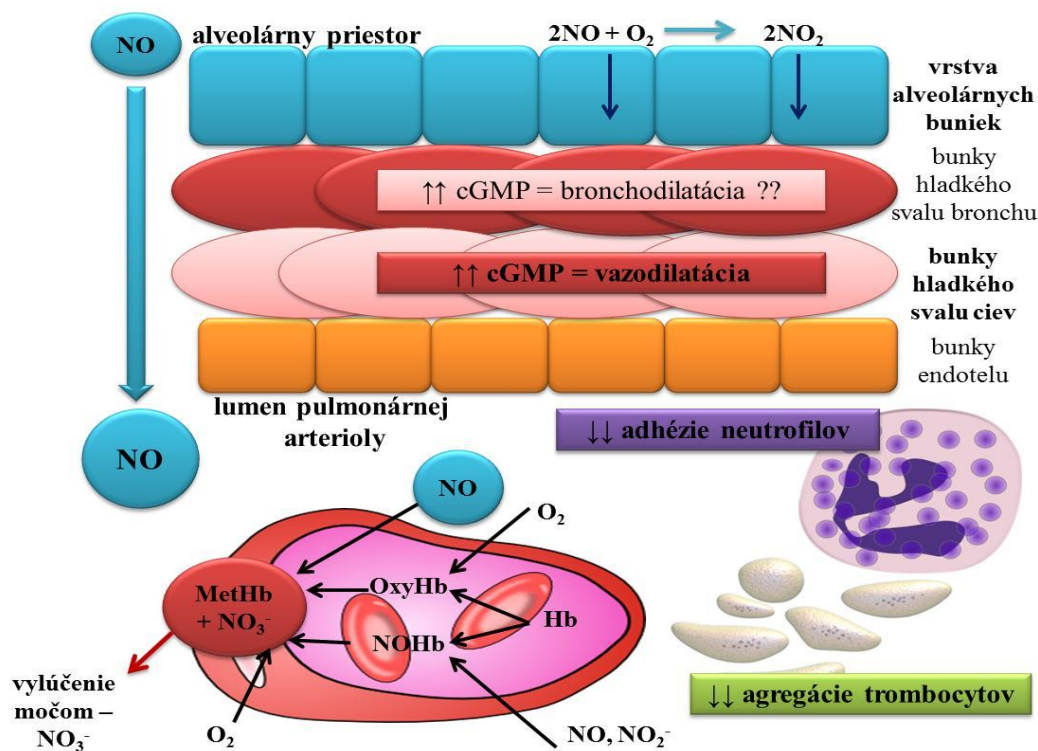
- *v tehotenstve a počas dojčenia* z dôvodu nedostatočných informácií o dlhodobom užívaní v priebehu gravidity a účinkoch na plod,
- *u detí* – príliš vysoké dávky u detí môžu vyvolať závažné nežiaduce účinky vrátane úmrtia,
- *pri alergických ochoreniach a astme*, kedy môže dôjsť k zhoršeniu stavu,
- *pri herpes zoster*, pretože L-arginín potencie herpetickú infekciu,
- *pri hypotenzii*, ktorú môže zhoršiť,
- *po prekonanom infarkte myokardu*,
- *2 týždne pred plánovaným chirurgickým zákrokom*.

Podobne ako pri iných formách terapie, aj v tomto prípade je vhodné venovať pozornosť prípadným ***liekovým interakciám***. L-arginín by sa nemal užívať s antihypertenzívami, nitrátmi a inhibítormi fosfodiesterázy. Nebezpečná je hlavne kombinácia so sildenafilom, ktorá môže vyvolať závažné formy hypotenzie. Interakcie s potravinami nie sú známe.

V súvislosti s aplikáciou L-arginínu boli zaznamenané aj viaceré **nežiaduce účinky** (bolesti brucha, nadúvanie, hnačka, dna, poruchy krvotvorby, alergické reakcie, zápal priedušiek, zhoršenie astmy a hypotenzné príhody).

7.2 Inhalovaný NO

Inhalačná aplikácia oxidu dusnatého (INO) využíva jeho základné vlastnosti - ide o plynú látku bez farby a zápachu. Po vdýchnutí rýchlo difunduje cez alveolo-kapilárnu membránu a po naviazaní na hemoglobín sa šíri do pľúcnej cirkulácie. Tam pôsobí vazodilatačne čo následne môže znížiť pľúcnu vaskulárnu rezistenciu, zlepšiť ventilačno-perfúzny pomer, zlepšiť arteriálnu oxygenáciu a hemodynamickú stabilitu (obr.19).



Obrázok 19. Mechanizmus účinku inhalovaného oxidu dusnatého na hladký sval bronchov, ciev a krvné bunky

*NO – oxid dusnatý, cGMP – cyklický guanozínmonofosfát, O_2 – kyslík, NO_2^- – nitrit, NO_3^- – nitrát, Hb – hemoglobín, MetHb – methemoglobín, OxyHb – oxyhemoglobín, NOHb – komplex oxidu dusnatého s hemoglobínom

U dospelých pacientov je potenciálnou indikáciou inhalácie NO akútne poškodenie pľúc, syndróm akútnej respiračnej tiesne (ARDS), akútne zlyhanie pravej

srdcovej komory, akútna pľúcna embólia alebo komplikácie pľúcnej chirurgie. Prvou klinickou štúdiou bolo použitie INO u pacientov s ARDS v roku 1993. Odvtedy bolo vykonaných viac malých randomizovaných štúdií naznačujúcich zvýšenú mortalitu u pacientov s ARDS s terapiou INO, avšak tieto výsledky je potrebné vnímať s určitou rezervou. Toto ochorenie je veľmi závažné a pacienti obyčajne nezomierajú na hypoxiu, ale na multiorgánové zlyhanie. Na druhej strane, INO bol úspešne použitý u pacientov v kardiogénnom šoku alebo s akútnym infarktom myokardu. Boli tiež zaznamenané prípady pozitívneho pôsobenia po akútnej pľúcnej tromboembólii. Zatiaľ sú to však prípady akútnych zásahov, ale v dlhodobej terapii nie je použitie INO u dospelých schválené.

Aktuálne používanou a schválenou indikáciou je inhalácia NO pri hypoxickom respiračnom zlyhaní u novorodencov, ktoré môže byť vyvolané perzistujúcou pľúcnou hypertenziou u novorodencov (PPHN), ARDS, syndrómom aspirácie mekónia, zápalom pľúc, sepsou, vrodenu herniou bránice alebo vrodenými anomáliami srdca.

Oxid dusnatý je podávaný najmä novorodencom s PPHN, v iných indikáciách sa táto terapia zatiaľ neosvedčila. Je dávkovaný pomocou prietokomeru alebo ventilátora v malých, kumulujúcich sa množstvách začínajúcich na úrovni 1 - 5 ppm. Maximálne dávky sa u novorodencov pohybujú na úrovni cca 30 - 40 ppm. Z parametrov nastavenia je dôležitý hlavne inspiračný prietok a minútová ventilácia. Dôležité je tiež nastavenie určitého optimálneho pomeru NO a O₂ – tzv. „zmiešavanie“ plynov pri inhalácii. Aplikácia INO v začiatkoch narážala na veľké problémy. Kontinuálne aplikovaný INO sa pri výdychu dostával do okruhu ventilátora, kde mal tendenciu akumulácie a pacient následne dostával toxické bolusové dávky NO/NO₂. Na základe viacerých bezpečnostných odporúčaní bol vypracovaný systém mechanickej ventilácie, ktorý používa integrovaný vstrekovač INO (plynový injektor) a snímač NO s rýchlou odozvou plynového monitoringu a alarmom. Súčasťou zariadenia je systém, ktorý mieša NO s kyslíkom tak, aby sa zabránilo vzniku toxických produktov (ROS). INO môže byť aplikovaný len pomocou schváleného aplikačného systému. V súčasnej dobe existujú tri schválené zmesi na inhaláciu – INOvent, INOmax DS a AeroNOx. Všetky sú obvykle používané s vysokofrekvenčnými oscilačnými alebo vysokofrekvenčnými tryskovými ventilátormi.

Nežiaduce účinky inhalácie NO

Pri vdýchnutí extrémne vysokých dávok (5000 - 20000 ppm) môže mať oxid dusnatý *priamy toxický vplyv na pľúca*. Jeho schopnosť vytvárať voľné radikály sa následne prejaví v poškodení proteínov surfaktantu a znížení povrchového napätia v alveolách. Jedným z vedľajších toxických produktov NO je oxid dusičitý (NO₂). V experimentálnych podmienkach poškodzoval epitel terminálnych bronchov a redukoval počet cilií. V klinických podmienkach zvyšoval reaktivitu dýchacích ciest a zhoršoval alveolárno-kapilárnu permeabilitu. Kumulácia NO₂ hrozí pri nedodržaní optimálneho pomeru medzi INO a O₂.

Ďalším nežiaducim účinkom inhalácie je *methemoglobinémia*. Z dôvodu vzniku methemoglobinémie sa odporúča začínať inhaláciou malých dávok (1 - 5 ppm) a pravidelne kontrolovať hladiny methemoglobínu. Methemoglobinémia môže mať niekoľko foriem, od nezávažnej až po smrteľné formy. K hlavným prejavom methemoglobinémie patrí metabolická acidóza s dyspnoickým a tachypnoickým dýchaním, postupne narastajúca cyanóza a zmena farby krvi na takmer hnedú. Základnou liečbou methemoglobinémie je aplikácia metylénovej modrej, výmenné transfúzie a v prípade potreby aj hyperbarická oxygenácia.

Za ďalšie riziko inhalácie NO sa považuje *inhibícia agregácie trombocytov*, čo zvyšuje riziko krvácania. Toto riziko však nebolo v klinických štúdiách preukázané.

Je zaujímavé, že použitie INO je schválené len u detských pacientov. Práve preto si aplikácia oxidu dusnatého vyžaduje dokonalý monitoring fyziologických parametrov – hemoglobínu, hematokritu, koagulačných parametrov, kardio-respiračný a hemodynamický monitoring.

Dôležitá je tiež bezpečnosť personálu a ostatných pacientov, preto je nutné zabezpečiť elimináciu nevyužitého plynu a znížiť riziko vplyvu NO a NO₂. To by malo byť zabezpečené používaním špeciálnych filtrov alebo odsávacím systémom nemocničných zariadení.

7.3 Donory NO

Zníženie hladiny oxidu dusnatého sa podieľa na celom spektre ochorení rôznych orgánových systémov. Vzhľadom na limitujúce vlastnosti NO (plynná forma a veľmi

krátky biologický polčas) je v súčasnosti nesmiernou výzvou vývoj pevných liekových foriem, ktoré by zabezpečovali v organizme optimálnu hladinu NO.

Donory NO sú látky, ktoré neovplyvňujú metabolickú cestu tvorby oxidu dusnatého, ale sami ho uvoľňujú v optimálnom prostredí. Sú to látky, ktoré napodobňujú alebo zlepšujú fyziologické účinky NO *prostredníctvom*:

- priameho uvoľnenia NO zo svojej chemickej štruktúry termálnym alebo fotochemickým rozkladom,
- uvoľnenia NO prostredníctvom chemických reakcií s kyselinami, alkalickými zlúčeninami, iónmi kovov a pod.,
- enzymatickej oxidácie,
- poskytnutia ďalších možností pre jeho syntézu
- kombinácie uvedených mechanizmov.

Intenzívny výskum v tejto oblasti ponúka zaujímavý prehľad širokého spektra látok. Od klasických organických nitrátov cez látky s kontrolovaným uvoľňovaním NO až po liečivé prípravky selektívne uvoľňujúce oxid dusnatý len v niektorých tkanivách. Na základe chemickej štruktúry môžeme *donory NO rozdeliť na*:

- organické nitráty,
- sydnonimíny
- pirsidomíny,
- donory s cysteínom, donory s guanidínom, N-hydroxy-guanidíny,
- diazeniumdioláty (NONOáty),
- produkty N-nitrozylácie krvných proteínov a NO,
- S-nitrozotioly,
- komplexy NO s iónmi kovov,
- N-nitrozamíny a N-hydroxyl-nitrozamíny, nitrozimíny,
- diazetíndi oxidy,
- furoxany a benzofuroxany,
- oxatriazol-5-imíny,
- oxímy,
- hydroxyamíny,

- deriváty hydroxyurey,
- deriváty kys. hydroxamovej,
- nitroarény.

Z týchto liečivých prípravkov je oxid dusnatý uvoľňovaný neenzymatickou alebo enzymatickou cestou. V procese enzymatického uvoľnenia je aktívny cytochróm P450, xantínoxidáza, membránovo viazané enzýmy, kataláza, peroxidázy, NO-syntázy a guanylát cykláza. Za hlavný faktor neenzymatického uvoľnenia je považovaný fotochemický vplyv svetla. Ďalej je to pôsobenie tiolov prostredníctvom zvýšenia –SH skupín, $\text{pH} > 5$, spontánne uvoľnenie vo vodnom roztoku, prítomnosť OH^- skupín, autooxidácia v prítomnosti iónov kovov, prítomnosť O_2 , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CuZn-SOD}$, ceruloplazmínu, hem-obsahujúcich proteínov a pod.

História vývoja donorov NO vychádza z fyziologických účinkov tohto mediátora, konkrétne jeho schopnosti regulácie cievneho tonusu ako jednej zo základných podmienok správnej funkcie kardiovaskulárneho systému. Porušenie kaskády S-GC/cGMP a tým aj následnej relaxácie hladkého svalu je jednou z príčin vzniku kardiovaskulárnych ochorení. Aj preto bola substitúcia NO v nízkych koncentráciách atraktívnou možnosťou terapie. Chemická všestrannosť oxidu dusnatého viedla k syntéze množstva donorov NO, z ktorých každý má určitý spôsob a rýchlosť uvoľňovania mediátora do okolia. Používanie je však limitované vznikom tolerancie, ktoré sa mení v závislosti na chemickej štruktúre. Pritom je zaujímavé, že napriek významnému potenciálu NO práve v terapii kardiovaskulárnych ochorení sa na trh od roku 1980 nedostali žiadne nové donory NO využiteľné v klinickej praxi.

Neskôr sa objavili látky schopné uvoľňovať NO - dlhodobejšie uvoľňovače NO (napr. NCX-4016) ale aj pôsobiace selektívne v niektorých tkanivách. Významným prelomom bolo naviazanie NO uvoľňujúcej zložky na nesteroidné protizápalové lieky (NSAIDs) s významným poklesom ulcerogénneho pôsobenia. NO-NSAIDs boli použité aj u človeka, pričom bol dokázaný vyšší protizápalový a analgetický účinok s minimalizáciou nežiaducich účinkov na GIT. Okrem toho NO-NSAIDs urýchlňovali hojenie už existujúcich ulcerácií v žalúdku. Tieto zistenia opäť rozširujú potenciál prípravy donorov NO.

V experimentálnych podmienkach boli dokázané mnohé účinky donorov NO, z ktorých sa v klinickej praxi využíva najmä *vazodilatačný efekt*. Z ďalších, potenciálne

klinicky využiteľných účinkov týchto látok môžeme spomenúť *antiagregačný efekt, protinádorové účinky, protivírusové účinky, inhibíciu osteoporózy a zmiernenie príznakov diabetes mellitus*. Zaujímavá je tiež *možná bronchodilatačná aktivita* donorov NO a ich využitie k ovplyvneniu hyperreaktivity dýchacích ciest. Medzi donory NO, ktorých využitie sa plánovalo aj terapii ochorení respiračného systému nepochybne patrí aj jeden z najslávnejších - sildenafil. Táto látka signifikantne redukuje pľúcnu hypertenziu u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc a zvyšuje tiež účinky inhalovaného NO s následnou úpravou zdravotného stavu.

7.3.1 Nitrovazodilatátory

Tieto látky sa v klinickej praxi používajú už viac ako 100 rokov. Ich indikáciou bola hlavne angina pectoris, ale sú použiteľné aj pri iných ochoreniach ako napr. infarkt myokardu a kongestívne srdcové zlyhanie. V súčasnosti sa viaceré z nich bežne využívajú napríklad v terapii stabilnej a nestabilnej anginy pectoris. Benefit týchto liekov tu spočíva v schopnosti venóznej vazodilatacie, znížení plniaceho tlaku v ľavej srdcovej komore s následným znížením spotreby kyslíka myokardom. Transdermálna aplikácia môže zmierňovať aj iné cievne ochorenia spojené s vazokonstrikciou napr. Raynaudov syndróm. Všetky tieto zlúčeniny sa správajú ako prekursori a prejavia svoje farmakologické účinky až po ich zmetabolizovaní na NO. Uvoľnenie oxidu dusnatého je výsledkom enzymatického alebo neenzymatického pôsobenia.

Rozdeľujeme ich na:

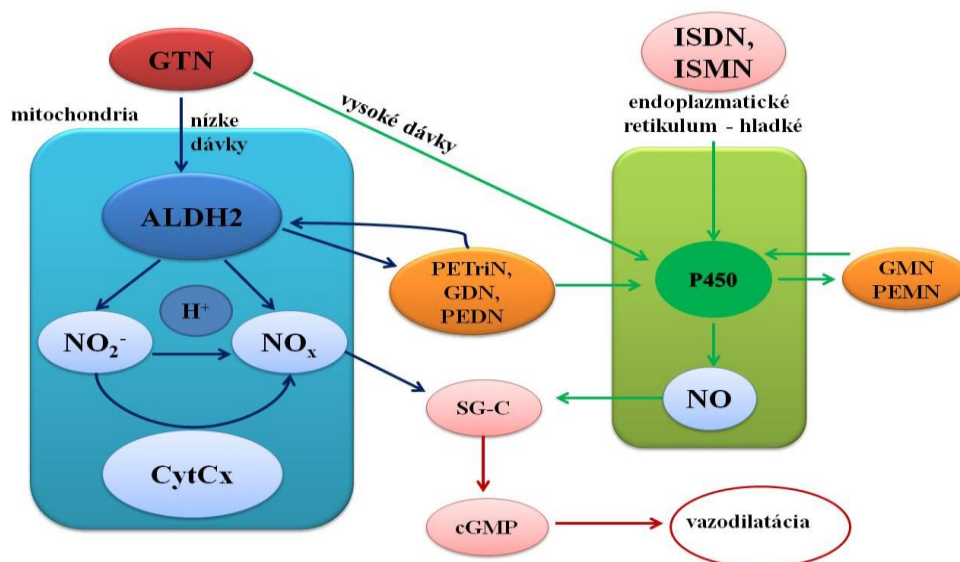
- organické nitráty – napr. glyceroltrinitrát (GTN), izosorbiddinitrát, amylnitrit a pod.
- anorganické nitrozo zlúčeniny - napr. nitroprussid sodný
- sydnonimíny – napr. molsidomín, SIN-1
- S-nitrozotiol – napr. S-nitrozo-N-acetyl-D,L-penicilamín.

Organické nitráty

Patria medzi najčastejšie používané donory NO. Ku klasickým, v klinickej praxi používaným organickým nitrátom patrí nitroglycerín, izosorbiddinitrát

a izosorbidmononitrát. Tieto látky vyvolávajú venóznú i arteriálnu vazodilatáciu prostredníctvom simulácie základného účinku oxidu dusnatého. Ich mechanizmus účinku je spojený s aktiváciou rozpustnej guanylát cyklázy a inhibíciou vápnikových kanálov v hladkej svalovine ciev.

Glyceroltrinitrát (GTN) – *nitroglycerín* - je najlepšie preskúmaným donorm NO využívaným v terapii ischemickej choroby srdca. Jeho účinok spočíva v aktivácii mitochondriálnej aldehyddehydrogenázy. Je to intracelulárny enzým obsahujúci aktívne sulfhydrylové skupiny, ktorý po aktivácii GTN uvoľní 1,2- glyceroldinitrát a oxid dusnatý. NO následne aktivuje rozpustnú guanylát cyklázu a kaskádou reakcií spojenou s aktiváciou druhého posla vyvolá vazodilatáciu (obr.20). Aplikuje sa najčastejšie sublinguálne a jeho účinok pretrváva 15-30 minút po podaní.



Obrázok 20. Metabolizmus organických nitrátov s následným mechanizmom účinku
 (GTN - glyceroltrinitrát je metabolizovaný aldehyddehydrogenázou (ALDH2) na nitráty, ktoré sú ďalej inaktivované cytochrómových reťazcom (CytCx) alebo vytvárajú NO (oxid dusnatý) a jeho deriváty (NOx), ktoré následne aktivujú GC-S (rozpustnú guanylát cyklázu). Enzým tiež metabolizuje GTN na pentaerytrityl trinitrát (PETriN), glyceroldinitrát (GDN) a pentaerytrityl dinitrát (PEDN). Izosorbid dinitrát (ISDN) a izosorbidmononitrát (ISMN), ale tiež glycerol mononitrát (GMN) a pentaetylmononitrát (PEMN) sú metabolizované cytochromom P450 v hladkom endoplazmatickom retikule. Uvoľnený NO následne opäť aktivuje kaskádu GC-S/cGMP (cyklický guanozín monofosfát).

Izosorbiddinitrát a **izosorbidmononitrát** majú obdobné účinky ako GTN. Izosorbidmononitrát je aktívnym metabolitom izosorbiddinitrátu. Obidva sa aplikujú perorálne alebo sublinguálne. Ich biologická dostupnosť je 100%.

Antiagregačný účinok organických nitrátov nie je považovaný za klinicky dôležitý. Tento efekt nie je totiž možné dosiahnuť bez významne hypotenzného účinku.

U žien s rizikom *predčasného pôrodu* spôsobuje glyceroltrinitrát zníženie kontrakility maternice a predlžuje trvanie gravidity bez negatívnych vplyvov na matku a plod. Tieto účinky bude však potrebné ešte potvrdiť, je ale možné, že GTN by mohol zabrániť predčasnému pôrodu.

Účinok nitrátov bol tiež sledovaný v *terapii osteoporózy*, kde glyceroltrinitrát a izosorbidmononitrát u postmenopauzálnych žien bránili nadmernej rezorbcii kostného tkaniva a podporovali tvorbu kostí. Lokálna aplikácia glyceroltrinitrátu tiež *zmierňuje zápalové prejavy tromboflebitídy*. Úloha nitrátov v *terapii neurodegeneratívnych ochorení* je diskutabilná. Nové modifikácie štruktúry nitrátov, tzv. S-nitráty, boli úspešné v experimentálnej terapii neurónového poškodenia. Výsledky poukazujú na neuroprotekciiu týchto látok a tiež na zlepšenie pamäte a kognitívnych schopností, čo by mohlo mať význam napr. u pacientov s Alzheimerovou demenciou.

K hlavným limitujúcim faktorom použitia GTN a jeho metabolitov resp. analógov patrí postupný *vývin tolerance*, ktorý pravdepodobne súvisí s:

- vyčerpaním -SH skupín, ktoré predstavujú jednu z transportných a zásobných foriem NO,
- ovplyvnením systému renín-angiotenzín so zvýšením produkcie endotelínu-1,
- zvýšením produkcie superoxidového aniónu prostredníctvom zvýšenia clearance oxidu dusnatého,
- ovplyvnením tvorby cGMP prostredníctvom desenzitizácie guanylát cyklázy alebo zvýšením aktivity fosfodiesteráz.

Okrem toho štúdie na zvieratách i ľuďoch poukázali na súvislosť tolerance s endoteliálnou dysfunkciou a zvýšením oxidačného stresu. Vývinu tolerance sa dá zabrániť integráciou časového intervalu bez užívania nitrátov do terapie. To však môže byť problematické pre niektoré formy anginy pectoris a je jednoznačnou prekážkou dlhodobého používania nitrátov pri chronických ochoreniach kardiovaskulárneho systému.

Z ďalších problémov je nutné upozorniť na vznik *methemoglobiniémie*, ktorá môže byť, podobne ako pri inhalácii NO odstupňovaná od ľahkých až po veľmi ťažké, v niektorých prípadoch až smrteľné formy hlavne v detskom veku. Tento účinok je však

možné naopak využiť v liečbe otravy kyanidom (dusitan sodný – NaNO_2), kedy sa železo v molekule methemoglobínu veľmi dobre viaže na kyanidové ióny a rýchlo obnovuje cytochrómový reťazec.

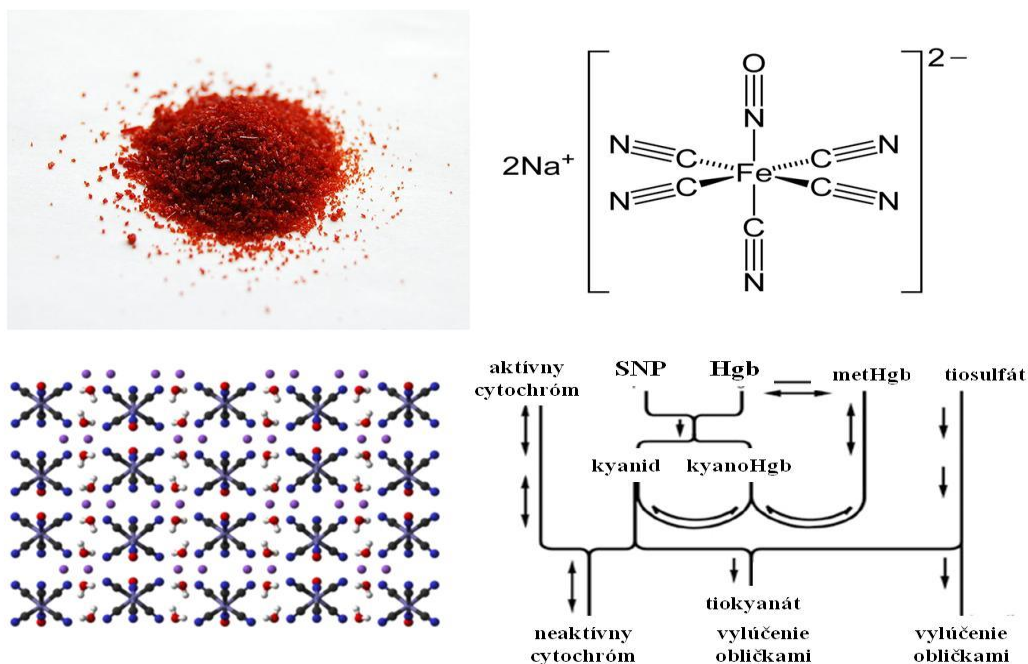
Ďalšou účinnou látkou patriacej do tejto skupiny je **amylnitrit** (*dusitan amylnatý*). Je to ester kyseliny dusitej a amylalkoholu, ktorý má vazodilatačné vlastnosti. V zahraničí sa používa v terapii ischemickej choroby srdca a pri otrave kyanidom. Je tiež často zneužívaný ako tzv. „rekreačná droga“, ktorá vyvoláva tachykardiu, hypotenziu, omámenie, eufóriu a zvýšenie sexuálnej túžby. Na Slovensku liek s danou účinnou látkou nie je v súčasnosti registrovaný.

K najvýraznejším **obmedzeniam užívania** organických nitrátov patrí relatívne krátky účinok a vznik tolerancie, ktorá môže vzniknúť už za 24 hodín. Podávanie nitrátov tlmí tiež endogénnu produkciu NO v cievach, čo významným spôsobom ovplyvňuje možnosť dlhodobej terapie. **Nežiaduce účinky** sú spojené s vazodilatačným pôsobením. Je to najmä posturálna hypotenzia, tachykardia a bolesti hlavy.

Anorganické nitráty

Ďalším klinicky významným donorom je nitroprusid sodný. Tento liek je používaný v akútnej nemocničnej starostlivosti na rýchle zníženie krvného tlaku napr. pri hypertenznej kríze. Podobne ako organické nitráty, aj nitroprusid sodný pôsobí vazodilatačne, selektívnejšie viac na artérie ako vény. Mechanizmus uvoľňovanie NO z nitroprusidu sodného v tkanivách nie je ešte úplne objasnený. Po uvoľnení však aktivuje guanylát cyklázu v hladkom svale ciev s následným zvýšením produkcie cGMP. Výsledkom je vazodilatácia, zníženie periférnej cievnej rezistencie a s tým spojené zníženie afterload a preload. Preto je možné použiť ho aj v prípadoch srdcového zlyhania.

Nitroprusid sodný sa rýchlo rozkladá (1-2 s) a uvoľňuje kyanidové ióny, hlavne v prítomnosti svetla. Kyanid reaguje s hemoglobínom a látkami obsahujúcimi síru, napr. tiosíranom. Pokiaľ nie je k dispozícii dostatok tiosulfátov, kyanid môže veľmi rýchlo dosiahnuť toxické hladiny (obr.21).



Obrázok 21. Nitroprusid sodný – chemická štruktúra, 3-D (kryštalická) štruktúra a schéma metabolizmu

Metabolit nitroprusidu - tiokyanát má polčas vylučovania niekoľko dní, preto je dôležité monitorovať jeho hladiny najmä u pacientov s poruchami renálneho systému. Pokiaľ nie je kyanid rýchlo detoxikovaný, môže vyvolať závažné nežiaduce účinky. K príznakom otravy kyanidom patria: zmena vedomia až kóma, oslabenie až vymiznutie reflexov, oslabenie srdcových oziev, hypotenzia, metabolická acidóza, ružová farba kože, plytké dýchanie, mydriáza. Príznaky sa obyčajne objavujú pri podávaní dávok vyšších ako 3mg/kg/min.

Vo všetkých indikáciách by sa mal nitroprusid sodný aplikovať len intravenózne pomocou infúznej pumpy v dávke 0,01 mg/kg/min. Na zmiernenie príznakov toxicity kyanidov je možné k terapii pridať tiosíran sodný, ktorý zvyšuje rýchlosť premeny kyanidov.

Okrem klinického využitia pri malígnej hypertenzii či srdcovom zlyhaní má nitroprusid sodný svoje postavenie aj v experimente. Často je využívaný vo výskumných prácach v súvislosti s testovaním vazodilatačných účinkov nezávislých na endoteli, na kalibráciu spektrofotometrov, pri chromatografii, pri testovaní moča ako činidlo a pod.

Sydnonimíny

Hlavným predstaviteľom tejto skupiny je *molsidomín* a jeho aktívny metabolit *linsidomín* (*SIN-1*), ktorý vyvoláva vazodilatáciu prostredníctvom aktivácie GC-S a následne aktiváciou cGMP. Sydnonimíny zlepšujú hemodynamické vlastnosti kardiovaskulárneho systému a ich účinky sú veľmi podobné nitrátom.

Sydnonimíny, na rozdiel od klasických nitrátov nie je možné použiť v akútnej terapii. Ich účinok nastupuje až po 30-60 minútach a preto sa používajú väčšinou vo forme perorálnych tabletových prípravkov v profylaxii anginy pectoris.

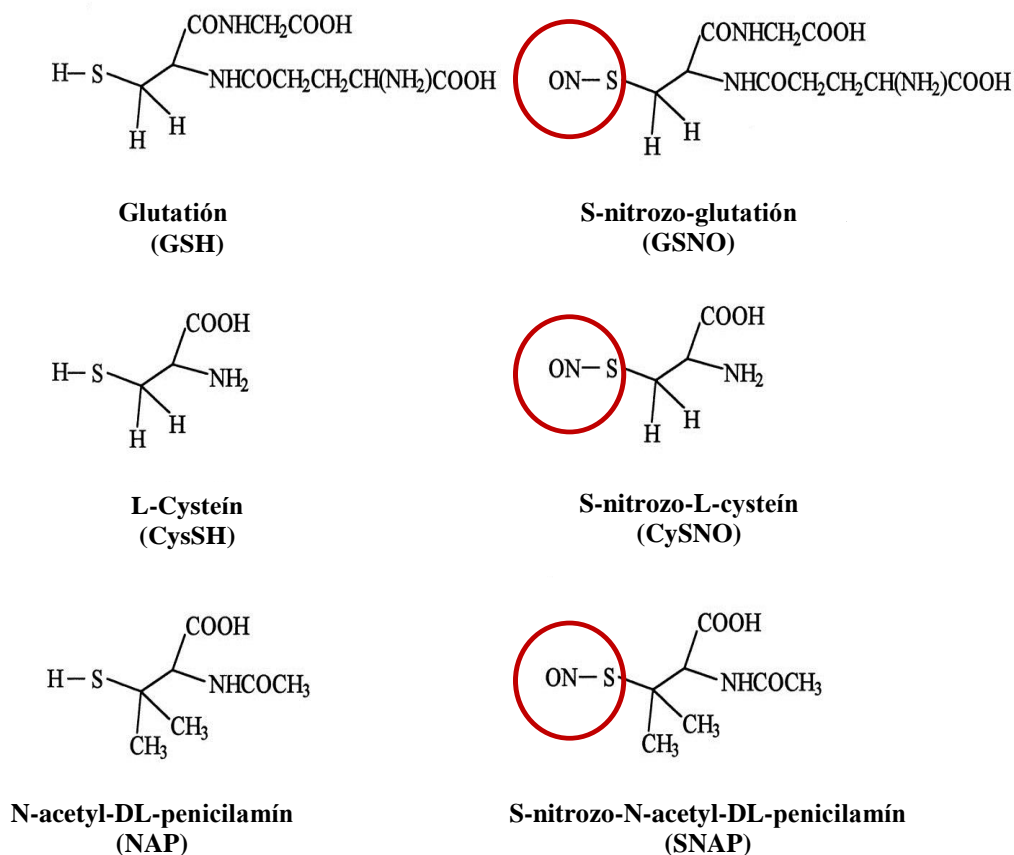
S-nitrozotiol

Skupina S-nitrozotiolov zahŕňa širokú škálu rôznych chemických zlúčenín, ktoré obsahujú chemickú väzbu medzi tiolovou (R-SH) skupinou a NO (obr.22). Pôsobia ako “zásobáreň” oxidu dusnatého, ktorý je z nich uvoľnený prostredníctvom viacerých enzymatických a neenzymatických procesov. Biologická aktivita tiolov je tak ovplyvnená prostredím, v ktorom sa tiol nachádza a faktormi, ktoré sú schopné z tiolov uvoľniť NO. Patrí k nim napr. teplo, svetlo, prítomnosť radikálov (superoxidu) či niektorých enzýmov (napr. xantínoxidáza, superoxiddismutáza a pod.). Ich schopnosť odovzdávať oxid dusnatý prirodzeným tiolom v ľudskom organizme minimalizuje možnosť interakcií voľného NO s kyslíkom a tvorbu voľných kyslíkových radikálov. S-nitrozotiol tak majú potenciál zvýšenia intracelulárnej antioxidačnej aktivity.

S-nitrozotiol majú oproti ostatným donorom NO množstvo potenciálnych výhod. Snáď najväčšou výhodou je to, že pri dlhodobom užívaní *nevyvolávajú toleranciu*. Niektoré z nich, napr. S-nitroso-glutatión (GSNO) *sú tkanivovo selektívne*. GSNO je selektívny pre arteriálny, nie pre venózy systém. Tiež sú *silnými antiagreganciami* v dávkach, ktoré významnejším spôsobom neovplyvnia tonus ciev. Tieto vlastnosti boli dokázané vo viacerých modeloch aterosklerózy a trombózy.

S-nitrozotiol *nie sú v súčasnosti používané v bežnej klinickej praxi*, existuje však veľké množstvo animálnych i klinických štúdií, ktoré poukazujú na ich priaznivý efekt najmä na kardiovaskulárny systém. GSNO znížil výskyt mozgovej embólie a má dokázateľný antiagregačný efekt pri invazívnej kardiológii. Má tiež dokázateľný hemodynamický efekt pri preeklampsii bez vplyvu na plod. Okrem účinkov na

kardiovaskulárny systém má GSNO prostredníctvom svojho antiooxidačného vplyvu určitú pozíciu aj v oddialení vzniku neurodegeneračných ochorení a niektorí autori popisujú aj jeho neuroregeneračné účinky.



Obrázok 22. Chemická štruktúra S-Nitrozotiolov (Singh a spol., 1996)

Ďalšie S-nitrozotiolý ako *S-nitrozo-N-acetylcysteín*, *S-nitrozo-N-acetylpenicilamín* (SNAP), *S-nitrozoalbumín* zlepšovali v experimente endotelovú dysfunkciu a mali pozitívny vplyv na aterosklerózu. Substitúcia endogénnych S-nitrozotiolov tiež podporuje hojenie rán. Ich systémová aplikácia vyvolala zvýšené ukládanie kolagénu v miestach poškodenia tkaniva.

Veľmi zaujímavá je implantácia donoru NO do polyméru, ktorý umožňuje následné kontrolované vyplavenie NO. S-nitrozotiol, napr. SNAP, sa môže po chemickej úprave stať súčasťou trojvrstvého polyméru (napr. stentu), z ktorého bude NO regulovane uvoľňovaný napr. pomocou svetelného žiarenia po dobu viac ako 12 hod. Tieto tzv. „drugeluting“ stenty by mali byť súčasťou invazívnych kardiologických

intervencií. Táto možnosť robí z S-nitrozotiolov skupinu látok vhodných pre prevenciu trombózy stentu v minimálnom časovom horizonte po zákroku.

S-nitrozo-glutation je v porovnaní s organickými nitrátmi oveľa účinnejším inhibítorom agregácie trombocytov. Okrem toho inhibuje aj adhéziu týchto krvných buniek a to v dávkach, ktoré majú len minimálne vazodilatačné účinky. Jeho priaznivý účinok bol pozorovaný napríklad pri gestózach ako HELLP syndróm (hemolýza, trombocytopenia, zvýšenie pečeňových enzýmov) a pri ťažkých formách preeklampsie ale zatiaľ len v klinických štúdiách. Selektívne zameranie aktivity tohto donora na trombocyty bez rizika hypotenzného efektu umožňuje jeho využitie aj v terapii trombotických porúch samostatne alebo v kombinácii s inými antiagregačnými liekmi. S-nitrozo-glutathión má tiež neuroprotektívne účinky v podmienkach oxidačného stresu a mitochondriálnej dysfunkcie pri neurodegeneratívnych ochoreniach.

S-nitrozotiololy majú aj *antimikrobiálne a antivírusové účinky*. Inhibujú napr. replikáciu HIV-1 prostredníctvom cGMP-nezávislého mechanizmu v akútne infikovaných bunkách a stimulujú reaktiváciu chronicky HIV-1 infikovaných buniek.

7.3.2 Hybridné látky

Hybridy predstavujú látky novej dimenzie v spektre donorov NO. Predstavujú široké zoskupenie liekov, ktorých molekuly boli upravené tak, aby sa do nich dali integrovať molekuly NO. Rôzne hybridné zlúčeniny predstavujú kombinácie látok, ktoré majú synergické efekty, nízku toxicitu a minimálne nežiaduce účinky.

NO-steroidy

Adíciou polovicie nitroxybutylu do kyseliny ursodeoxycholovej vznikol steroidný preparát **NCX-1000**, ktorý je metabolizovaný selektívne v hepatocytoch. Oxid dusnatý je teda uvoľňovaný priamo v pečeňových bunkách. V experimentoch bolo preukázané, že NCX-1000 chráni proti poškodeniu pečene tým že znižuje portálny tlak a moduluje imunitný systém. Tieto vlastnosti môžu byť využité u pacientov s portálnou hypertenziou a cirhózou pečene.

Ďalším preparátom je **NCX-1015 – nitro-prednizolón**, ktorý zatiaľ vykazuje pri akútnych i chronických zápaloch výraznejšie účinky ako klasický prednizolón. V tomto

prípade pôsobí oxid dusnatý synergicky s glukokortikoidným protizápalovým účinkom a tiež blokuje nežiaduci účinok prednizolonu na osteoklasty. V experimente mal NCX-1015 tiež významné bronchodilatačné účinky. Potenciálny synergizmus steroidov a oxidu dusnatého v inhalačnej podobe mohol byť navrhnutý ako jedna z foriem účinnej terapie astmy alebo chronickej obštrukčnej choroby pľúc. Táto kombinácia môže viesť k zníženiu dávok steroidných preparátov a zabrániť nežiaducim účinkom steroidov.

NO-NSAIDs

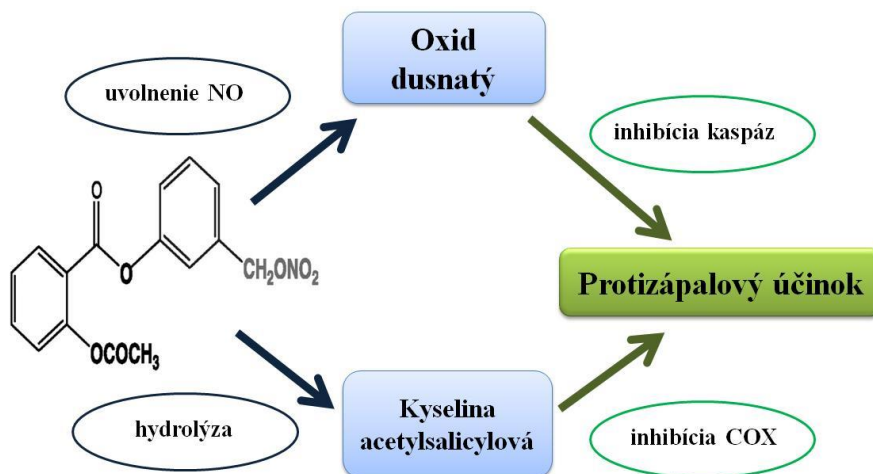
Nesteroidné protizápalové lieky sú skupinou liekov, ktorá je využívaná v terapii miernych a stredne ťažkých bolestivých a zápalových ochorení. Niektoré z látok majú tiež antiagregačné a antipyretické účinky. Kombinácia ich relatívne vysokej účinnosti a nízkych nákladov ich radí k najpoužívanejším liekom. Klasickým predstaviteľom NSAIDs je kyselina acetylsalicylová (ASA). Jej chronické užívanie napr. pri reumatizme alebo artritíde je spojené so závažnými nežiaducimi účinkami v oblasti GITu vrátane ulcerácií a akútnych príhod spojených s krvácaním. Oxid dusnatý má na sliznicu žalúdka viaceré protektívne účinky:

- zvyšuje sekréciu hlienu,
- zvyšuje prietok krvi v sliznici žalúdka
- podporuje hojenie ulcerácií v žalúdku.

Práve z tohto dôvodu boli vyvinuté NO-NSAIDs, ktoré mali znížiť riziko nežiaducich účinkov NSAIDs na gastrointestinálny trakt.

Prvými derivátmi boli deriváty kys. acetylsalicylovej – tzv. „**nitroaspiríny**“ – **NCX4016** a **NCX4215**. V experimentoch dokázali potlačiť zápal bez toho, aby indukovali ulcerácie v žalúdku. Okrem toho mali porovnateľné, alebo vyššie antiagregačné účinky ako ASA, pričom neviedli k neprimeranej vazodilatácii alebo hypotenzii. Kým samotná kyselina acetylsalicylová blokuje cyklooxygenázu, jej kombinácia s oxidom dusnatým inhibuje aj ďalšie cesty zápalu (obr.23). **NCX4016** inhibuje účinok kaspázy-1 a následne i ďalších prozápalových cytokínov (IL-1 β , IL-8) pravdepodobne prostredníctvom S-nitrozylácie sulfhydrylových skupín enzýmu. Nitroaspiríny tiež inhibujú uvoľňovanie TNF- α z lipopolysacharidov a makrofágov. Zatiaľ však nie je zrejmé, či ide o priamy účinok NO, alebo o účinok sprostredkovaný

cytokínmi. Nitroaspiríny sú testované aj ako antikancerogénne látky. NCX4016 bol 250-6000 x účinnejší v inhibícii rastu počtu nádorových buniek. Tiež potlačil rast adenokarcinómu v modeli tumoru hrubého čreva v podmienkach in vivo, čo poukazuje na významnejší účinok v porovnaní s účinkom samotnej ASA.



Obrázok 23. Účinok nitroaspirínu NCX4016

*NO – oxid dusnatý, COX - cyklooxygenáza

Vcelku mali NO-NSAIDs v experimentoch protektívny účinok. Znižovali poškodenie GITu, ale mali tiež neuroprotektívny účinok pri zápale mozgu a ischemii mozgu, redukovali vnímanie bolesti a zlepšovali antineoplastickú účinnosť ASA.

V súčasnosti vznikajú ďalšie kombinácie NSAIDs - NO, napr. NO-ASA, NO-flurbiprofen, NO-naproxen, NO-diklofenak, nitrofenak, NO-ibuprofén, NO-paracetamol, NO-mesalazín a pod.

NO - β blokátory

Počet ochorení kardiovaskulárneho systému celosvetovo narastá a preto je hľadanie efektívnej terapie neustále v popredí. Účinnou liečbou ischemickej choroby srdca by mohla byť práve kombinácia NO a β blokátorov. Experimentálne vytvorený enantiomér metoprololu s NO - **PF9404C** vytváral množstvá NO, ktoré viedli k vazodilatácii. Okrem toho cestou druhého posla (cGMP) inhiboval leukocyty, agregáciu trombocytov, proliferáciu hladkého svalstva ciev a mal protektívny efekt na

hypercholesterolémiu. Výsledný kardioprotektívny účinok bol vyvolaný kombináciou zvýšenia hladín NO a blokády beta receptorov.

Nipradilol je neselektívny β blokátor. Po pridaní NO k molekule nipradilolu sa zvýšila jeho vazodilatačná aktivita, potencoval β antagonistický efekt a tiež sa zvýšila selektivita k β receptorom.

Nebivolol vyvoláva endotelovo závislú vazodilatáciu sprostredkovanú cestou L-arginín/NO. Je teda *nepriamom donorom NO*. Po podaní tohto β blokátora boli tiež pozorované antitrombotické a antiagregačné účinky spojené pravdepodobne s pôsobením oxidu dusnatého.

Iné hybridy

Okrem nesteroidných protizápalových látok sa výskum zameriava aj na iné hybridné donory NO:

Nikorandil patrí medzi tzv. antianginózne preparáty. Z hľadiska mechanizmu účinku pôsobí ako otvárač draslíkových kanálov s následnou dilatáciou periférnych tepien. Úpravou nikorandilu dochádza k zníženiu rizika vzniku tolerancie, k vyššej selektivite tkanív pre oxid dusnatý a nižšej toxicite. Tieto vlastnosti robia z nikorandilu liek vhodný k terapii kardiovaskulárnych ochorení.

Pravastatín je účinný inhibítor 3-hydroxy-metylglutaryl- CoA, ktorý sa používa na zníženie hladiny cholesterolu. Používanie statínov je v terapii kardiovaskulárnych ochorení vo všeobecnosti veľmi diskutovanou problematikou nakoľko majú dramatický a signifikantný dopad na množstvo klinických výsledkov. NO-statíny mali v experimente oveľa väčšiu schopnosť inhibovať bunkovú proliferáciu ako klasické statíny a znížili tiež expresiu iNOS. *NO-pravastatín (NCX6550)* mal tiež významný inhibičný účinok na tvorbu reaktívnych foriem kyslíka

S-nitrozokaptopril (SNOCap) patrí do skupiny ACE inhibítorov. Má vazodilatačné a antiagregačné vlastnosti sprostredkované druhým poslom (cGMP), ale má zároveň schopnosť inhibície angiotenzín konvertujúceho enzýmu. Okrem toho dilatuje koronárne artérie a po i.v. aplikácii vyvoláva dlhotrvajúci hypotenziu. Výhodou je pomalší vznik tolerancie práve pre prepojenie s tiolovou skupinou. *ACE inhibítory sú tiež označované ako tzv. nepriame donory NO, t.j. zvyšujú aktivitu endogénneho oxidu*

dusnatého prostredníctvom stimulácie bradykinínových receptorov, ktoré následne uvoľňujú aj vazodilátory (NO).

Tkanivový aktivátor plazminogénu (t-PA) je endogénny enzým syntetizovaný endotelom. t-PA obsahuje jednu -SH skupinu, ktorá umožňuje t-PA priamo inhibovať trombocyty alebo zvýšiť fibrinolytickú aktivitu. Kombinácia SNO-tPA má antitrombotické a protizápalové vlastnosti a znižuje napr. vznik nekrózy myokardu po ischémií v podmienkach *in vivo*. Použitie SNO-tPA zatiaľ nie je pre klinickú prax povolené a výskum v tejto oblasti naďalej pokračuje.

Furoxany sú skupiny zlúčenín, ktoré sú v popredí záujmu chemikov už niekoľko rokov. Do existujúcej farmakologickej štruktúry látky sú vpravené pentavalentné furoxanové skupiny, ktoré upravujú jej vlastnosti. Tieto skupiny sú potom zodpovedné za vazodiláciu prostredníctvom druhého posla (cGMP). Klasickými predstaviteľmi furoxanov sú napr. dihydropyridíny – blokátory vápnikových kanálov. Podobne ako ACE inhibítory patria tiež k *nepriamym donorom* NO hlavne prostredníctvom svojej antioxidačnej aktivity a ovplyvnenia endotelovej tvorby NO. K furoxanom patria tiež niektoré antihistaminiká, inhibítory protónovej pumpy, niektoré antibiotiká a iné.

Zeolity patria k posledným novinkám v oblasti vývoja donorov NO. Sú tvorené mikroporéznymi materiálmi obsahujúcimi ióny kovov, ktoré viažu NO. Jedinečnosť týchto materiálov spočíva v tom, že predstavujú výrazný depozit oxidu dusnatého, ktorého miera uvoľňovania môže byť regulovaná pórovitosťou materiálu (zeolitu), prítomnosťou kovových iónov v rámci zloženia a charakteru materiálu. To umožňuje vývoj celého spektra rôznych materiálov ako sú napr. antimikrobiálne povrchy na močové katétre, antitrombotické nátery na stenty, bypassy, kanyly, katétre a pod.

Farmakologická modulácia NO sa rozširuje aj na ďalšie látky. Vznikajú hybridy NO s antikoagulantami, cytostatikami, inhibítormi receptorových systémov a pod. Aj napriek zrejmemu potenciálu a obrovskému výskumnému rozsahu existuje len veľmi málo výstupov, ktoré sa nakoniec dostanú do klinického testovania a budú zaregistrované. Vývoj nových donorov NO je však nepochybne správnu cestou hľadania látok s výhodnejšími vlastnosťami, ktoré by mohli získať uplatnenie nielen

v terapii kardiovaskulárnych ochorení, ale i v terapii neurodegeneračných ochorení, mikrobiálnych ochorení, pri hojení rán a pod.

Azda najvýznamnejší pokrok vo vývoji donorov NO nastal v oblasti ich potenciálneho antikancerogénneho účinku. Oxid dusnatý produkovaný aktivovanými makrofágmi má dôležité postavenie v modulácii obranných mechanizmov voči nádorovým bunkám. Niektoré experimentálne práce poukazujú na to, že donory NO sú cytotoxické na vybrané línie nádorových buniek, u ktorých vyvolávajú apoptózu. Pokiaľ však vysoké koncentrácie NO nebudú pod kontrolou, môže sa tento účinok zmeniť na prokancerogénny prostredníctvom ovplyvnenia DNA. Dvojaká úloha oxidu dusnatého v kancerogenéze je preto stále v centre pozorovania a je potrebné ju detailnejšie objasniť. Sľubnými protinádorovými liečivami zo skupiny donorov NO sú tzv. NONOáty.

Diazeniumdioláty (NONOáty)

Diazeniumdioláty sú komplexy NO s nukleofilnými látkami, pričom podiel samotného NO predstavuje 40%. Sú priamymi donormi NO. Prvým NONOátom bol dietylamín NONOát (DEA/NO), syntetizovaný už v roku 1960. NNNOáty si však získali väčšiu pozornosť až po roku 1990. NONOáty sa spontánne rozkladajú v roztokoch pri fyziologickom pH a teplote a vytvoria 2 molárne ekvivalenty NO. Výhodou týchto zmesí je to, že ich rozklad nie je katalyzovaný napr. prítomnosťou tiolov, ale mieru uvoľňovania NO je možné presne predpokladať. Následná biologická aktivita (vazodilatácia, inhibícia agregácie trombocytov, inhibícia zrážania krvi a inhibícia proliferácie hladkého svalu ciev) koreluje s množstvom NO vytvoreným v podmienkach in vitro.

Základný výskum v oblasti syntézy NONOátov sa sústredil na šesť hlavných oblastí resp. účinkov. Konkrétne ide o ich potenciál využitia v terapii kardiovaskulárnych ochorení, onkologických ochorení, gastroenterologickú a antimikrobiálnu terapiu, liečbu rán a protizápalovú terapiu využiteľnú predovšetkým v chirurgických odboroch. V súčasnej dobe nie sú tieto látky použiteľné v klinických podmienkach aj napriek tomu, že boli testované na experimentálnych modeloch viacerých ochorení kardiovaskulárneho systému. Pri aplikácii NONOátu vo forme

aerosolu v kombinácii s povrchovo aktívnymi látkami by mohli byť tieto použité napr. v terapii pľúcnej hypertenzie či akútneho poškodenia pľúc. Inhibícia agregácie trombocytov by mohla byť využiteľná pri miniinvazívnych kardiologických zákrokoch ako napr. katetrizácie. NONOáty boli tiež v experimentálnych podmienkach použité ako náter na vonkajšom povrchu detektora saturácie kyslíka, kde mali brániť vzniku trombu a nepriamo tak ovplyvneniu merania krvných plynov a elektrolytov.

Chemická úprava molekuly môže stabilizovať NONOát v roztoku a vyvolať možnosť selektívneho uvoľňovania NO v rôznych orgánoch, tkanivách či dokonca špecifických druhoch buniek. Táto úprava je zaujímavá napr. z hľadiska substitúcie vysokých koncentrácií NO do nádorových buniek a využitie jeho protinádorového účinku. Konjugované NONOáty sa preto stávajú výzvou aj pri terapii niektorých druhov onkologických ochorení, ale pred testovaním v klinických štúdiách je nevyhnutné ešte ich ďalšie sledovanie v experimentálnych podmienkach.

V súčasnosti existuje iba jedna klinická štúdia použitia NONOátov u ľudí a to pri akútnom syndróme respiračnej tiesne. Určitá predikovateľnosť uvoľnenia NO však povedie k intenzívnejšiemu klinickému výskumu. Prioritou tu však ostáva potvrdenie ich terapeutických ale i nežiaducich účinkov (tvorba karcinogénnych nitrozamínov).

Syntéza zlúčenín ktoré môžu uvoľňovať NO je relatívne jednoduchá, ale aby mohli byť tieto látky klinicky použiteľné musia byť tkanivovo selektívne, uvoľňovať NO v subtoxickom rozsahu rovnomerným, kontrolovateľným spôsobom. Bez ohľadu na množstvo nových skupín, hlavne v oblasti hybridných preparátov, *za najdôležitejšie donory NO sú stále považované organické nitráty, diazeniumdioláty a S-nitrozotiolý.*

7.4 Inhibítory NO syntáz

Nadprodukcia oxidu dusnatého je popísaná v patogenéze viacerých, prevažne chronických ochorení ako sú napr. neurodegeneratívne ochorenia, zápalové ochorenia CNS, reumatické ochorenia, astma, ulcerózna kolitída, septický šok či diabetes mellitus. V patogenéze týchto ochorení je prítomná hyperaktivita jednej alebo viacerých izoforiem NO syntáz a následné zvýšenie tvorby endogénneho oxidu dusnatého. Vývoj špecifických inhibítorov tvorby tohoto mediátora je preto ďalšou zaujímavou oblasťou

výskumu a vývoja. Zníženie tvorby oxidu dusnatého môže byť dosiahnuté blokádou membránového transportu L-arginínu do bunky, alebo priamou blokádou enzýmov syntetizujúcich NO. Prostredníctvom inhibície NO syntáz dochádza k potlačeniu zápalu a poškodenia tkaniva. V experimente boli tieto látky úspešne použité napr. na potlačenie akútneho zápalu v modeli artritídy, zápalovej nefritídy, po poraneniach, u zvierat s chronickou ileitídou, s diabetom a pod. Použitie inhibítorov NO syntáz v experimente spomaľovalo progresiu menovaných ochorení, preto je vývoj týchto látok v súčasnosti viac než žiaduci. Okrem toho sú tieto látky zaujímavé pre poznanie a podrobnú identifikáciu fyziologických a patologických procesov na ktorých participuje oxid dusnatý.

Počas ostatných 6 rokov bolo podaných viac ako 60 patentov na sledovanie účinku rôznych látok, ktoré majú charakter inhibítorov NO syntáz. Aj napriek veľkým pokrokom či už v oblasti molekulárneho modelovania štruktúry a účinku alebo výsledkov získaných v experimentálnych štúdiách, tieto látky stále nie sú používané v klinickej praxi. Animálne modely nekorelujú s modelmi humánnymi a experimenty na primátoch sú drahé a eticky diskutabilné. Viaceré z testovaných látok tiež vykazujú určitú mieru toxicity, nedostatočnú selektivitu či stratu aktivity pri prechode z podmienok „in vitro“ na „in vivo“ a naopak. Väčšina z týchto látok tiež nemá farmakokinetické vlastnosti vhodné pre perorálne použitie. Aj napriek tomu zostávajú stále perspektívne pre terapiu väčšiny patologických stavov, ktoré boli uvedené. Aplikácia množstva výsledkov experimentálnych štúdií do praxe je preto v súčasnosti stále komplikovaná. Najviac diskutovaným faktorom zostáva selektivita používaných látok vo vzťahu k izoforme NOS. V súčasnosti rozdeľujeme inhibítory NO syntázy **na základe selektivity** na:

- neselektívne,
- parciálne selektívne,
- selektívne,
- modulátory aktivity NOS (ovplyvňujú napr. kofaktory).

Na základe chemickej štruktúry môžeme inhibítory NO syntáz rozdeliť na:

- imidazoly,
- 7-nitroindazoly,
- guanidíny (etylguanidín, metylguanidín, aminoguanidín),

- iminobiotíny,
- ebselén a jeho deriváty,
- deriváty kys. α -guanidinoglutarovej,
- triesloviny,
- deriváty 3-amino- 1,2,4-triazolu,
- deriváty fencyklidínu,
- deriváty metylénovej modrej,
- izotioureu (izotiomočovinu) a jej deriváty a iné.

7.4.1 Neselektívne inhibítory NO syntáz

Ako neselektívne inhibítory NO syntáz označujeme tzv. endogénne alebo **syntetické analógy L-arginínu** napr. N-monometyl-L-arginín (L-NMMA), N-G-nitro-L-arginín (L-NA) a metylester L-arginínu (L-NAME), N-iminoetyl-L-ornitín (L-NIO) a NG-amino-L-arginín (L-NAA). Blokujú aktivitu všetkých izoforiem NO syntáz. Niektoré z týchto analógov preukázali určitú selektivitu k jednej z izoforiem NO syntáz v podmienkach „*in vitro*“, avšak rozdielna účinnosť v týchto podmienkach sa nemusí nutne prejaviť v podmienkach „*in vivo*“. Najviac používaným neselektívnym inhibítorom je L-NAME.

Jedným z mechanizmov účinku neselektívnych inhibítorov NO syntáz je blokáda L-arginínových transportných systémov, prostredníctvom ktorých sú transportované do bunky. Tým zastavia prísun substrátu pre syntézu NO. Táto blokáda môže byť reverzibilná alebo ireverzibilná. Aj napriek nedostatočnej selektivite a niektorým nešpecifickým účinkom sú inhibítory na báze analógov L-arginínu v plnej miere využívané v experimentoch. Umožnia jednak objasniť patofyziologický význam NO a tiež poukázať na protektívny účinok redukcie hladín oxidu dusnatého v podmienkach zápalu, šoku a porúch centrálného nervového systému.

L-NA inhibuje tiež aktivitu arginázy, ďalšieho enzýmu využívajúceho L-arginín.

L-NMMA môže slúžiť ako podklad pre ďalšiu tvorbu NO („náhradný substrát“).

L-NAME pôsobí aj ako antagonista muskarínových receptorov.

Vo všeobecnosti všetky neselektívne inhibítory NO syntáz inhibujú aj ďalšie enzýmy obsahujúce železo z čoho sa odvíjajú aj ich ďalšie žiaduce alebo nežiaduce účinky (blokáda katalázy, cytochrómu c a pod.).

Deriváty *L*-citrulínu a *L*-lyzínu môžu taktiež vyvolávať neselektívnu inhibíciu NO-syntáz:

***L*-tiocitrulín** je extrémne silný neselektívny inhibítor všetkých izoforiem NO syntáz, ktorý sa viaže na hemovú zložku molekuly enzýmu, čím zníži jeho redoxný potenciál. Jeho deriváty – S-etyl a S-metyl tiocitrulín boli testované v súvislosti s neurodegeneratívnymi ochoreniami, ich použitie je však obmedzené vzhľadom na nedokonalý transport do buniek.

***L*-N⁶-(*l*-iminoetyl) lyzín** patrí tiež k neselektívnym inhibítorm NOS aj napriek tomu, že vykazuje 30x väčšiu selektivitu pre iNOS ako pre nNOS. V modeli adjuvantnej aritídy mala táto látka protizápalové účinky.

Deriváty izotiourey sú účinné inhibítory NO syntáz. Ich účinok je cca 20x silnejší ako účinok analógov L-arginínu (L-NMMA, L-NA). ***S*-etyl-izotiourea** a ***S*-izopropyl-izotiourea** sú neselektívne. Pokiaľ však dôjde v chemickej štruktúre k zmenám, pri ktorých sa atómy síry z dvoch jednotiek izotiourey spoja uhlíkovým reťazcom, vytvoria nenasýtené (hetero)-cyklické krúžky. Následne vznikajú bis-izothioureové zlúčeniny, ktoré vykazujú určitú selektivitu hlavne pre indukčnú izoformu NOS. O účinku tohto typu inhibítorov existuje veľmi málo informácií, vo väčšine prípadov sa však jedná o prevažne toxický účinok v podmienkach „*in vitro*“ aj „*in vivo*“.

7.4.2 Selektívne inhibítory indukčnej NO syntázy

Indukcia NO syntázy v podmienkach *in vivo* je pravdepodobne komplexný proces vyplývajúci z aktivácie širokého spektra buniek. Nie je pravdepodobné, že indukcia nastáva súčasne vo všetkých oblastiach organizmu a preto tiež nie je možná kompletná inhibícia. Aj napriek tomu, že vývoj selektívnych inhibítorov NOS rýchlo napreduje, aj tak sa v experimentálnych ako aj klinických štúdiách na blokádu účinku iNOS používajú skôr analógy L-arginínu ako relatívne selektívne alebo selektívne inhibítory iNOS.

Selektívne inhibítory iNOS boli testované v súvislosti s bolesťou, hypotenziou, zápalom, cievnyimi mozgovými príhodami, astmou, artritídou, neuropatiami a pod. Predpokladalo sa, že inhibítory indukčnej izofomy by mohli byť efektívne v terapii uvedených ochorení. V skutočnosti žiadny testovaný inhibítor nedosiahol požadovaný efekt a pre klinickú aplikáciu nebol schválený. Zo známych inhibítorov iNOS môžeme uviesť napr. 1400 W, GW274150, GW273629, AR-C102222, ONO1714, SC-51, BBS-1, aminoguanidín a niektoré deriváty L-arginínu. Tieto boli úspešné v terapii experimentálnych animálnych modelov sepsy, zápalu pľúc, artritídy a autoimunitného diabetu.

Z hľadiska chemickej štruktúry patria *k selektívnym inhibítorom iNOS*:

- oxazolo [4,5-B] pyridíny,
- imidazolom-substituovaný benzofenon,
- deriváty kumarínu,
- N-heterocyklické zlúčeniny,
- teopederinové deriváty,
- S-[2 [(1-iminoetyl)amino]etyl]-2-metyl-L-cysteín hydrochlorid maleát,
- 3-aryltio-3-tiazolyl-, hetero- a fenylarylamíny,

Jednou z najreprezentatívnejších zlúčenín, ktorá sa považuje za selektívny inhibítor iNOS je **aminoguanidín**. Táto látka bola v experimentoch účinná u myší pri septickom šoku vyvolanom endotoxínom, ale vysoké dávky inhibítora ovplyvňovali aj ďalšie enzymatické systémy. V súčasnosti existuje mnoho prác o priaznivých účinkoch aminoguanidínu v rôznych modeloch zápalu a šoku. Nevýhodou jeho použitia je relatívne vysoká dávka. V *in vivo* experimentoch bolo nutné na vyvolanie efektu použiť až 1545 mg aminoguanidínu na kg hmotnosti. Priaznivé účinky aminoguanidínu boli tiež zaznamenané v experimentoch modelujúcich:

- diabetes mellitus (zníženie glykozylácie, inhibícia oxidačných modifikácií LDL),
- autoimunitnú encefalomyelitídu (inhibícia priebehu),
- edém pľúc (prevencia exudácie plazmy).

Tieto účinky boli spojené hlavne s inhibíciou aktivity iNOS, ale i ďalších enzýmov obsahujúcich železo (napr. kataláza). V mechanizme účinku bola tiež pozorovaná inhibícia metabolizmu histamínu a inhibícia katabolizmu polyamínov.

Hydrolýza aminoguanidínu vedie k vzniku toxických produktov – semikarbozidu a hydrazínu.

Ďalšími selektívnymi inhibítormi iNOS sú **2-sulfanetyl-guanidín** a **merkaptalkyl-guanidín**. Ich liečebný potenciál je spájaný so stavmi, v ktorých bola reálne dokázaná zvýšená expresia iNOS:

- septický šok s vazodilatáciou a hypotenziou nereagujúci na vazokonstrikčné preparáty,
- iné druhy šoku, cirhóza s endotoxémiou, akútna myokarditída, dilatčná kardiomyopatia spojená s infekciou, ťažká chronická astma, vredová choroba žalúdka, artritída, vírusové infekcie a pod.

Obidva tieto preparáty majú tiež *rádioprotektívne vlastnosti*.

Medzi selektívne inhibítory induktívnej NO syntázy môžeme zaradiť aj **glukokortikoidy**, ktoré bránia jej indukcii, **inhibítory tetrahydrobiopterínu** (N-acetylsérotonín, metotrexát, fenprokurmon a dikumarol a pod.). O skupine špecificky selektívnych inhibítorov induktívnej izoformy existuje v súčasnosti len veľmi málo údajov. V experimentoch vykazovali určité protizápalové a antinociceptívne účinky v modeloch artritídy, pankreatitídy, neuropatií, zápalu a pooperačnej bolesti. Patria k nim najmä **chinazolíny** a **aminopyridíny**.

7.4.3 Selektívne inhibítory konštitutívnych NO syntáz

Aktivita konštitutívnych izoforiem, podobne ako väčšiny Ca^{2+} -kalmodulín dependentných enzýmov môže byť inhibovaná napr. prostredníctvom antagonistov kalmodulínu (kalmidazolium, chlorpromazín). Niektoré zlúčeniny, ako je **S-metyl-L- α -tiocitrulín** a **S-etyl-L-tiocitrulín** vykazujú určitý stupeň selektivity pre nNOS.

Inhibítory nNOS boli testované hlavne v súvislosti s neurodegeneratívnymi ochoreniami ako napr. Parkinsonova, Alzheimerova a Huntingtonova choroba. Vzhľadom k tomu, že nNOS je dôležitá pre vznik NO v neurónoch, je jej ovplyvnenie považované za cestu k neuroprotekcii. K predstaviteľom experimentálnych inhibítorov patria 7-NI, L-NNA, TRIM, ARL17477 ale ich selektivita je problematická. Za najselektívnejší sa považuje 7-NI – 7-nitroindazol.

Selektívny inhibítor nNOS **7-nitroindazol (7-NI)** mal u myší a pavíánov protektívny účinok pred neurónovou smrťou indukovanou toxicky a pred zhoršením motorických a kognitívnych funkcií. Inhibícia nNOS v experimente mala tiež protektívny účinok v prípade modelácie ischemického poškodenia po cievnej mozgovej príhode, znižovala vnímanie bolesti po poškodení tkaniva a pod. Mechanizmus účinku 7-nitroindazolu je komplexný. Látka sa viaže na prostetické skupiny enzýmu a následne ovplyvní väzbové miesta pre pteridín a L-arginín.

Z hľadiska chemickej štruktúry patria k selektívnym inhibítorm nNOS:

- indolové deriváty,
- chinolóny, tetrahydrochinolóny,
- benzimidazoly,
- benzoxazíny,
- benzothiazíny,
- dipeptidy nitroarginínu.

Selektívne ***inhibitory eNOS*** v súčasnosti neexistujú. Oxid dusnatý vytváraný endotelovou NO syntázou je kľúčovou signálnou molekulou cievnej homeostázy, vrátane regulácie cievneho tonusu a krvného tlaku. Okrem toho má antiaterogénnu funkciu, protizápalové, antitrombotické a antiproliferatívne účinky. Inhibícia syntézy NO v endoteli by viedla k endotelovej dysfunkcii, ktorá je predispozíciou vzniku viacerých kardiovaskulárnych ochorení. Preto je snahou vyvíjať skôr selektívne inhibitory iNOS a nNOS bez ovplyvnenia eNOS.

Na základe doterajších výsledkov môžeme povedať, že dosiahnutie selektívnej inhibície konkrétnej NO-syntázy je síce reálnym cieľom a môže mať v budúcnosti liečebnú i komerčnú hodnotu, čo však vyžaduje ešte množstvo experimentálnej i klinickej výskumno-vývojovej práce.

7.5 Antioxidanty

Poslednou skupinou látok, ktoré sú schopné modulovať aktivitu oxidu dusnatého sú antioxidanty. Táto skupina látok ovplyvňuje aktivitu NO len nepriamo, preto nie je našim cieľom detailne sa venovať komplexnému spektru súčasne dostupných antioxidantov. Vyberieme len tie, ktoré boli v súvislosti s NO priamo testované.

Reaktívne formy kyslíka môžu vyvolávať a zhoršovať viaceré ochorenia ako napr. aterosklerózu, onkologické ochorenia, pulmonálnu dysfunkciu, zápalové ochorenia GITu, degeneratívne ochorenia nervového a pohybového systému, diabetes, šok, traumy, ischemicko-reperfúzne poškodenia, ochorenia urogenitálneho systému a pod. K potenciálnym zdrojom voľných kyslíkových radikálov (superoxid, peroxyinitrit, hydroxylový radikál) patrí okrem iných aj oxid dusnatý a jeho biochemické reakcie. Pri závažných zápalových stavoch dochádza k nadprodukcii NO a následne k vzniku toxických produktov ako výsledkov oxidačného a nitrozačného stresu a ich hromadenie v intra a extracelulárnom priestore. Voľné kyslíkové radikály môžu okrem peroxidácie lipidov inhibovať kľúčové enzýmy dýchacieho cyklu alebo syntézu DNA. Práve preto sa v terapii ochorení spojených s nadprodukciou NO uvažuje aj o použití antioxidačnej terapie. Samotné použitie antioxidantov prináša zatiaľ neuspokojivé výsledky. Je to pravdepodobne spôsobené nesprávnym dávkovaním vzhľadom k antioxidačnej kapacite týchto látok. Taktiež sa predpokladá, že antioxidanty samotné nie sú schopné ovplyvniť patogenézu ochorenia resp. mali by byť používané len ako doplnková terapia.

Podstatou účinku antioxidantov je schopnosť stabilizácie alebo deaktivácie voľných radikálových foriem skôr ako prejavia toxické pôsobenie v organizme. Patria k nim rôzne látky endogénneho i exogénneho pôvodu, ktoré synergicky a interaktívne neutralizujú ROS - vitamíny, antioxidačné enzýmy, fytonutrienty a proteíny viažuce ióny kovov.

7.5.1 Endogénne antioxidanty

Endogénne obranné mechanizmy ľudského organizmu metabolizujú oxidačné toxické medziprodukty voľných kyslíkových radikálov. K svojej optimálnej činnosti obyčajne vyžadujú prítomnosť jedného alebo viacerých kofaktorov ako napr. selén, železo, meď, zinok, mangán a pod. Nedostatočný príjem jedného alebo viacerých z týchto prvkov môže preto ohroziť antioxidačnú aktivitu. Ďalším faktorom, ktorý nepriamo ovplyvňuje aktivitu endogénnych mechanizmov je vek, pričom u starších ľudí je antioxidačná aktivita značne znížená. K endogénnym antioxidantom patrí napr.

bilirubín, tioly (glutatión, cysteín), NADPH a NADH, koenzým Q10, HsP a niektoré enzýmy, napr. superoxiddismutáza, kataláza, glutatión-peroxidáza a pod.

K najznámejším endogénnym antioxidantným systémom nepochybne **koenzým Q10**- (2, 3 dimetoxi-5-6-pervitín decaprenyl benzochinon), ktorý vzniká z mevalonovej kyseliny a fenylalanínu. Jeho účinok spočíva v znížení mitochondriálnej tvorby superoxidového radikálu a znížení peroxidácie lipidov na úrovni plazmatickej membrány.

V experimentálnych podmienkach deaktivoval produkty oxidačného a nitrozačného stresu v biochemických reakciách sprostredkovaných oxidom dusnatým tiež **heat shock proteín**, ktorý môže stimulovať aktivitu endotelovej NO syntázy.

7.5.2 Exogénne antioxidanty

Vitamíny

- **Vitamín A** – patrí medzi retinoidy. K potravinám s jeho vysokým obsahom patria napr. mrkva, tekvica, brokolica. Obsahujú ho tiež vnútornosti, napr. pečeň. Antioxidačné účinky vykazujú hlavne jeho prekursor beta-karotén a lycopén. Beta karotén pôsobí synergicky s vitamínom E.
- **Vitamín C** – kys. L-askorbová je súčasťou citrusových plodov, jahôd či niektorých druhov zeleniny ako napr. brokolice alebo papriky. Je považovaný za najdôležitejší antioxidant, rozpustný vo vode a v extracelulárnej tekutine. Je schopný neutralizovať ROS vo vodnej fáze ešte pred peroxidáciou lipidov. Nadmerné užívanie (viac ako 2g/deň) môže zvýšiť riziko vzniku obličkových oxalátových kameňov.
- **Vitamín E** – je generický názov pre skupinu látok klasifikovaných ako tokoferoly alebo tokotrienoly. Potravinovým zdrojom vitamínu E sú rastlinné oleje, orechy, listová zelenina, avokádo a špargľa. Tento vitamín je silným antioxidantom, ktorý zabraňuje oxidácii LDL a membránových fosfolipidov. Je rozpustný v tukoch, preto je účinný hlavne vnútri bunkovej membrány.

Fytonutrienty – flavonoidy

Flavonoidy sú fenolové zlúčeniny prítomné v rastlinách, ktoré pôsobia ako „modifikátory biologických reakcií“. Ich zdrojom pre človeka je hlavne čerstvé ovocie

(jablká, jahody, hrozno, granátové jablko), zelenina (cibuľa) a nápoje (čaj, kakao, horká čokoláda, červené víno). Zloženie flavonoidov je možné meniť na základe spôsobu prípravy jedla. Flavonoidy majú protizápalové, antialergické, antivírusové a antikarcinogénne účinky, ktoré je možné pripísať ich antioxidačnej aktivite. Ich antioxidačný účinok však bol pozorovaný najmä v súvislosti s kardiovaskulárnymi ochoreniami (zníženie krvného tlaku), kedy flavonoidy stimulovali hlavne eNOS s následným rýchlym uvoľnením oxidu dusnatého z buniek endotelu.

Kurkumín, kys. ferulová a karnozín boli vo vzťahu k oxidu dusnatému testované v experimentálnych podmienkach. Všetky mali silné antioxidačné a protizápalové vlastnosti a znižovali nitrozatívne poškodenie centrálného nervového systému vyvolané nadprodukciou NO.

Účinok **acetyl-L-karnitínu**, ktorý zlepšuje energetický metabolizmus bunky a participuje na reparačných procesoch prebiehajúcich v neurónoch je vo vzťahu k oxidu dusnatému popísaný tiež. Ako doplnková terapia môže byť využiteľný pri ochoreniach nervového systému vrátane Alzheimerovej demencie, sklerózy multiplex, chronického únavového syndrómu, depresie, ischemických poškodení, neuropatií (napr. diabetických), na zlepšenie kognitívnych funkcií a pod.

7.5.3 Proteíny viažuce kovy

Tieto látky sú účinné antioxidanty voči organickým a anorganickým kyslíkovým radikálom. Ich koncentrácia sa mení vplyvom niektorých ochorení alebo gravidity. Patrí sem albumín (meď), ceruloplazmín (meď), metalotioneín (meď), feritín (železo), myoglobín (železo) a transferín (železo).

Kontrolné otázky:

1. Ktoré skupiny farmák ovplyvňujú hladinu oxidu dusnatého v organizme?
2. Ktoré farmaká sa využívajú v klinickej praxi?
3. Aké sú nežiaduce účinky inhalácie NO?
4. Aký je mechanizmus účinku nitrovazodilatátorov?
5. Poznáte niektoré hybridné látky obsahujúce NO? Aký je ich terapeutický význam?
6. Čo viete o aminoguanidíne?
7. Aký je vzťah antioxidačnej terapie k ochoreniam spojeným s poruchou tvorby NO?

ZÁVER

Oxid dusnatý je „univerzálna messengerová molekula“ ktorá je dôležitá vo fyziologických a patofyziologických procesoch ľudského organizmu. Reguluje prietok krvi v rôznych oblastiach ľudského tela, ovplyvňuje imunitný systém a obranyschopnosť, má protinádorové účinky a svoje nezastupiteľné miesto takmer vo všetkých orgánových systémoch. Dysbalancia v homeostáze NO vedie k endotelovej dysfunkcii, hypertenzii, diabetu, neurodegeneratívnym ochoreniam a mnohým ďalším ochoreniam. Základná stratégia modulácie homeostázy NO so zameraním na klinické využitie zahŕňa hlavne kardiovaskulárne indikácie, sexuálnu dysfunkciu, ovplyvnenie respiračného a imunitného systému. Zaujímavá je aj regulácia tvorby NO v terapii nádorových ochorení.

Na základe dostupných informácií je zrejmé, že v budúcnosti sa farmakológia zameria tak na endogénny ako aj na exogénny NO. Nové možnosti podania, od inhalačného, cez transdermálne, perorálne, až po inkorporáciu do polymerických zlúčením predstavujú naozaj široké pole pôsobnosti. Zvýši sa snaha v oblasti výskumu zosilnenia účinku jednotlivých donorov a tiež na selektivite inhibítorov jednotlivých izoform NO syntáz. Nepochybne dôležitou cestou je aj ovplyvnenie druhého posla kaskády NO/GC-S, proteínkináz, fosfodiesteráz a kanálov aktivovaných NO. Nové informácie o patogenéze viacerých ochorení stále viac poukazujú na oxidačný stres. Preto sa bude výskum orientovať nielen na lepšie zadefinovanie enzymatických a bunkových zdrojov oxidantov, ale predovšetkým na vývoji nových antioxidačných liečiv.

Zaujímavou je stále aj možnosť použitia inhalovaného NO, hľadanie menej invazívnych ciest jeho aplikácie (nosové kanyly, CPAP) či pozorovanie jeho extrapulmonálnych účinkov.

Všetky tieto oblasti predstavujú ďalšiu, vzrušujúcu cestu pre budúcnosť výskumu v oblasti farmakológie tejto nesmierne zaujímavej molekuly.

LITERATÚRA

Kapitola 1

Brennan PA, Moncada S. From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer. *Ann R Coll Surg Engl* 2002; 84: 75-78.

Himashree G, Dass D, Banerjee PK, Selvamurthy W. Nitric oxide and the respiratory system. *Curr Sci* 2003; 85(5): 607-614.

Ricciardolo FLM. Multiple role of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58: 175-182.

Kapitola 2

Alderton WK, Cooper CHE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* 1999; 43:521-531.

Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218:40–44.

Carreras MC, Poderoso1 JJ. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: 5, C1569-C1580.

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R1-R12.

Gertz K, Endres M. NOS And Stroke: Prevention, Treatment And Recovery. *Future Neurology* 2008;3(5):537-550.

Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 418: 291-296.

Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *TIPS* 2005; 26(4): 190-195.

Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M, Nudler E. Endogenous Nitric Oxide Protects Bacteria Against a Wide Spectrum of Antibiotics. *Science* 2009; 325 (5946): 1380–4.

Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 469-87.

- Harrison DG.** Perspective series: Nitric oxide and nitric oxide synthases. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997; 100(9): 2153-2157.
- Huang PL, Lo EH.** Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals. *Prog Brain Res* 1998; 118: 13-25.
- Chandran S, Sridhar N, Veeranjanyulu A.** Nitric oxide: concepts, current perspectives and future therapeutic implications. *Indian J Pharmacol* 1998; 30: 351-366.
- Christopherson KS, Bredt DS.** Perspective series: nitric oxide and nitric oxide synthases. Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997; 100(10): 2424-2429.
- Knowles RG, Moncada S.** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.
- Koivisto A, Matthias A, Bronnkov G, Nedergaard J.** Kinetics of the inhibition of mitochondrial respiration by NO. *FEBS Lett* 1997; 417:75–80.
- Kone BC.** Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol* 1999; 19(3): 230-241.
- Lacza, Snipes JA, Yhang J, Horvath EM, Figueroa JP, Szabo C, Busija DW.** Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 1217-1228.
- Lisdero CL, Carreras MC, Meulemans A, Melani M, Aubier M, Boczkowski J, Poderoso JJ.** The mitochondrial interplay of ubiquinol and nitric oxide in endotoxemia. *Methods Enzymol* 2004; 382:67–81.
- Lopez LC, Escames G, Tapias V, Utrilla P, León J, Acuna-Castroviejo D.** Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38:267–278.
- Marletta MA.** Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* (Cambridge, Mass).1994; 78: 927-930.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2): 109-142.
- Moncada S.** Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* 1999; 92(4): 164-169.
- Mori M.** Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr* 2007;137(6 Suppl 2):1616S-1620S.
- Morris SM.** Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol* 2009;157(6):922-30.

- Nathan C.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6: 3051-3064.
- Nijkamp FP, Folkerts G.** Nitric oxide: initiator and modulator. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 347-350.
- Pechkovsky DV, Zissel G, Goldmann T, Einhaus M, Taube C, Magnussen H, Schlaak M, Muller-Quernheim J.** Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AECII. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L684-L692.
- Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G.** Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Res* 2004; 84: 731-765.
- Riobo N, Melani M, Sanjuan N, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ.** The modulation of mitochondrial nitric oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem* 2002; 277:42447–42455.
- Sherman MP, Aeberhard EE, Wong VZ, Griscavage JM, Ignarro LJ.** Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 1301-1308.
- Schmidt HH, Murad F.** Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1372-1377.
- Singh S, Evans TW.** Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J* 1997; 10: 699-707.
- Strapkova A, Antořová M.** Competition of NO synthases and arginase in the airway hyperreactivity. *Gen Phys Biophys* 2011; 30 (1): 75-83.
- Taylor DA, McGrath JL, Orr LM, Barnes PJ, O'Connor BJ.** Effect of endogenous nitric oxide inhibition on airway responsiveness to histamine and adenosine-5'-monophosphate in asthma. *Thorax* 1998; 53: 483-489.
- Titheradge MA.** Nitric oxide in septic shock. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1411(2-3): 437-455.
- Vallance P.** Nitric oxide. *Biologist* 2001; 48: 153-158.
- Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE, Yin Y.** Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009;37(1):153-68.
- Wu G, Morris SM.** Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; 336: 1–17.
- Weitzberg E.** L-arginine transport and sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49: 434-436.

Xue C, Botkin SJ, Johns RA. Localization of endothelial NOS at the basal microtubule membrane in ciliated epithelium of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 463-471.

Kapitola 3

Habib S., AliInd A. Biochemistry of Nitric Oxide. *J Clin Biochem* 2011; 26(1):3–17.

Chandran S, Sridhar N, Veeranjanyulu A. Nitric oxide: concepts, current perspectives and future therapeutic implications. *Indian J Pharmacol* 1998; 30: 351-366.

Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53(4): 503-514.

Jerca L, Jerca O, Mancas G, Constantinescu I, Lupurosu R. Mechanism of action and biochemical effect of nitric oxide (NO•). *The Journal of Preventive Medicine* 2002; 10 (2): 35-45.

Pagliaro P. Differential effect of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sciences* 2003; 73: 2137-2149.

Vallance P. Nitric oxide. *Biologist* 2001; 48: 153-158.

Kapitola 4

Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199–1206.

Butler AR, Flitney FW, Williams DLH. NO, nitrosium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *TIPS* 1995; 16: 18-22.

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000; 184: 409-420.

Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 2010; 62(3):525-63.

Garcia-Calvo M, Knaus HG, McManus OB, Giangiacam KM, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 1994; 269: 676.

Habib S., AliInd A. Biochemistry of Nitric Oxide. *J Clin Biochem* 2011; 26(1):3–17.

Hamad ASM, Clayton A, Islam B, Knox AJ. Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L973-L983.

Chandran S, Sridhar N, Veeranjanyulu A. Nitric oxide: concepts, current perspectives and future therapeutic implications. *Indian J Pharmacol* 1998; 30: 351-366.

Charles A. Nitric oxide pumps up calcium signalling. *Nature Cell Biol* 1999; 1(8): E193-E195.

Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53(4): 503-514.

Kažič T, Gojkovič-Bukarica L. Ion channels and drug development focus on potassium channels and their modulators. *Facta Universitatis Med Biol* 1999; 6(1): 23-30.

Morgan L. Nitric oxide: a challenge to chiropractic. *J Can Chiropr Assoc* 2000; 44(1): 40-48.

Mokry J. Mechanizmy kontrakcie a relaxácie hladkej svaloviny dýchacích ciest. *Stud Pneu Phtiseol* 2006; 66 (6): 258-270

Nijkamp FP, Folkerts G. Nitric oxide: initiator and modulator. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 347-350.

Schwingshackl A, Moqbel R, Duszyk M. Nitric oxide activates ATP-dependent K⁺ channels in human eosinophils. *J Leukoc Biol* 2002, 71:807-81.

Vallance P. Nitric oxide. *Biologist* 2001; 48: 153-158.

Wink DA, Vodovotz Y, Cook JA, Krishna MC, Kim S, Coffin D, DeGraff W, Deluca AM, Liebmann J, Mitchell JB. The Role of Nitric Oxide Chemistry in Cancer Treatment. *Biochemistry* 1998; 63:7, 802-9.

Kapitola 5

Adler KB, Fischer BM, Li H, Choe NH, Wright DT. Hypersecretion of mucin is response to inflammatory mediators by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro is blocked by inhibition of nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 526-530.

Aikio, O. Pulmonary nitric oxide in preterm and term infants with respiratory failure. *Acta Universitatis Ouluensis. Medica.* 2002; 15s.

Azuma H, Obayashi S, Hamasaki H. Koyama T, Aso T. Role of endothelium in human uterine arteries during normal menstrual cycle. *Br. J. Pharmacol* 1995; 114: 902–908.

Baylis CH. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *AJP - Renal Physiol* 2008; 294 (1): F1-F9.

Bogdan Ch. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2001; 2, 907 – 916.

Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic noncholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345:346-347.

Calabrese V, Mancuso C, Calvani C, Rizzarelli E, Butterfield D, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 2007;10:766-75.

Careau E, Sirois J, Bissonnette EY. Characterization of lung hyperresponsiveness, inflammation, and alveolar macrophage mediator production in allergy resistant and susceptible rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 579-586.

Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, deVente J, Koesling D, Holstein AF. Nitric oxide /cGMP pathway components in the Leydig cells of the human testis. *Cell Tissue* 1997; 287: 161–170.

Dijkstra G, van Goor H, Jansen PL, Moshage H. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Investig Drugs*, 2004;5(5):529-36.

Dweik RA. The promise and reality of nitric oxide in the diagnosis and treatment of lung disease. *Cleveland Clin J Med* 2001; 68(6): 486-490.

Ghasemi A, Zahediasl S. Is Nitric Oxide a Hormone? *Iranian Biomedical Journal* 2011; 15 (3): 59-65.

Haluzík M. Inhibitory NO-syntázy a funkce endokinních žláz. *Čs Fyziol.* 1997; 46: 176-181.

Hintze TH. Prologue: Nitric oxide – hormones, metabolism, and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H2253-H2255.

Hollenberg NK. Organ Systems Dependent on Nitric Oxide and the Potential for Nitric Oxide-Targeted Therapies in Related Diseases. *J Clin Hypertens* 2006; 12(4):63-73.

Chandran S, Sridhar N, Veeranjanyulu A. Nitric oxide: concepts, current perspectives and future therapeutic implications. *Indian J Pharmacol* 1998; 30: 351-366.

Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282:1075-1079.

Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53(4): 503-514.

Jaing Y, Singh AK, Kannan MS, Johnson DE, Shew RL. Isolation of nitric oxide synthase in the rat uterus. *Life Sci* 1996; 58: 1009–1014.

Jerca L, Jerca O, Mancas G, Constantinescu I, Lupusoru R. Mechanism of action and biochemical effects of nitric oxide (NO•) . *The Journal of Preventive Medicine* 2002; 10 (2): 35-45.

Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278:C451-C462.

Karpuzoglu E, Ahmed SA. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide* 2006; 15(3):177-86.

Kizawa Y, Ohuchi A, Saito K, Kusama T, Murakami H. Effects of endothelin-1 and nitric oxide on proliferation of cultured guinea-pigs bronchial smooth muscle cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001; 128: 495-501.

Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric Oxide in Health and Disease of the Nervous System. *Antioxidants & redox signaling* 2009; 11(3): 541-54

Lincová D, Farghalli H a spol. Základní a aplikovaná farmakologie. Galén, Praha, 2002, 601s.

Magness RR Shaw CE, Pherretton TM, Zheng J, Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *Am J Physiol* 1997; 272(4):H1730-1740.

Mokrá D., Mokřý J. Meconium aspiration syndrome: from pathomechanisms to treatment. New York: Nova Biomedical Books 2010; pp 130.

Morgan L. Nitric oxide: a challenge to chiropractic. *J Can Chiropr Assoc* 2000; 44(1): 40-48.

Nagaki M, Shimura MN, Irokawa T, Sasaki T, Shirato K. Nitric oxide regulation of glycoconjugate secretion from feline and human airways in vitro. *Respir Physiol* 1995; 102: 89-95.

Parker TA, le Crass TD, Kinsella JP, Abman SH. Developmental changes in endothelial nitric oxide synthase expression and activity in bovine fetal lung. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2000; 78: L202-L208.

Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedquist P. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol Scand* 1990; 140: 449-457.

Ricciardolo FLM. Multiple role of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58: 175-182.

Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Res* 2004; 84: 731-765.

Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ. Effect of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod* 1995; 10: 1786–1790.

Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update* 1998; 4 (1), 3–24.

Russo A, Fraser R, Adachi K, Horowitz M, Boeckxstaens G. Evidence that nitric oxide mechanisms regulate small intestinal motility in humans. *Gut* 1999; 44:72-76.

Sharma SP. Nitric oxide and the kidney, *Indian J Nephrol* 2004;14: 77-84.

Schaad NC, Zhang XQ, Campana A, Schroderte-Slatkine S. Human seminal plasma inhibits brain nitric oxide synthase activity. *Hum Reprod* 1996; 11: 561–565.

Silverman B. Design of Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors for the Prevention and Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Acc Chem Res* 2009; 42(3):439-51.

Stamler JS, Meissner G. Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. *Phys Rew* 2001; 81 (1): 209-237.

Stanek A, Gadowska-Cicha A, Gawron K, Wielkoszynski T, Adamek B, Gieslar G, Wiczowski A, Sieron A. Role of Nitric Oxide in Physiology and Pathology of the Gastrointestinal Tract. *Mini Rew in Medic Chem* 2008; 8: 1549-1560.

Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology*. 1992; 103:1928-1949.

Strapkova A, Nosáľová G. Oxid dusnatý a dýchačý systém. *Stud Pneum Phtiseol* 2004; 64 (4); 195-201.

Strijdom H, Chamane N, Lochner A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr* 2009;20(5):303-10.

Sugino N, Takiguchi S, Ono M, Tamura H, Shimamura K, Nakamura Y, Tsuruta R, Sadamitsu D, Ueda T, Maekawa T, Kato H. Nitric oxide concentration in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Hum Reprod* 1996; 11: 2484–2487.

Vallance P. Nitric oxide. *Biologist* 2001; 48: 153-158.

van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease? *Respir Res* 2000; 1: 67-72.

Wimalawansa SJ. Nitric oxide and Bone. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1192: 391-403.

Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE, Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009; 37(1):153-68.

Wu G, Meininger CJ. Nitric oxide and vascular insulin resistance. *Biofactors* 2009 Jan-Feb;35(1):21-7.

Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests

a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod* 1996; 55: 935–941

Kapitola 6

Benčová A, Rozborilová E, Antošová M. News in exhaled nitric oxide measurement in clinical practice (subective review), *Acta Med Martin* 2009; 9 (1). 3-11.

Bryan NS, Grisham MB. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(5): 645–657.

Dercho RA, Nakatsu K, Wong RJ, Stevenson DK, Vreman HJ. Determination of in vivo carbon monoxide production in laboratory animals via exhaled air. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006, 54(3):288-295.

Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and human. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 852-857.

Hogg N. Detection of Nitric Oxide by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(2): 122–129.

Hyde RW, Geigel EJ, Olszowska AJ, Krasmeu JA, Forster RE, Utell MJ, Frampton MW. Determination of production of nitric oxide by lower airways of humans: theory. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1290-1296.

Kenyon NJ, van der Vliet A, Schock BC, Okamoto T, McGrew GM, Last JA. Susceptibility to ozone-induced acute lung injury in iNOS-deficient mice. *American journal of physiology* 2002, 282(3):L540-5.

Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* 1995; 8: 295-297.

Li CHZ, Alwarappan S, Zhang W, Scafa N, Zhang X. Metallo Protoporphyrin Functionalized Microelectrodes for Electrocatalytic Sensing of Nitric Oxide. *Am J Biomed Sci* 2009; 1(3): 274–282.

Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R431-R444.

Weicker S, Karachi TA, Scott JA, McCormack DG, Mehta S. Noninvasive measurement of exhaled nitric oxide in a spontaneously breathing mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163(5):1113-1116.

Zhang X. Real time and *in vivo* monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors-from dream to reality. *Frontiers in Bioscience* 2004; 9, 3434-3446.

Kapitola 7

Creagh-Brown BC, Griffiths MJ, Evans TW. Bench-to-bedside review: Inhaled nitric oxide therapy in adults. *Crit Care* 2009;13(3):221.

DiBlasi RM, Myers TR, Hess DR. Evidence-based clinical practice guideline: inhaled nitric oxide for neonates with acute hypoxic respiratory failure. *Respir Care* 2010; 55(12):1717-45.

Garcin ED, Arvai AS, Rosenfeld RJ, Kroeger MD, Crane BR, Andersson G, Andrews G, Hamley PJ, Mallinder PR, Nicholls DJ, St-Gallay SA, Tinker AC, Gensmantel NP, Mete A, Cheshire DR, Connolly S, Stuehr DJ, Aberg A, Wallace AV, Tainer JA, Getzoff ED. Anchored plasticity opens doors for selective inhibitor design in nitric oxide synthase. *Nat Chem Biol* 2008;4(11):700-7.

Hollenberg SM, Cinel I. Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness--update 2008. *Crit Care* 2009;13(4):218.

Chandran S, Sridhar N, Veeranjanyulu A. Nitric oxide: concepts, current perspectives and future therapeutic implications. *Indian J Pharmacol* 1998; 30: 351-366.

Joubert J, Malan SF. Novel nitric oxide synthase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2011, 21(4): 537-560

Kizhakekuttu TJ, Widlansky ME. Natural Antioxidants and Hypertension: Promise and Challenges. *Cardiovasc Ther* 2010; 28(4): e20–e32.

Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002; 105(20): 2398-2403

Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol.* 2007;151(3):305-21.

Mason RP, Cockcroft JR. Targeting Nitric Oxide With Drug Therapy. *J Clin Hypertens* 2006;4(8/12):40–52.

Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995;9(13):1319-30.

Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rew* 1997; 49(2): 137-142.

Morley D, Keefer LK. Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22(7): S3-S9.

Muscará MN, Wallace JL. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am J Physiol* 1999;276(6 Pt 1):G1313-6.

- Munzel T, Wenzel P, Daiber A.** Do We Still Need Organic Nitrates? *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1296-1298.
- Persival M.** Antioxidants. *Clin Nutri. Insign* 1998; 10:1-4.
- Porta NF, Steinhorn RH.** Inhaled NO in the experimental setting. *Early Hum Dev* 2008 84(11):717-23..
- Regoli D.** Pharmacology of Nitric Oxide: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Curr Pharmaceutic Design*, 2004; 10, 1667-1676.
- Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G.** Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Res* 2004; 84: 731-765.
- Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalzanaraman B.** Mechanism of Nitric Oxide release from S/nitrosothiols. *J of Biol Chem* 1996; 271:18596-18603.
- Southan GJ, Szabo C.** Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 383–394.
- Strapková A, Antořová M, Nosáľová G.** Relation of L-arginine to airway hyperreactivity. *Gen Phys Biophys* 2008; 27 (2): 85-91.
- Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK.** Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *J of Biomed and Biotech* 2004; 4:227–237.
- Vallance P.** Nitric oxide. *Biologist* 2001; 48: 153-158.
- Wimalawansa SJ.** Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9(11):1935-54.