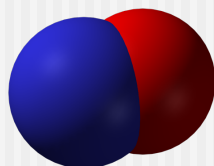


## Oxid dusnatý



vaclav.hampl@lf2.cuni.cz

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



1

## Proč je NO zajímavé?

- Malá anorg. molekula, velký biol. význam
- Účast na funkci všech hl. orgánových systémů
- 2 tváře: signalizace x toxicita
- Během pár let od základního objevu k fundamentálním pokrokům klinické praxe
- >30 vědeckých článků denně



4

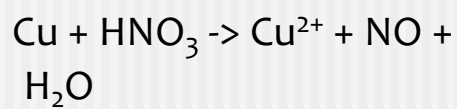
## Z historie: 1620

První příprava NO:



Jan Baptista van Helmont

(Vlám, 1577-1644)



(t.j. dříve než třeba kyslík - 1774)

5

## 1772

Chemická charakterizace:

Joseph Priestley

(objevitel kyslíku)



6

## 1800

Toxicita:

Sir Humphry Davy

(málem umřel, když se toho nadýchal)

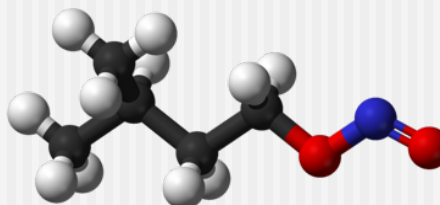


7

## 1867

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

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



8



9

1977

NO aktivuje guanylát cyklázu a tak zvyšuje intracelulární koncentraci cGMP:

Ferid Murad



10

1980

---

Endoteliální relaxační faktor (EDRF):

Robert Furchgott



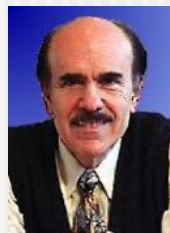
11

1987

---

Eukaryotické buňky umí tvořit NO:

Louis Ignarro, Salvador Moncada



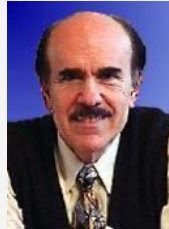
12



1998

### Nobelova cena za fyziologii a lékařství

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



13



14

## Chemie NO

- NO je plyn (bezbarvý)  
(kapalný při  $-152^{\circ}\text{C}$ , tuhne při  $-164^{\circ}\text{C}$ )
- NO je radikál
  - ☐ tj. lichý počet valenčních elektronů
  - ☐ má jich 11 ( $\text{N}_2$  má 10;  $\text{O}_2$  má 12)
- Z  $\text{N}_2$  a  $\text{O}_2$  vzniká jen za zvláštních podmínek (např. blesk)
- Taky spalovací motory, elektrárny

15

## Rozpustnost NO

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

16

## Samovolný rozpad NO

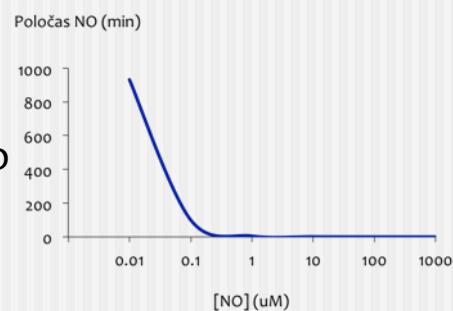
- Pouze za vysokého tlaku
- Pozvolna vzniká toxický oxid dusičitý (NO<sub>2</sub>)  
(pozor na skladování v bombách!)

17

## Oxidace NO

- V přítomnosti O<sub>2</sub>:  

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



18



## Oxidace NO

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

19

## Fyziologická role $\text{NO}_2^-$

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

20

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

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

21

## Reakce NO se superoxidem

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

22

## Inaktivace NO hemoglobinem

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

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

23

## S-nitrosylace proteinů

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

24

## Měření NO

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

25

## Měření NO



26

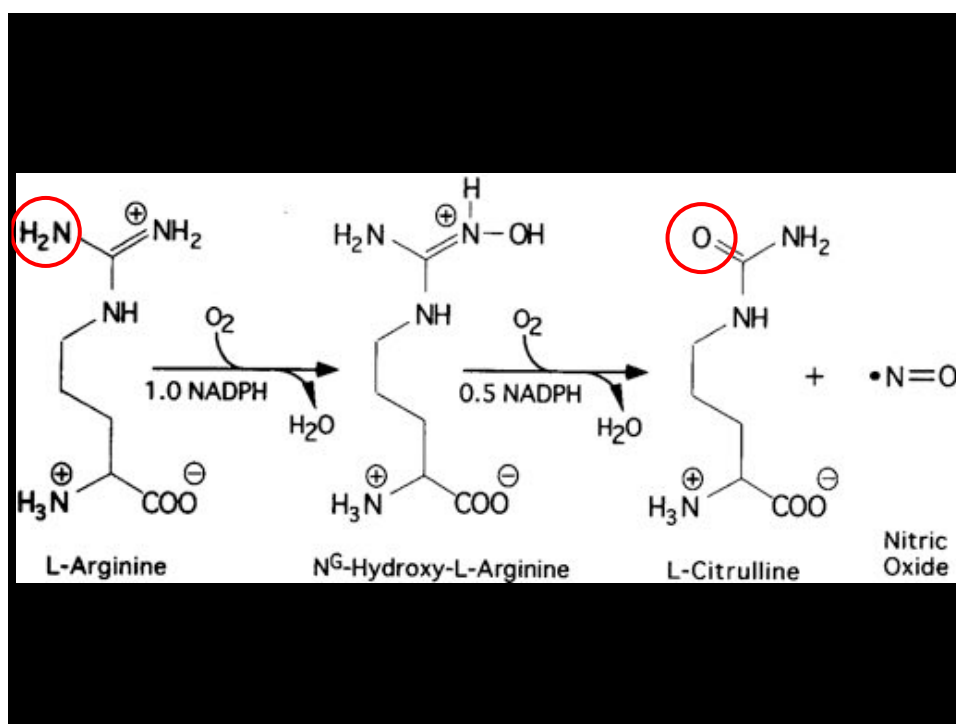
## Biosyntéza NO

- 5-elektronová oxidace terminálního guanidino dusíku L-argininu molekulárním kyslíkem:



- Stereospecifická
- Celou reakci katalyzuje jediný enzym, **NO syntáza** (NOS, EC 1.14.13.39)

27



28

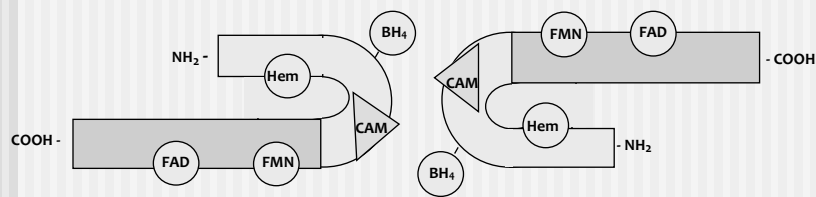
## NO syntázy

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

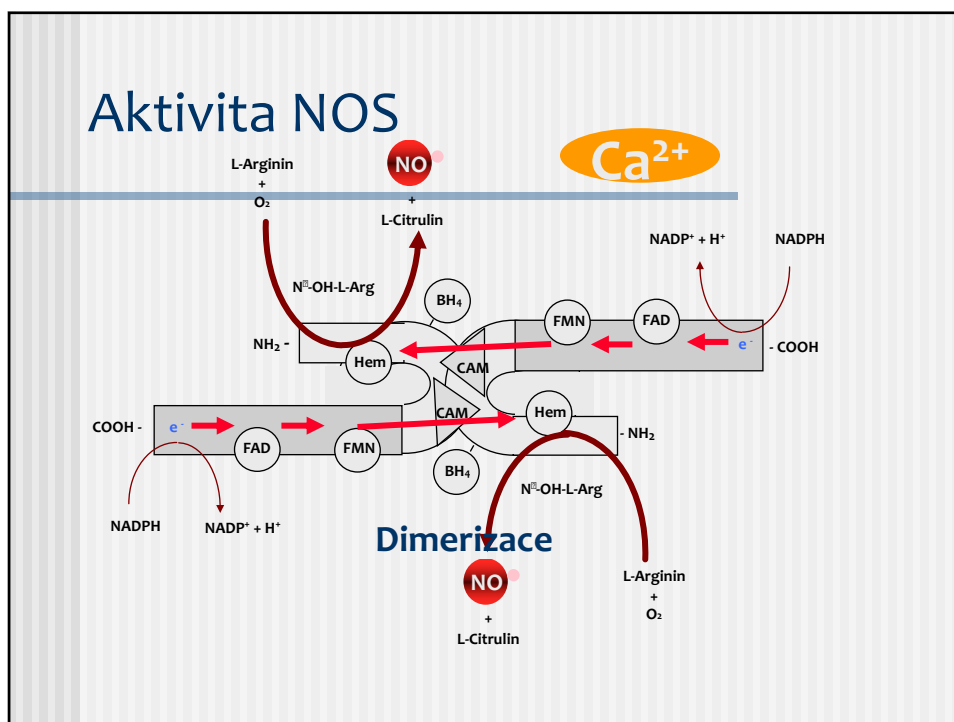


29

## Aktivita NOS



30

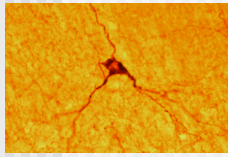


31

## Rozpřažení (uncoupling) NOS

- Rozpřažení dimeru eNOS (např. při  $\downarrow BH_4$ , třeba při stresu)  $\rightarrow$  spotřeba NADPH a redukce  $O_2$  odpojena od tvorby NO  
 $\rightarrow \downarrow$  tvorby NO,  $\uparrow$  tvorby  $O_2^-$ 
  - jeden z hlavních mechanismů endoteliální dysfunkce
- Vitamin C recykluje radikál  $BH_3$  (vzniklý např. působením  $ONOO^-$ ) zpět na  $BH_4$ , navíc brání oxidaci  $BH_4 \rightarrow$  působí proti rozpřažení NOS

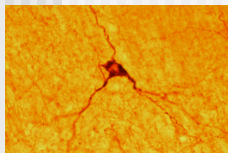
32



## NOS I

- **nNOS** (neuronální)
- ~160 kDa
- Gen na lidském chromosomu 12
- Vyžaduje  $\text{Ca}^{2+}$   
(nutné pro vazbu kalmodulinu)
- Rozpuštěná v cytosolu

33

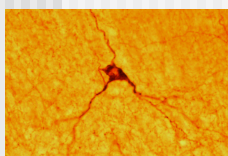


## NOS I

- Konstitutivně exprimována:
  - centrální a periferní neurony
  - některý epitel, cévní hladký sval
  - kosterní sval
- Regulace aktivity:
  - $\text{Ca}^{2+}$
  - ser/tyr fosforylace
  - NO (zpětnovazební inhibice)

34



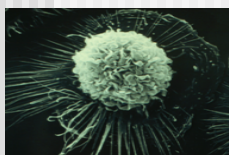


## NOS I

Hlavní uplatnění:

- neurotransmise
- neuromodulace

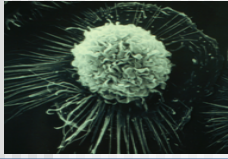
35



## NOS II

- **iNOS** (inducibilní)
- ~130 kDa
- Gen na lidském chromosomu 17
- Nepotřebuje  $\text{Ca}^{2+}$   
(váže kalmodulin trvale i bez  $\text{Ca}^{2+}$ )
- Rozpuštěná v cytosolu

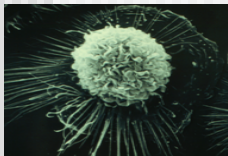
36



## NOS II

- Exprese je inducibilní (cytokiny...):
  - makrofágy
  - glie, hepatocyty
  - endotel, epitel
  - srdeční myocyty, hladký sval,...
- Regulace aktivity:
  - indukce exprese
  - NO (zpětnovazební inhibice)

37

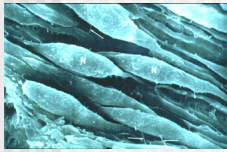


## NOS II

### Hlavní uplatnění:

- boj s infekcí
- zabíjení nádorových buněk

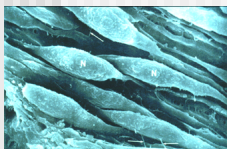
38



## NOS III

- **eNOS** (endoteliální)
- ~133 kDa
- Gen na lidském chromosomu 7
- Vyžaduje  $\text{Ca}^{2+}$   
(nutné pro vazbu kalmodulinu)
- Vázaná na buněčnou membránu (kaveoly)

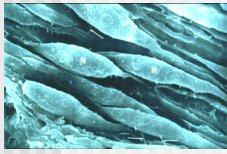
39



## NOS III

- Konstitutivně exprimována:
  - endotel
  - plicní a renální epitel; trombocyty
  - srdeční myocyty
  - hipokampus
- Regulace aktivity:
  - $\text{Ca}^{2+}$
  - ser/tyr fosforylace
  - modulace exprese
  - inhibice S-nitrosylací (thiolové skupiny cysteinů)

40



## NOS III

### Hlavní uplatnění:

- regulace cévního tonu
- regulace krevního zásobení orgánů

41

## Účinky NO na cílovou tkáň

### 1. Cytotoxicita:

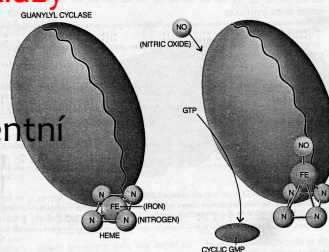
- při vysoké koncentraci (iNOS)
- poškození bílkovin, DNA, lipidů
- oxidace ( $O_2$ ,  $O_2^-$ )
  - > reaktivní, toxické produkty ( $NO_2$ ,  $ONOO^-$ )
- inhibice respirace
- boj s infekcí a tumory

43

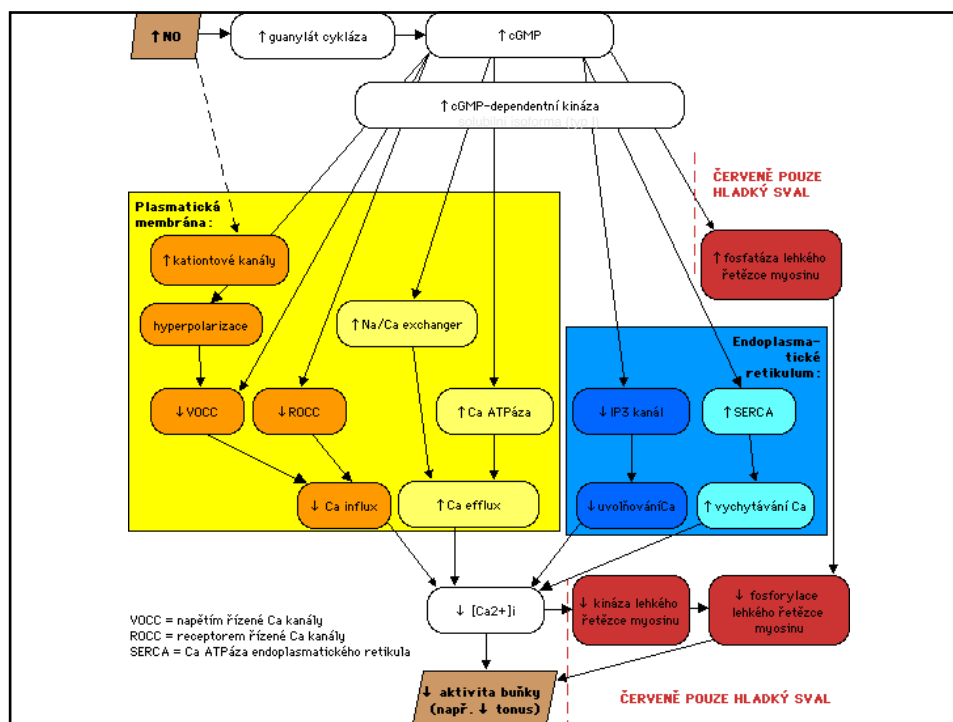
## Účinky NO na cílovou tkáň

### 2. Prostřednictvím cGMP:

- Při nižších koncentracích (eNOS, nNOS)  
Oxidace jen pomalá
- Převládá vazba NO na hem solubilní isoformy **guanylátcyklázy**
- ↑ cyklický guanosin-3',5' monofosfát (**cGMP**)
- cGMP aktivuje cGMP-dependentní protein kinázu (**G-kinázu**)

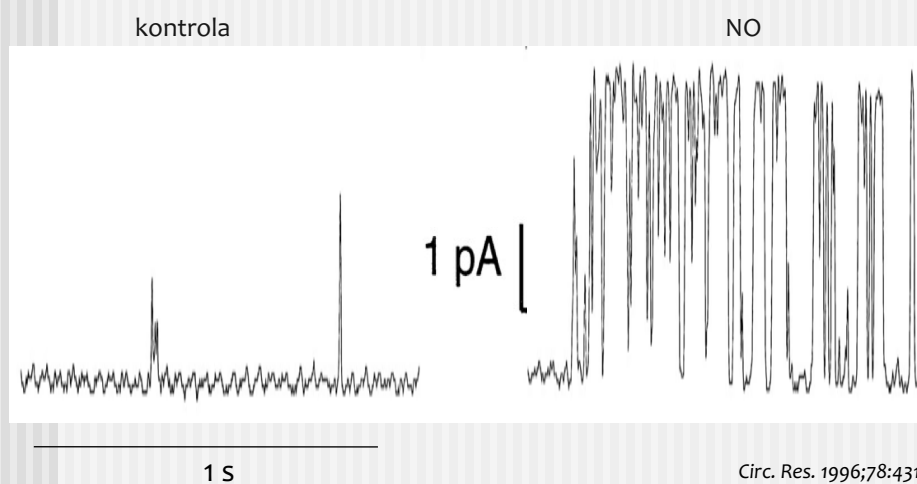
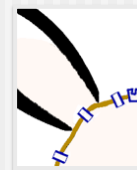


44



45

## NO aktivuje $K_{Ca}$ kanály



46

## Další osud cGMP

Inaktivace cGMP:

Fosfodiesterázy cyklických nukleotidů

- zejména typ V.
- vzniká 5'-GMP

47

## Farmakologie NO

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

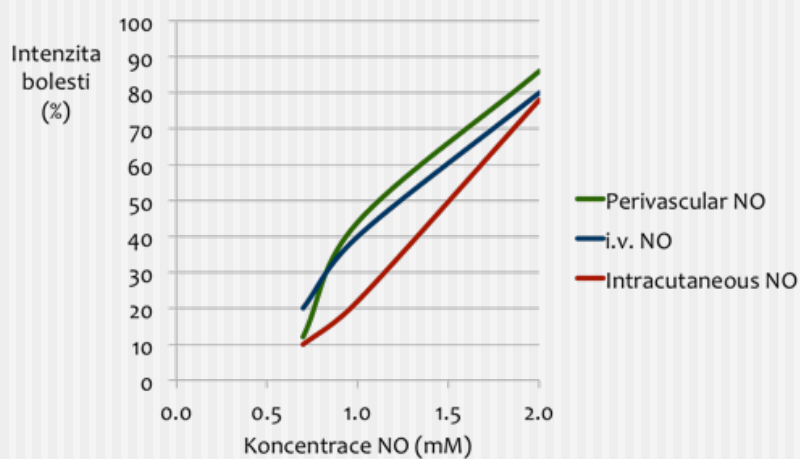
48

## Funkce NO: Neurotransmise

- Difusní modulace
- NANC
- Retrográdní messenger  
(zpětné potvrzení příjmu zprávy)
- Dlouhodobá potenciace  
presynaptická buňka přístě vyšle silnější signál -  
podklad paměti  
NO z neuronů v hipokampu tam stimuluje  
glutamátové NMDA receptory
- Bdění, učení, paměť, spánek, bolest, deprese

49

## NO = mediátor periferní nocicepce



Holthusen & Arndt: J Physiol 1995

50

## NO není jediný plynný mediátor

### ■ Další gasotransmittery:

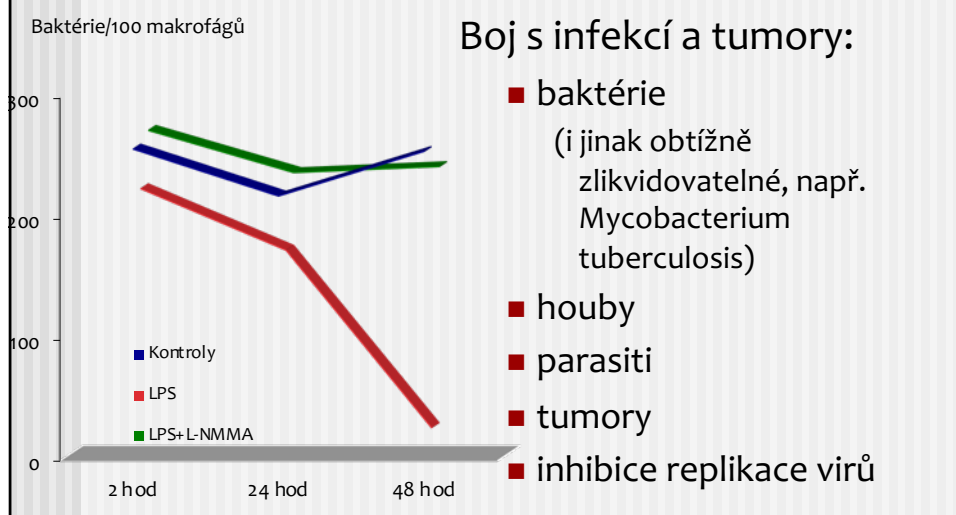
■ H<sub>2</sub>S

■ CO

51



## Funkce NO: Cytotoxicita

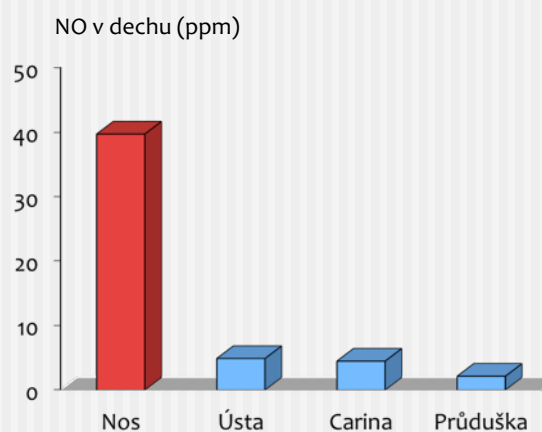


52

## NO v dechu

Nejvíce NOS je v nose a paranasálních dutinách

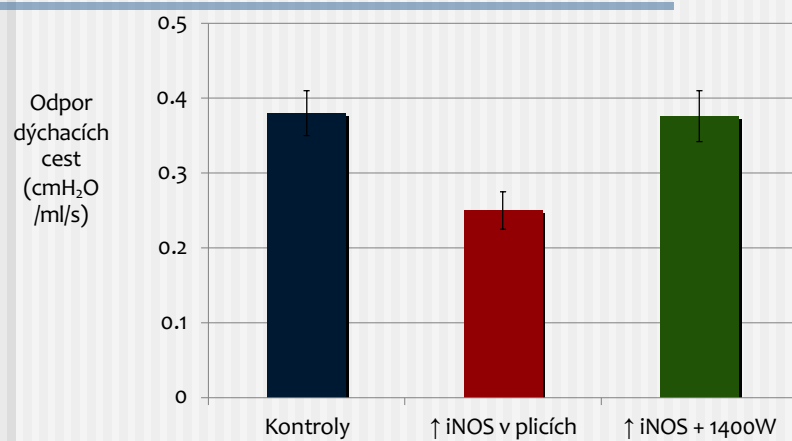
- Dezinfekce ?
- Bronchodilatace
- Regulace plicních cév ?
- Mění se při některých nemocech (astma)



Dillon et al, Chest 1996

53

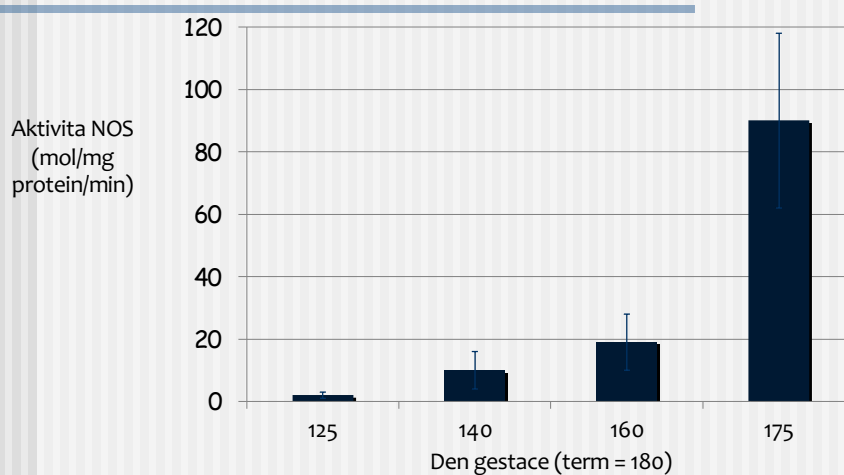
## NO v dých. cestách snižuje jejich odpor



Hjoberg et al: J Appl Physiol 2004

54

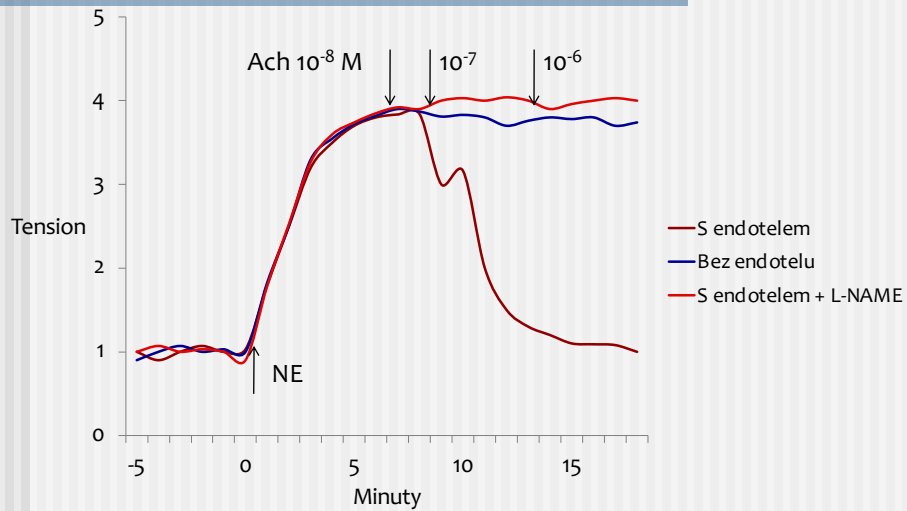
## NO v dých. cestách roste před narozením



Shaul: Am J Physiol Lung 2002

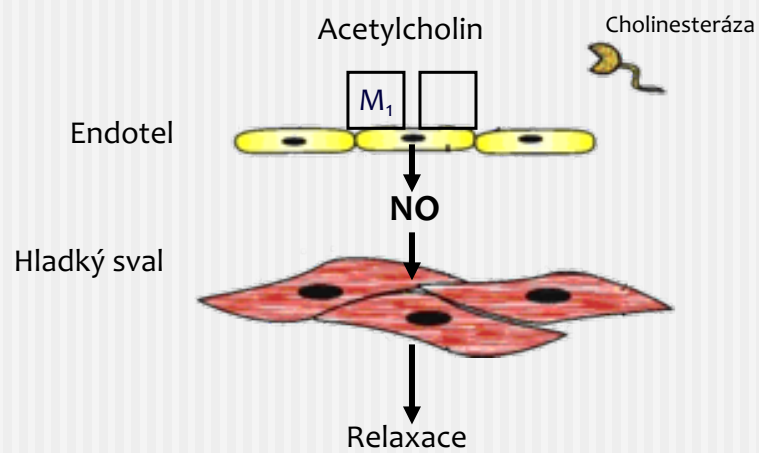
55

## Vazodilatace závislá na endotelu



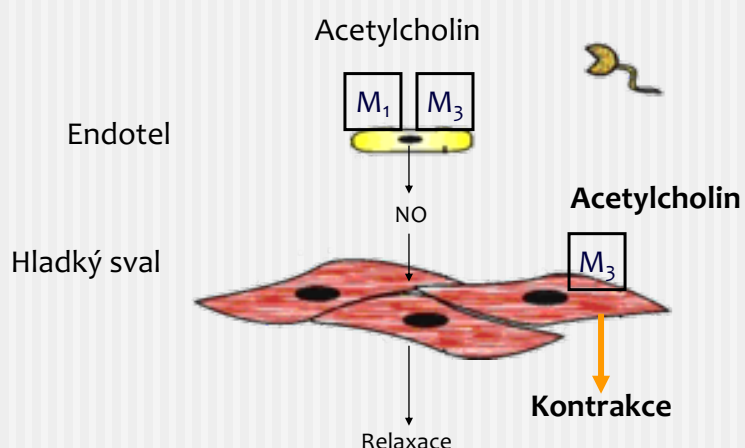
58

## Vazodilatace závislá na endotelu



59

## Vazodilatace závislá na endotelu



60

## Vazodilatace závislá na endotelu

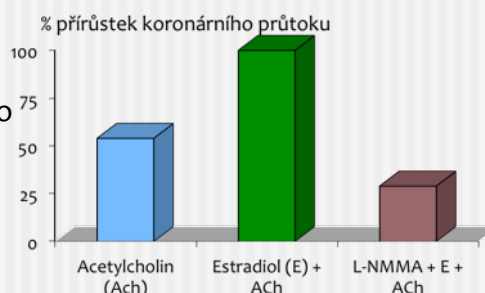
Potencují ji:

### ■ estrogeny

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

### ■ insulin

- ↑ nabídka glukózy tkáním díky ↑ prokrvení



61

## Funkce NO: regulace cév

### Průtokem indukovaná vazodilatace:

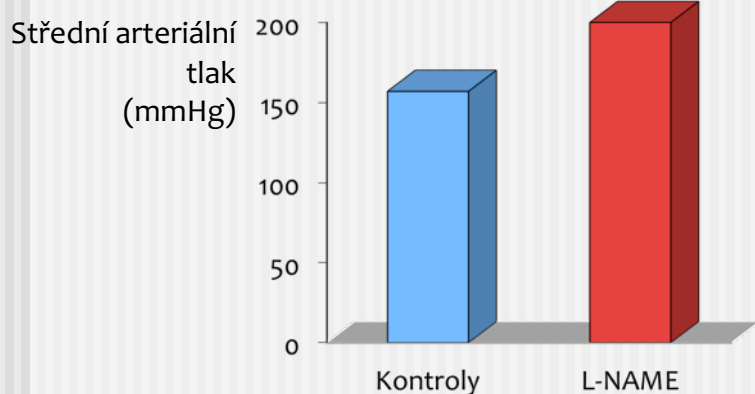
vazodilatace v periferních orgánech

- > ↑ rychlost proudu krve v proximálnějších cévách
- > ↑ střížné napětí (shear stress)
- > ↑ aktivita (a exprese) eNOS
- > vazodilatace proximálnějších cév

NO je v tomto nenahraditelný  
(porucha vede k hypertenzi)

62

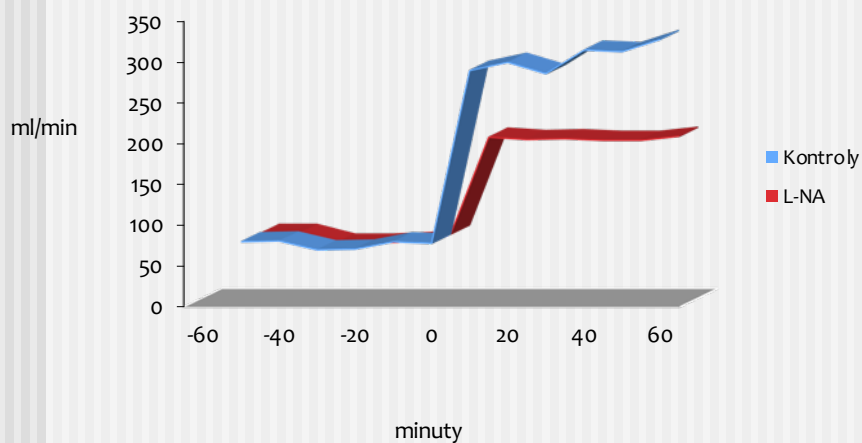
## „Tonická“ tvorba NO



Isaacson: J Appl Physiol 1993

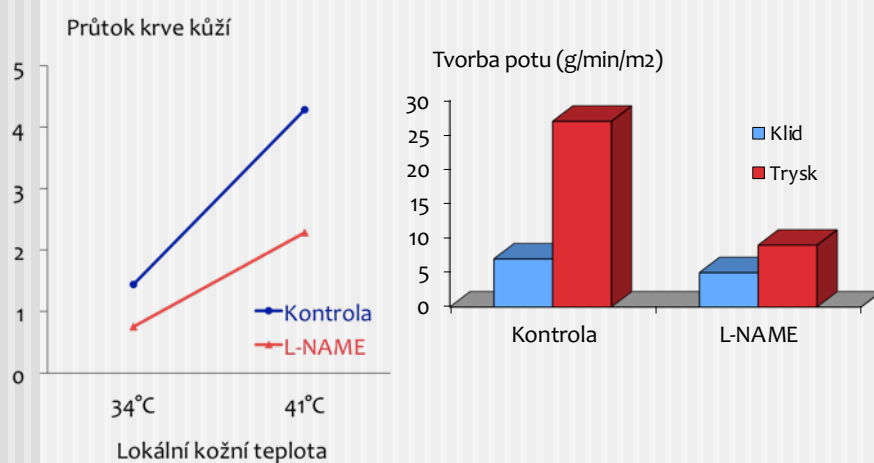
63

## Průtok krve plícemi při narození



65

## NO a termoregulace

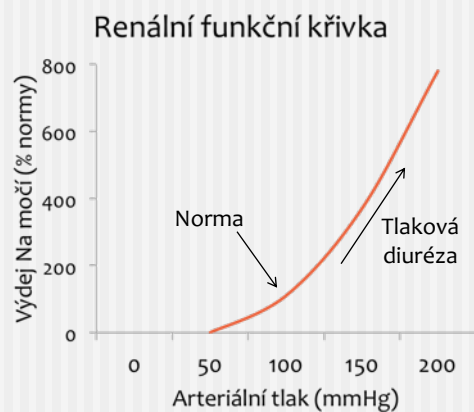


66

## NO v ledvinách

Zprostředkuje tlakovou diurézu:

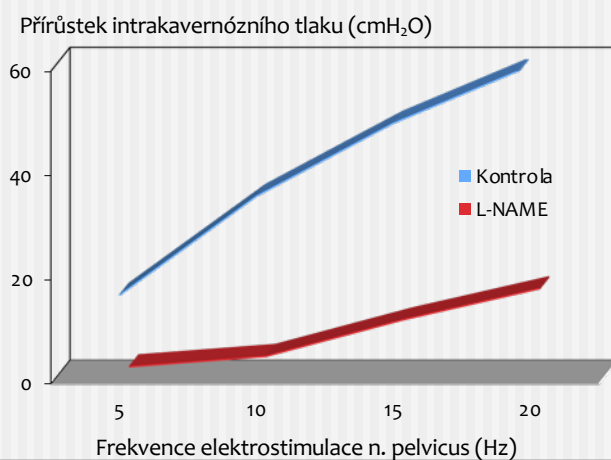
- ↑ arteriální tlak
  - mechanické namáhání endotelu
  - ↑ syntéza NO
  - difuze k distálním tubulům
  - ↓ reabsorbce  $\text{Na}^+$



67

## NO a erekce

NO z terminál n. pelvici relaxuje kavernózní hladký sval



68

## NO a fertilizace



Vstup spermie do vajíčka aktivuje NOS v jeho akrosomu

→ ↑NO ve vajíčku, to je esenciální pro další kroky:

- zablokování vstupu dalších spermií
- orientace pro jader pro fúzi

70

## Funkce NO

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

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

72



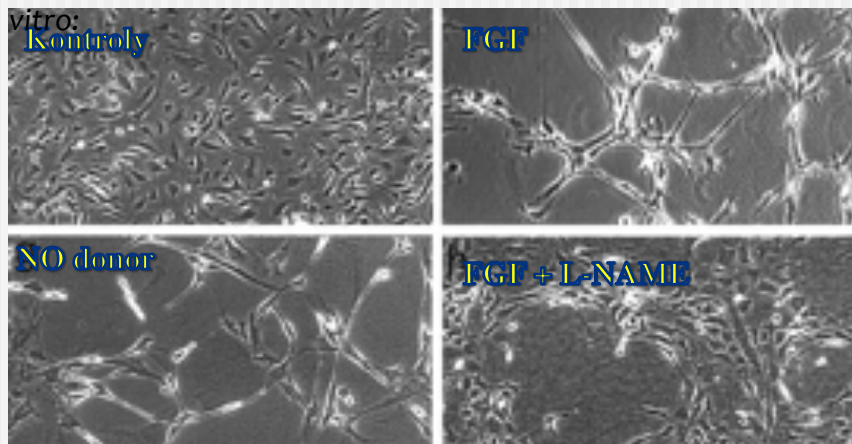
## NO inhibuje apoptózu

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

73

## NO podporuje angiogenesi

Endoteliální buňky *in vitro*:

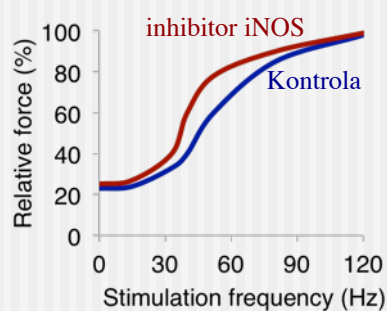


Saeid Babaei et al: Circ. Res. 1998

75

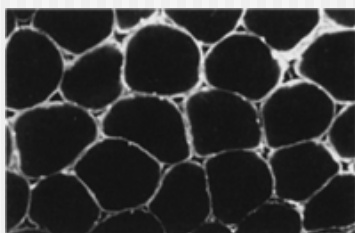
## NO v kosterním svalu

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

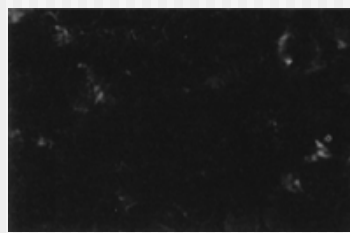


78

## Absence nNOS v sarkolemě svalu u Duchennovy muskulární dystrofie



zdraví



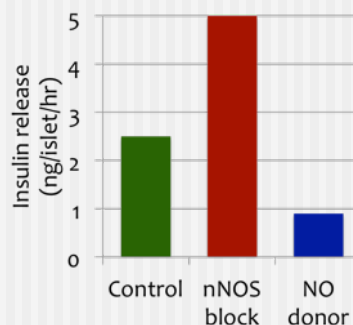
nemocní

Stamler & Meissne: *Physiol Rev* 2001

79

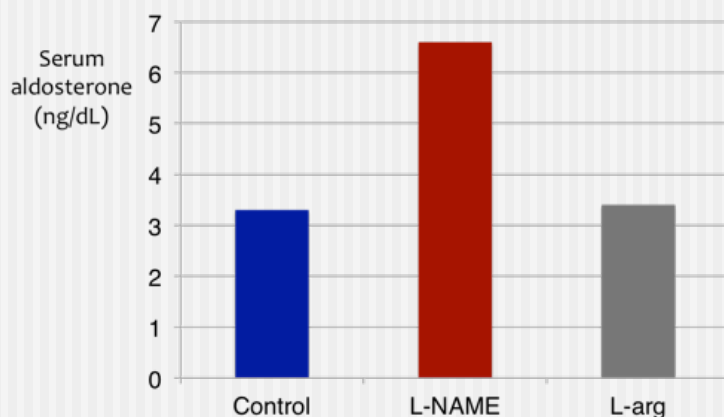
## NO a sekrece insulinu

- glukóza stimuluje nNOS v ostrůvcích
- tento NO inhibuje glukózou-stimulované uvolňování insulinu (negativí zpětná vazba)
- ↑aktivita NOS navozená hyperglykemií může přispívat k narušení glukózou stimulovaného uvolňování insulinu u diabetu 2. typu



80

## NO inhibuje steroidogenesi



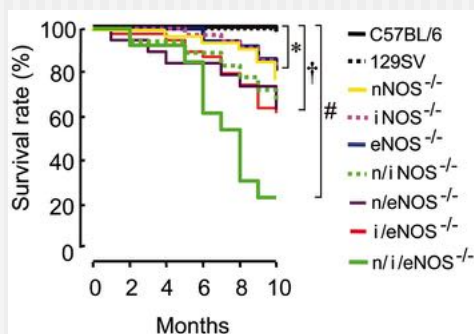
Muldowney et al, 2004

81

## NO a dlouhověkost

NOS<sup>-/-</sup> myši:

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



83

## Další funkce NO

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

84

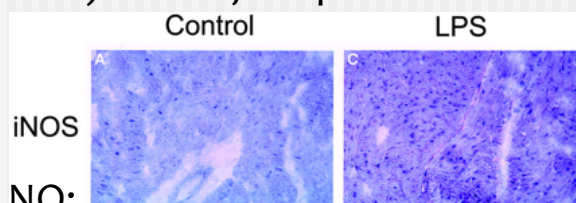
## Patofysiologie NO

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

85

## Septický šok

- Infekce (endotoxin) indukuje expresi iNOS



- Vysoká tvorba NO:
  - likvidace infekce
  - ale i vazodilatace → masivní hypotenze
  - indukce iNOS i v myokardu → ↓ kontraktilita

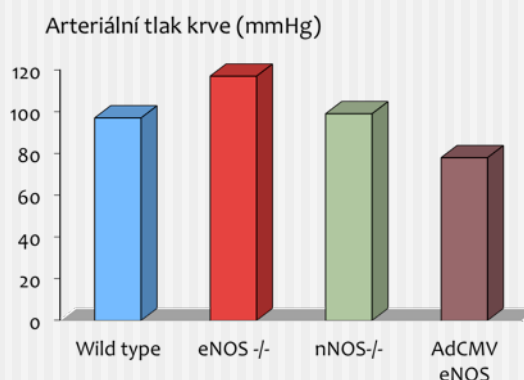
86

## NO a hypertenze

- $\downarrow$  eNOS  $\rightarrow$  hypertenze

Ale:

- syntéza NO  
nebývá při  
hypertenzi  $\downarrow$   
(někdy je  $\uparrow$ )



88

## NO a hypertenze

- NO v mozku inhibuje sympatickou aktivitu
  - lokální inhibice NOS v mozku  
 $\rightarrow \uparrow$  systémový tlak krve

(aktivace sympatiku se kriticky podílí na vzniku hypertenze)

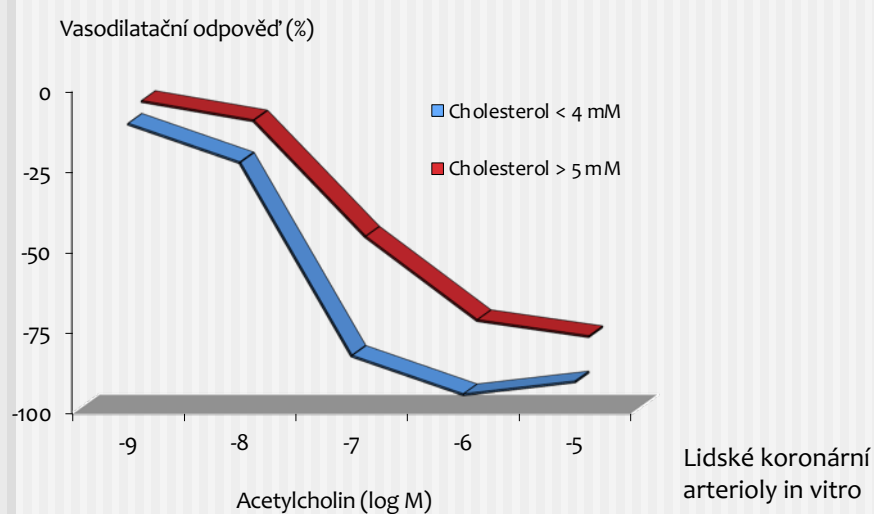
89

## NO a hypertenze: $\Sigma$

- Dysfunkce NO není prvotní příčinou hypertenze
- Poškození endotelu vysokým tlakem ovšem může sekundárně narušit tvorbu NO
- To pak hypertenzi dále zhoršuje

90

## NO při hypercholesterolémii



91

## NO a atheroskleróza

Atherosklerotický plát

→ endoteliální dysfunkce

→ ↓ tvorba NO

→ paradoxní vazokonstrikce

(např. koronární cévy při námaze - angina pectoris)

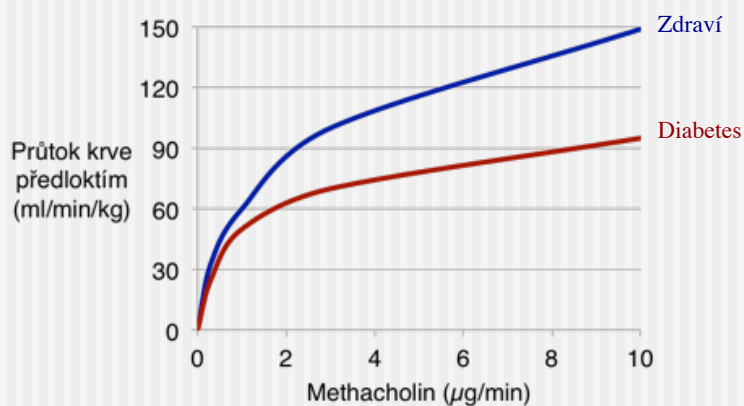
→ ↓ ochrana proti tvorbě trombů

→ např. až infarkt

92

## NO a diabetes

■ porucha NO-dependentní vazodilatace



*Circulation 88: 2510, 1993*

93



## Patologie CNS

(např. ictus , roztroušená sklerosa,...)

- zánětlivá aktivace glie
- indukce iNOS
- NO inhibuje respiraci neuronů
- uvolnění glutamátu
- excitotoxická smrt

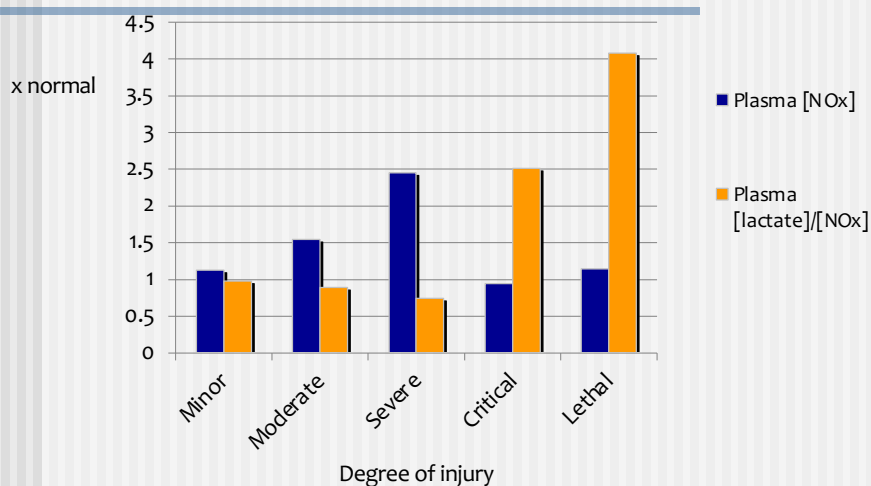
94

## NO v diagnostice

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

95

## NOx v plasmě při polytraumatech



Beitl et al: Nitric oxide as an indicator for severity of injury in polytrauma, 2016

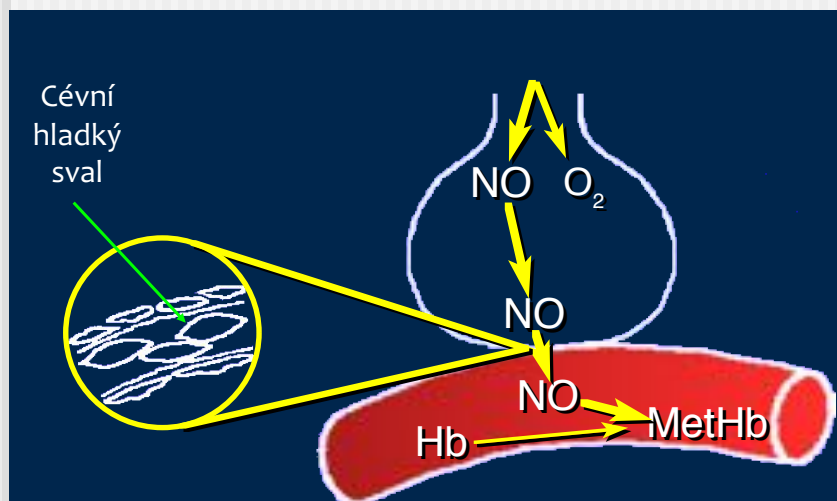
96

## NO v terapii

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

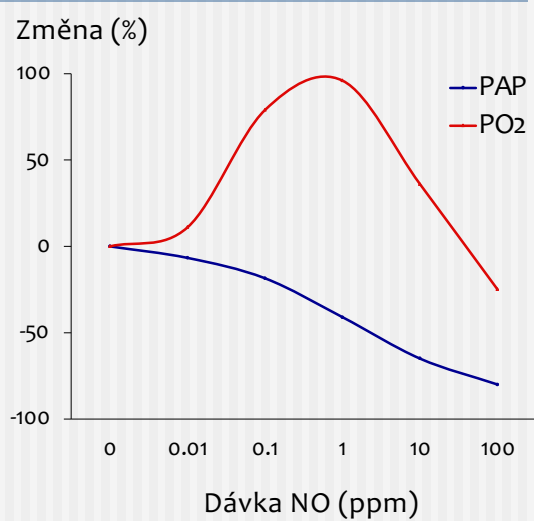
97

## Selektivita inhalovaného NO pro plicní cirkulaci



98

## Inhalace NO při ARDS



99

## Inhalace NO při PPHN

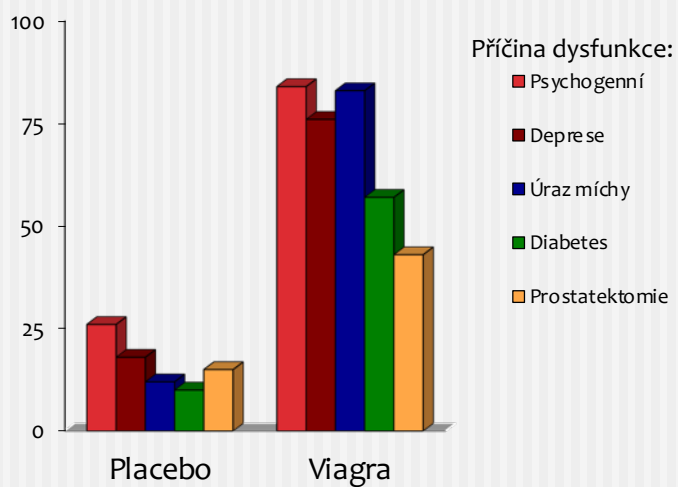


100

## Sildenafil

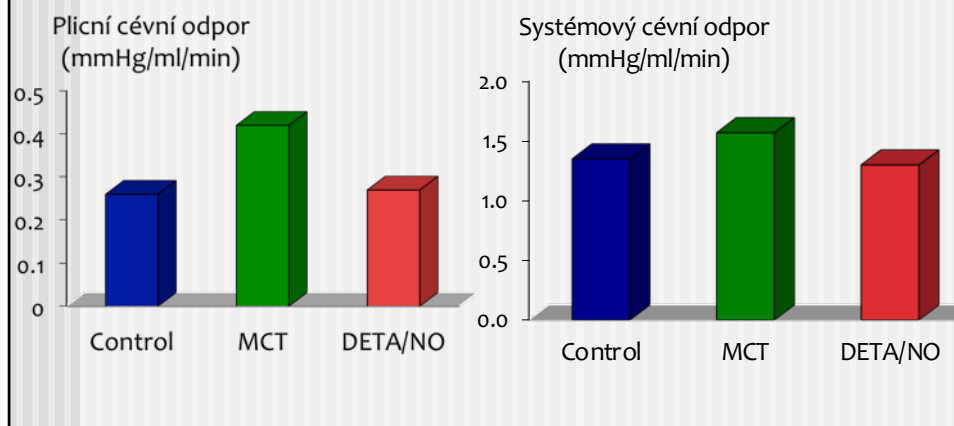


Pacienti se  
zlepšením  
erekce  
(%)



101

## NOáty v terapii plicní hypertenze



102



107