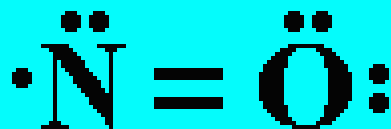


Oxid dusnatý

Antonín Lojek

Kromě mnoha literárních pramenů byla k přípravě použita také přednáška Dr. Hampla – FN Motol.
(http://physiology.lf2.cuni.cz/hAMPL/teach_slides/no_slides/index.htm)

Oxid dusnatý (= nitric oxide = NO)



NO je molekulou složenou z 1 atomu kyslíku a 1 atomu dusíku

Tyto atomy jsou vázány dvojnou vazbou

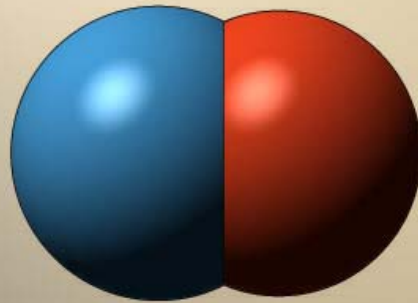
Na atomu kyslíku se nacházejí 2 páry elektronů (nevazebných)

Na atomu dusíku se nachází 1 pár nevazebných elektronů a jeden elektron nepárový

Molecular formula NO

Structural formula N=O

Molecular models



Space filling



Ball-and-stick

NITRIC OXIDE

Nitric oxide (NO), a colorless gas that turns brown when it contacts air, is a known pollutant and component of cigarette smoke and automobile exhaust. But in the body, NO is a chemical messenger with a role in the relaxation of smooth muscle cells.

Atmospheric Nitrogen Oxides



Oxid dusnatý

- ještě před pár lety pouze nepříjemné a nebezpečné znečištění ovzduší přispívající ke smogu a kyselým dešťům, dnes nejstudovanější endogenní molekula posledních 20 let
- explozivní rozvoj znalostí (cca 300 nových publikací měsíčně)
- nové téma, ve starších učebnicích chybí
- "Molekula roku" 1992 prestižního vědeckého časopisu Science
- účastní se funkce všech hlavních orgánových systémů
- během několika let postup od základního objevu k významným klinickým pokrokům (PPHN, ARDS, šok, impotence)

Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn

<http://www.persistent-pulmonary-hypertension-newborn.com/>

Persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) occurs when a newborn's circulation system does not adapt to breathing outside the womb. While a fetus is in the womb, it gets its oxygen from its mother's placenta through the umbilical cords, so the lungs need little blood supply. In PPHN the newborn's arteries to the lungs remain constricted after delivery, limiting the amount of blood flow to the lungs and therefore the amount of oxygen into the bloodstream.

Acute respiratory distress syndrome

http://en.wikipedia.org/wiki/Acute_respiratory_distress_syndrome

Acute respiratory distress syndrome (ARDS), also known as **respiratory distress syndrome (RDS)** or **adult respiratory distress syndrome** (in contrast with IRDS) is a serious reaction to various forms of injuries to the lung.

ARDS is a severe lung disease caused by a variety of direct and indirect issues. It is characterized by inflammation of the lung parenchyma leading to impaired gas exchange with concomitant systemic release of inflammatory mediators causing inflammation, hypoxemia and frequently resulting in multiple organ failure. This condition is often lethal, usually requiring mechanical ventilation and admission to an intensive care unit.

HISTORIE

- 1620 - NO prvně připraven Belgičanem Janem Baptistou van Helmontem (t.j. dříve než třeba kyslík - 1774)
- 1772 - chemicky charakterizován Josephem Priestleyem (objevitel kyslíku)
- 1800 - toxicita (Sir Humphry Davy se málem zahubil, když to zkoušel dýchat)
- 1867 - amylnitrit snižuje krevní tlak při hypertenzi (dnes víme, že to dělá tím, že uvolňuje NO)
- 1914-1918 - dělníci plnící za první světové války nitroglycerin do dělostřeleckých granátů měli velmi nízký krevní tlak, což vedlo k zavedení nitroglycerinových tablet pro úlevu při angině pectoris;
dnes víme, že účinek amylnitritu i nitroglycerinu je zprostředkován oxidem dusnatým uvolňovaným z těchto látek

1977 - NO aktivuje guanylát cyklázu a tak zvyšuje intracelulární koncentraci cGMP (Ferid Murad)

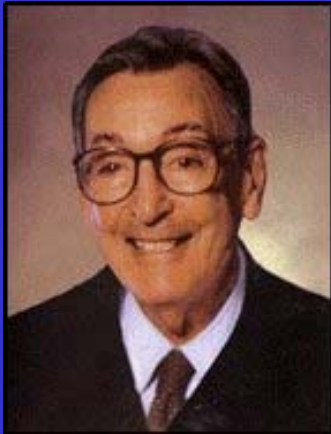
1980 - objev endoteliálního relaxačního faktoru (EDRF, Robert Furchgott). Snaha identifikovat EDRF vedla bezprostředně k objevu, že EDRF = NO

1987 - schopnost eukaryotických buněk tvořit NO: Louis Ignarro, Salvador Moncada

1998 - Nobelova cena za fyziologii a lékařství:
Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad
("za klíčové objevy týkající se NO jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému")

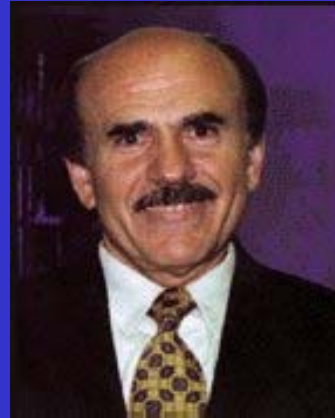
(Moncada cenu nedostal, přestože to mnozí čekali)

(Alfred Nobel vydělal na Nobelovy ceny tím, že vynalezl dynamit, založený na nitroglycerinu, sám trpěl ICHS, předepsali mu nitroglycerin, Nobel to považoval za ironické)



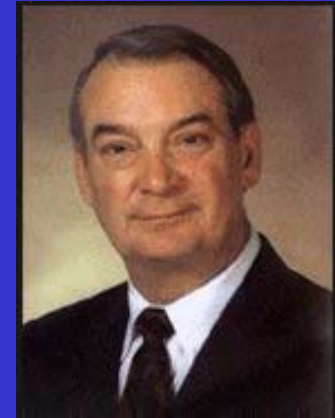
Robert F Furchgott
1916

Dept. of Pharmacology,
SUNY Health Science Center
New York



Louis J Ignarro,
1941

Dept. of Molecular and Medical
Pharmacology
UCLA School of Medicine
Los Angeles



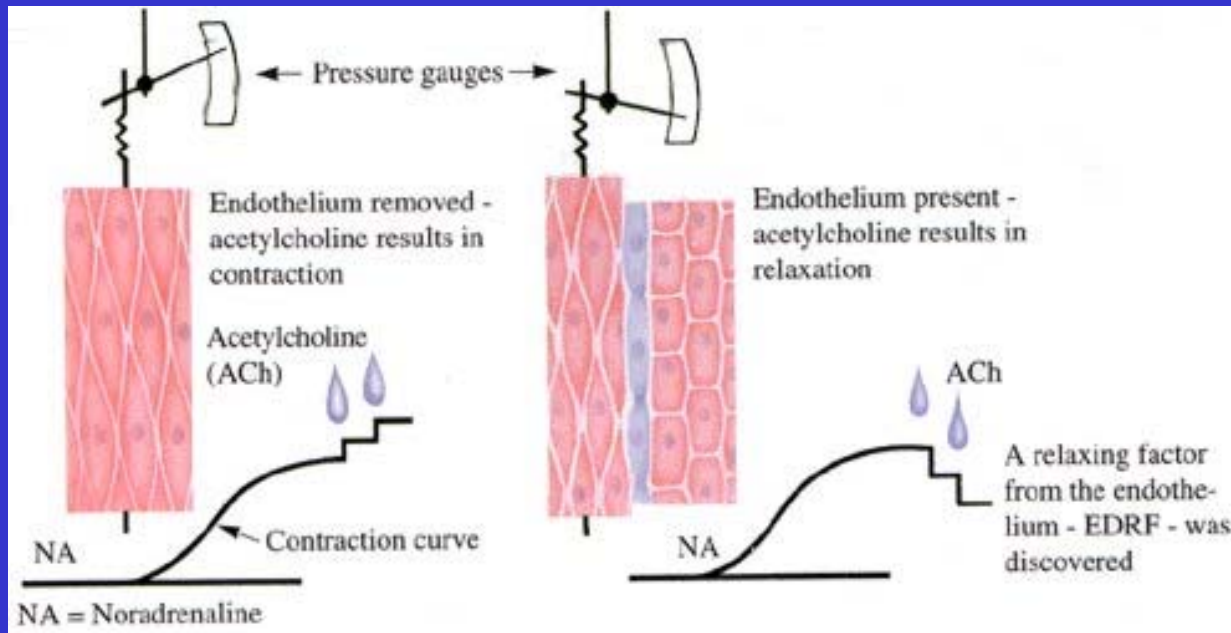
Ferid Murad
1936

Dept. of Integrative Biology
Pharmacology and Physiology
University of Texas Medical
School, Houston

Furchgottův sandwich

Furchgott prokázal, že relaxace cév indukovaná acetylcholinem je závislá na endoteliu.

Použil dva kousky aorty, u jednoho odstranil epitelium



[Acetylcholine \(http://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholine\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholine)

Acetylcholine has functions both in the peripheral nervous system (PNS) and in the central nervous system (CNS) as a neuromodulator.

In the PNS, acetylcholine activates muscles, and is a major neurotransmitter in the autonomic nervous system.

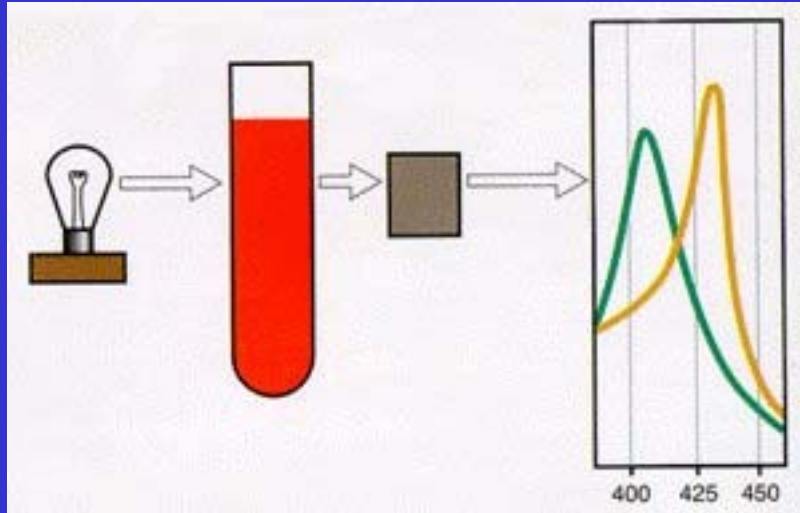
In the CNS, acetylcholine and the associated neurons form a neurotransmitter system, the cholinergic system, which tends to cause excitatory actions.

In PNS

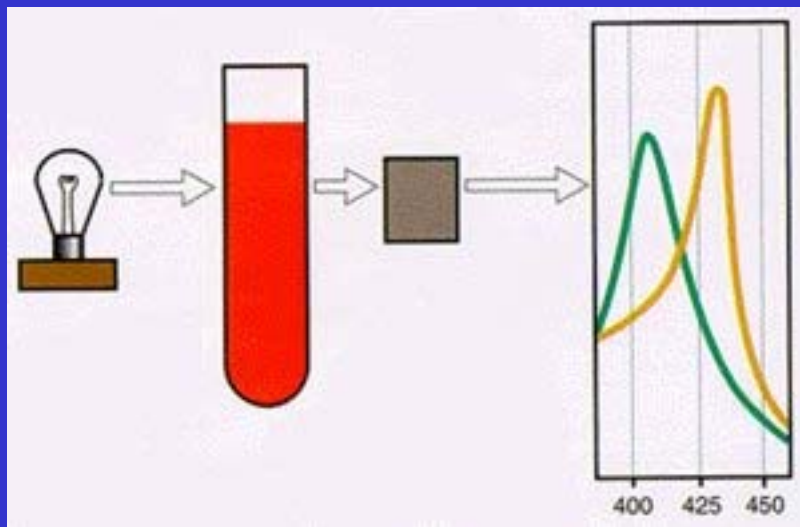
In the peripheral nervous system, acetylcholine activates muscles, and is a major neurotransmitter in the autonomic nervous system. . When acetylcholine binds to acetylcholine receptors on skeletal muscle fibers, it opens ligand gated sodium channels in the cell membrane. Sodium ions then enter the muscle cell, stimulating muscle contraction. Acetylcholine, while inducing contraction of skeletal muscles, instead induces decreased contraction in cardiac muscle fibers. This distinction is attributed to differences in receptor structure between skeletal and cardiac fibers.

Ignarrova spektrální analýza

Ignarro pomocí spektrální analýzy prokázal, že EDRF je totožný s NO.



Hemoglobin (žlutý) exponovaný
endoteliálním buňkám produkujícím
EDRF
(konverze oxyhemoglobinu na
methemoglobin)



Hemoglobin (žlutý) exponovaný přímo
NO
Posun v absorbní křívce je identický
(EDRF = NO)

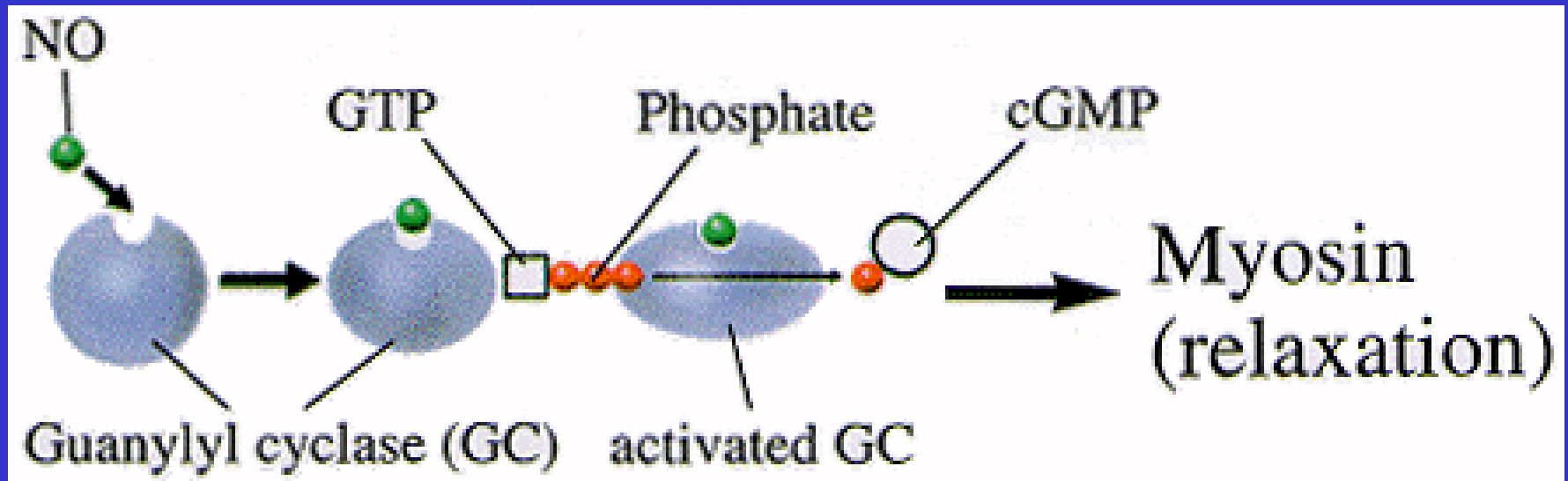
Muradova enzymatická aktivace

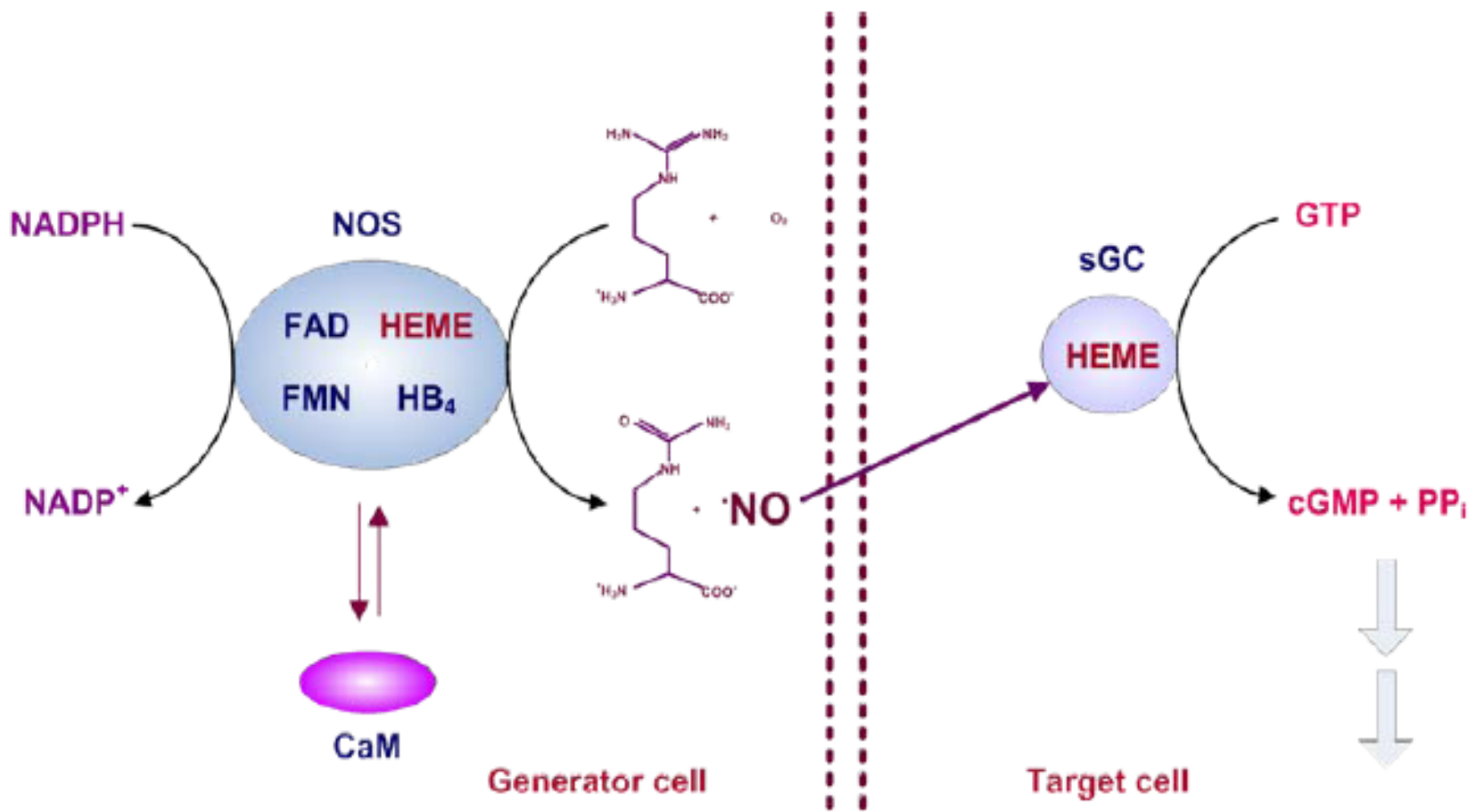
Murad věděl, že nitroglycerin působí relaxaci hladké svaloviny.

Enzym guanylát cyklasa byla aktivována a indukovala zvýšení cGMP s následnou relaxací svalu.

Působí nitroglycerin cestou uvolňování NO ???

Probublával NO přes tkáň obsahující enzym – cGMP se zvyšoval.





NO avidly binds to the heme moiety of hemoglobin (in red blood cells) and the heme moiety of the enzyme **guanylyl cyclase**

This enzyme catalyzes the dephosphorylation of GTP to **cGMP**, which serves as a second messenger for many important cellular functions, particularly for signalling smooth muscle relaxation.

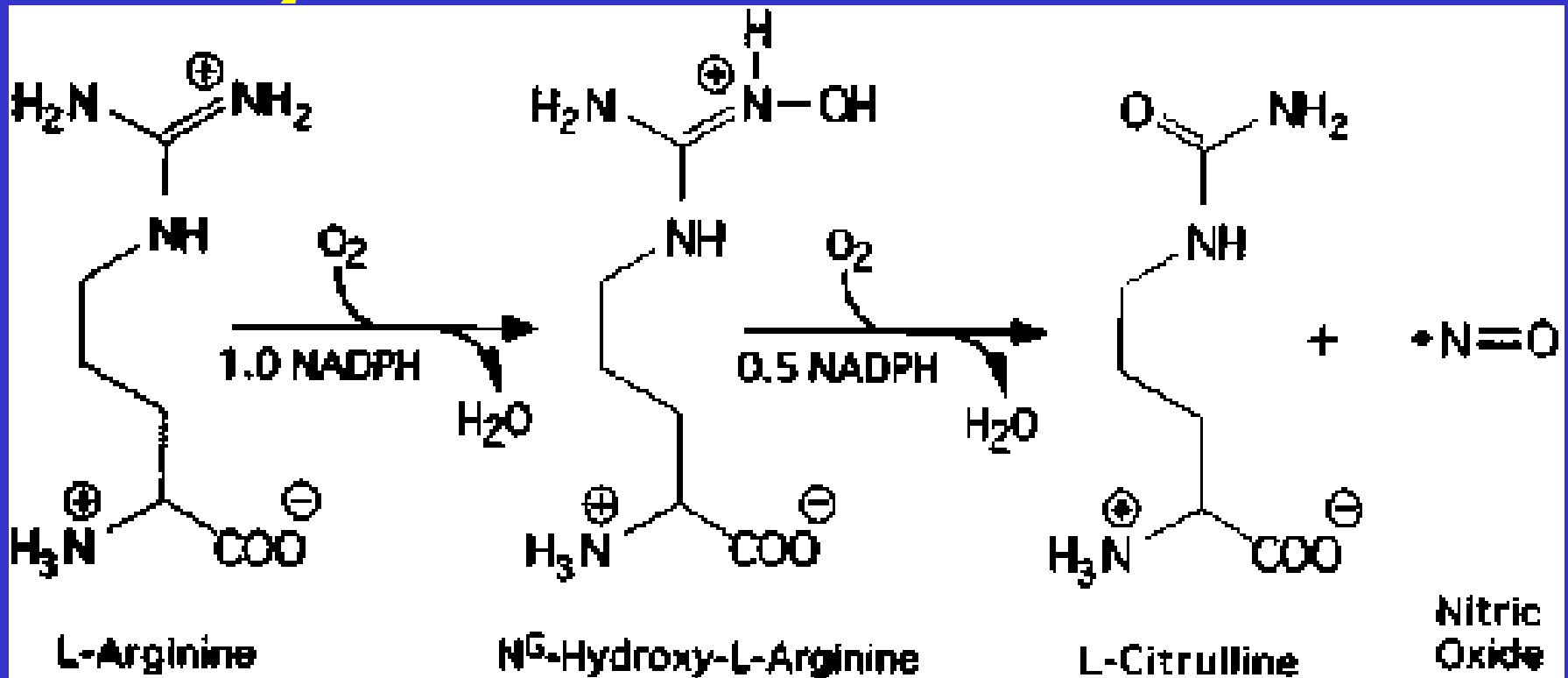
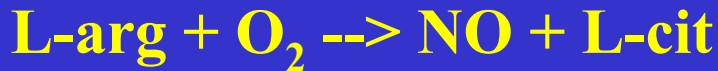
Cyclic GMP induces smooth muscle relaxation by multiple mechanisms including increased intracellular cGMP, which inhibits calcium entry into the cell, and decreases intracellular calcium concentrations ([click here for details](#)) activates K⁺ channels, which leads to hyperpolarization and relaxation stimulates a cGMP-dependent protein kinase that activates myosin light chain phosphatase, the enzyme that dephosphorylates myosin light chains, which leads to smooth muscle relaxation.

Něco málo chemie o NO

- NO je **radikál** (lichý počet valenčních elektronů, konkrétně 11 - o 1 víc než N₂, o 1 méně než O₂)
- to, že je to radikál, se někdy zdůrazňuje tečkou ($\cdot\text{NO}$), to ale není nutné, "radikálovost" je implicitní v označení NO
- z N₂ a O₂ se tvoří jen za specifických podmínek při vysokých teplotách, např. při blesku;
taky vzniká ve spalovacích motorech a tepelných elektrárnách
- samovolně se nerozkládá, jen za vyššího tlaku - při něm pozvolna vzniká 2-3 % toxického NO₂ za měsíc (pozor na skladování v bombách!)
- poměrně málo rozpustný ve vodě (~ 1.7 mmol/l při 25°C), t.j. řádově podobně jako O₂ či N₂

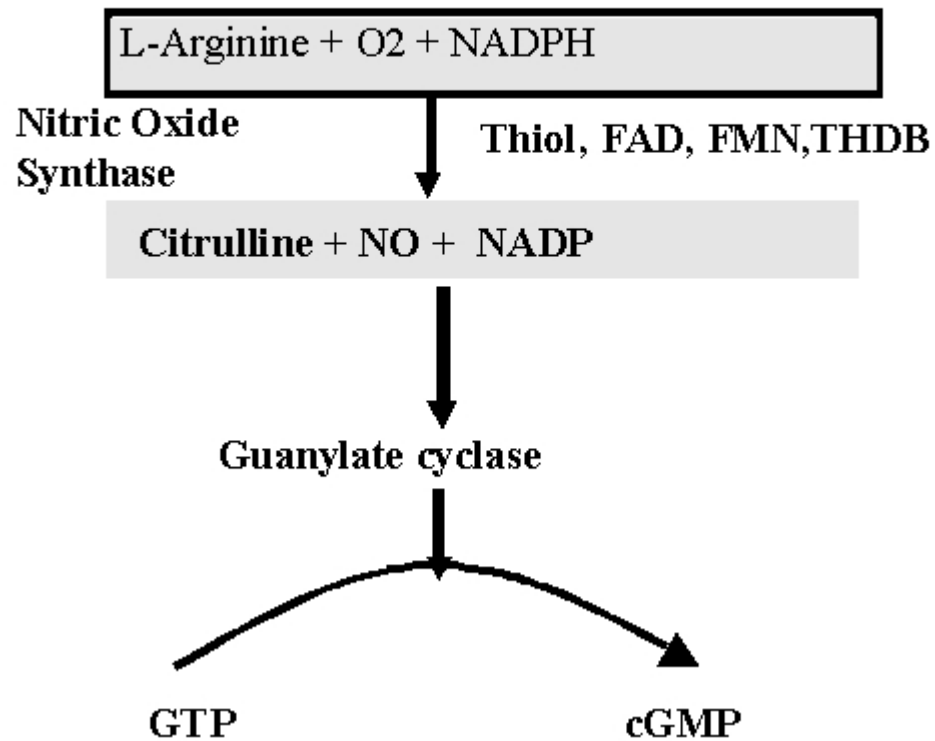
- v přítomnosti kyslíku podléhá **autooxidaci** za vzniku NO_2 : $2 \text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2$
- autooxidace je asi 200x rychlejší v roztoku než v plynné fázi
- autooxidace je rychlá (několik sec), je-li NO i O_2 hodně, ale celkem pomalá, je-li NO málo - jako je tomu většinou v tkáních, kde je NO méně než 10 μM (poločas NO tam může být až 500 sec)
- ve vodném roztoku jsou produktem autooxidace nitrity (NO_2^-), pouze v přítomnosti hemoproteinů proběhne oxidace až na nitráty (NO_3^-)
- v přítomnosti **superoxidu** vzniká extrémně rychle **peroxynitrit**:
 $\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{}^- \text{OONO}$
 $\text{}^- \text{OONO}$ není radikál, ale je velmi reaktivní a cytotoxický
- NO je velmi rychle **inaktivován** oxidací s železem **oxyhemoglobinu** za vzniku NO_3^-

V savčích buňkách je NO tvořen oxidací terminálního guanidino dusíku L-argininu molekulárním kyslíkem; kromě NO vzniká L-citrulin



Celou komplexní reakci katalyzuje jediný enzym, NO syntáza, která existuje ve 3 isoformách

Nitric oxide



Syntázy oxidu dusnatého

- **neuronální** syntáza oxidu dusnatého (NOS1 = nNOS)
- **inducibilní** syntáza oxidu dusnatého (NOS2 = iNOS)
- **endotheliální** syntáza oxidu dusnatého (NOS3 = eNOS)

Každá z těchto syntáz:

- má rozdílnou tkáňovou distribuci
- lokalizovaná na různých chromozomech

Name	Present in	Stimuli	Description
Neuronal NOS (nNOS or NOS1)	Central and peripheral neurons, platelets, pancreatic β cells, epithelial cells	NMDA, insulin, thrombin	Produces NO in neuronal tissue in both the central and peripheral nervous system. Neuronal NOS also performs a role in cell communication and is associated with plasma membranes. nNOS action can be inhibited by NPA (N-propyl-L-arginine).
Inducible NOS (iNOS or NOS2)	Macrophages, endothelial cells, chondrocytes, hepatocytes, smooth muscle cells	Endotoxin, IFN- γ , IL-1, TNF- α	Can be found in the immune system but is also found in the cardiovascular system. It uses the oxidative stress of NO (a free radical) to be used by macrophages in immune defence against pathogens.
Endothelial NOS (eNOS or NOS3 or constitutive/ cNOS)	Endothelial cells, neurons, cardiac myocytes	Acetylcholine, ADP, thrombin, shear stress, VEGF	Generates NO in blood vessels and is involved with regulating vascular function. A constitutive Ca^{2+} dependent NOS provides a basal release of NO. eNOS is associated with plasma membranes surrounding cells and the membranes of Golgi bodies within cells.

Všechny 3 isoformy NO syntázy:

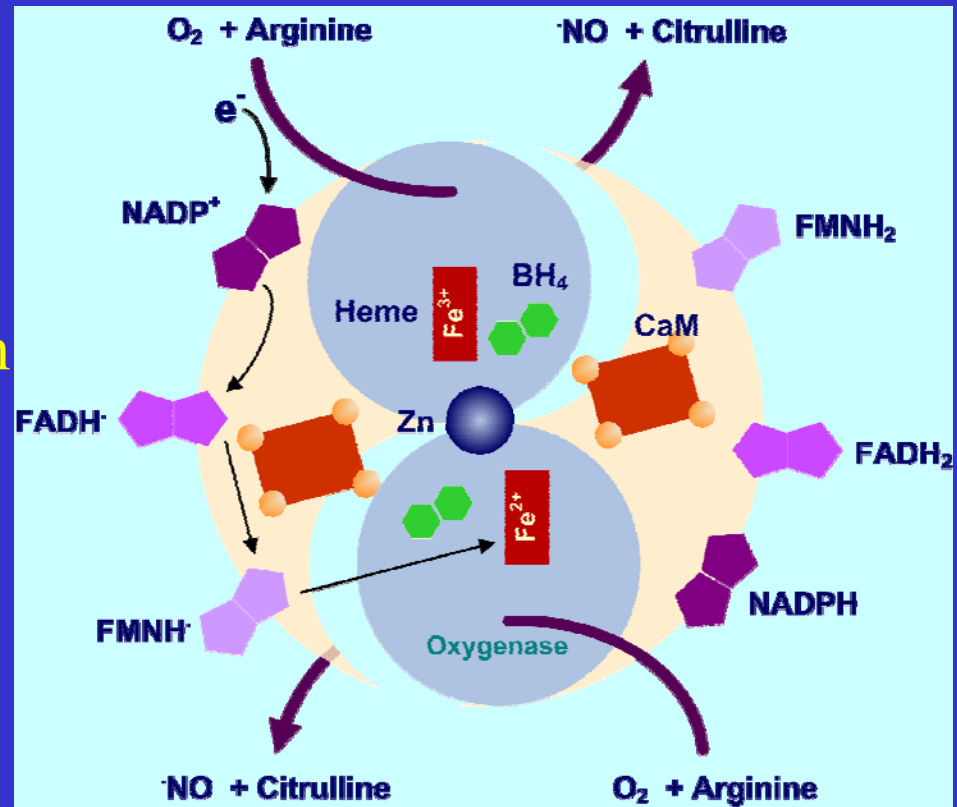
jsou aktivní jako homodimery

obsahují v aktivním centru hem

jsou **stereospecifické**
(D-arginin není substrátem)

jako **kofaktory** vyžadují:

NADPH, 6(R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, FAD, FMN a kalmodulin (ten se k NOS typu I a III váže po navázání Ca na kalmodulin, NOS II váže kalmodulin trvale)



ÚČINKY NO NA CÍLOVOU TKÁŇ

- při velkých množstvích obvykle převládá oxidace (O_2 , O_2^-) za tvorby vysoce reaktivních, cytotoxických produktů ($ONOO^-$) - zabíjení i jinak obtížně zlikvidovatelných bakterií (např. *Mycobacterium tuberculosis*), hub, parazitů a tumorů, inhibice replikace virů
- v nižších koncentracích je oxidace pomalá, většinou převládá regulační působení prostřednictvím aktivace solubilní isoformy enzymu guanylát cyklázy (heterodimer obsahující hem, s kterým právě NO interaguje)
- aktivace guanylát cyklázy zvyšuje v cílové buňce koncentraci cyklického guanosin-3',5'-monofosfátu (cGMP), ten zprostředkuje účinky NO

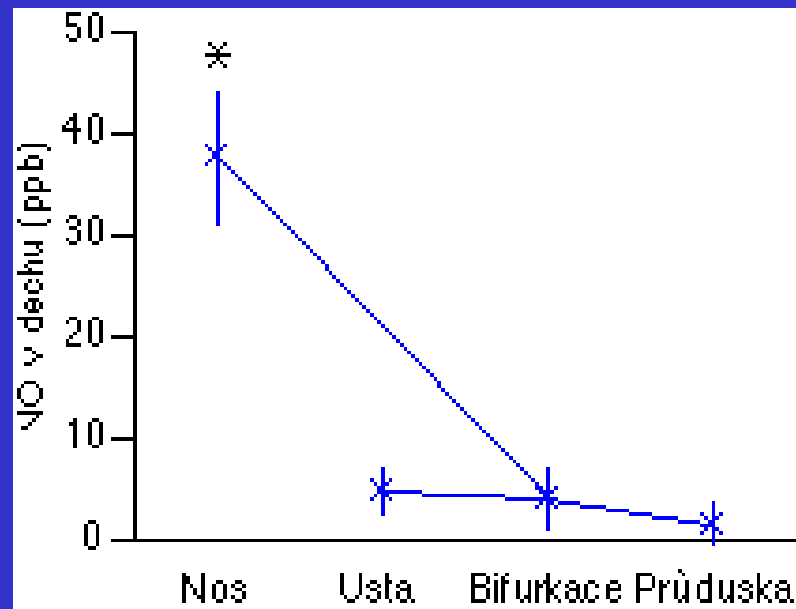
cGMP:

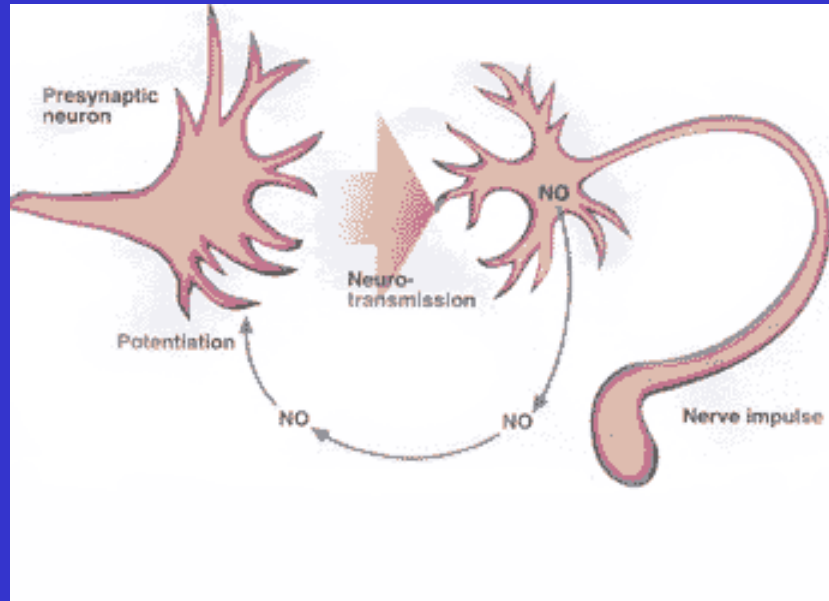
- **snižuje intracelulární koncentraci Ca^{2+}** , v hladkém svalu přímo **inhibuje kontraktilní aparát**
- cGMP je inaktivován cGMP- fosfodiesterázami na 5'-GMP (selektivním inhibitorem PDE V je třeba **Viagra**)

FYZIOLOGIE NO

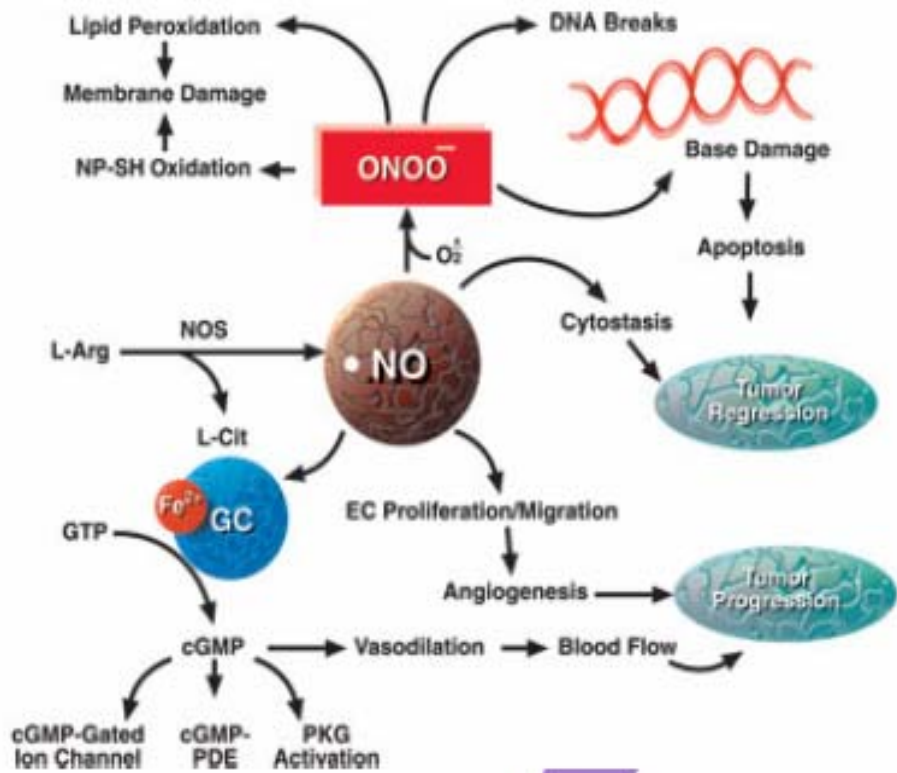
- Neurotransmitter
 - učení, paměť, spánek, bolest, deprese
- Zabíjí viry, bakterie, parazity, tumory (iNOS; indukci inhibují kortokosteroidy)
- Inhibuje mitochondriální respiraci
- Vazodilatace závislá na endotelu (ACh, eNOS)
- Nejvíc NO se dělá v nose a paranasálních dutinách
 - Pravděpodobně důležité pro jejich dezinfekci
 - NO lze dobře měřit ve vydechovaném vzduchu
 - Malá část vydechovaného NO pochází z dolních dýchacích cest (lze měřit odebráním vzorků z úst) - mění se při některých nemocech, např. astma)

Příklad: koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu zdravých lidí. Hodnoty jsou nejvyšší při odebrání vzorků z nosu a podstatně nižší v ústech a distálnějších úsecích dýchacích cest. V periferní průdušce je koncentrace NO pod detekčním limitem vysoce citlivé chemiluminiscenční metody ([Chest 110: 930-938; 1996](#)).



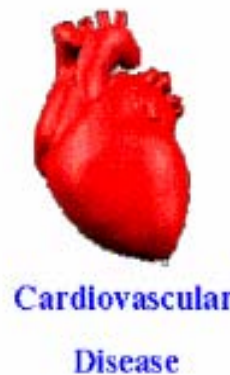


NO sensitizuje presynaptický neuron k silnějším signálům.
To následně vede k silnější odpovědi postsynaptického neuronu.



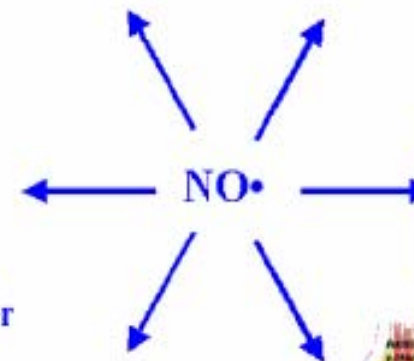
Parkinson's
Disease

Programmed Cell Death

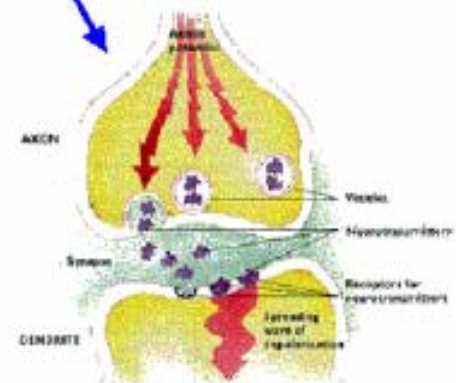


Cardiovascular
Disease

Antimicrobial
Agent



Impotence
(Viagra®)



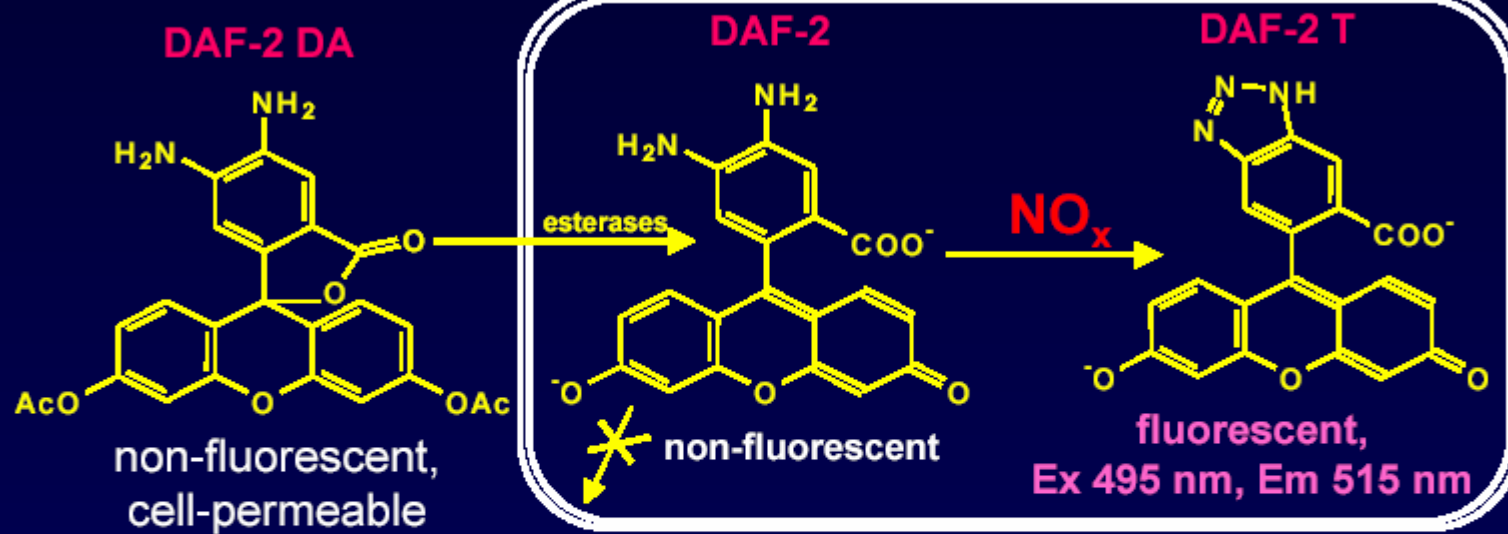
FARMAKOLOGIE NO

- Donory NO (nitroglycerin, nitroprusid, NOáty)
- Inhibitory NOS (L-NMMA, L-NAME, aminoguanidin, asymetrický dimethylarginin)
- Aktivátory eNOS (endotel-dependentní vazodilatancia)
- Inhibitory fosfodiesterázy (Zaprinast, Viagra [sildenafil],...)

Detekce NO

- cell-permeabilní fluorescenční indikátory (4,5-diacetate (DAF-2 DA) diaminofluorescein
- celková koncentrace nitrátů/nitritů
- aplikace NO donorů compounds, NO scavengerů, a guanylyl cyklázy
- NOS aktivita v buněčných homogenátech měřením enzymatické konverze argininu na citrulin během tvorby NO
- inhibitory NOS (L-NAME)
- aplikace protilátek k isoformám NOS (imunocytochemie, imunoblotting)
- exprese genu pro iNOS

Bioimaging of Nitric Oxide Using Diaminofluorescein-2 (DAF-2)



Advantages: Sensitivity for NO (5 nM in vitro) with high temporal and spatial resolution.

No cross-reactivity to $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ and ONOO^-

Kojima et al., Biol.Pharm. Bull. (1997)

Assay limitations: Possible interference by reducing agents and divalent cations, requires standardized illumination conditions

Gas-phase chemiluminescence assay

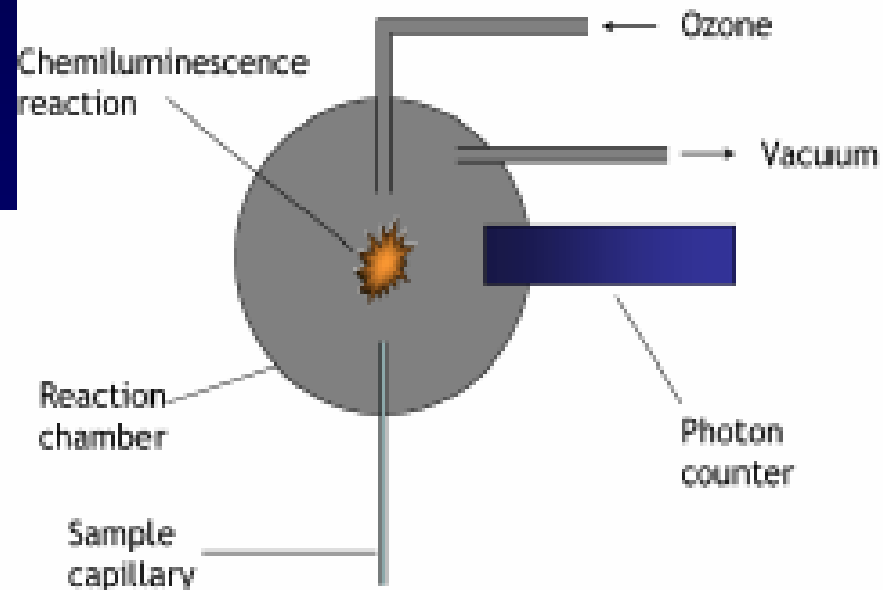
NO Detection by Gas Phase Chemiluminescence

Detection Principle:

NO is purged from an aqueous solution using an inert gas such as Ar or He and transferred to a mixing chamber where it reacts with O₃ under reduced pressure.



The light emitted by excited NO₂ upon returning to the ground state is measured by photon counting (*fmol-pmol*). Not very useful when attempting to quantify NO in physiological fluids such as serum, plasma or urine. Why?



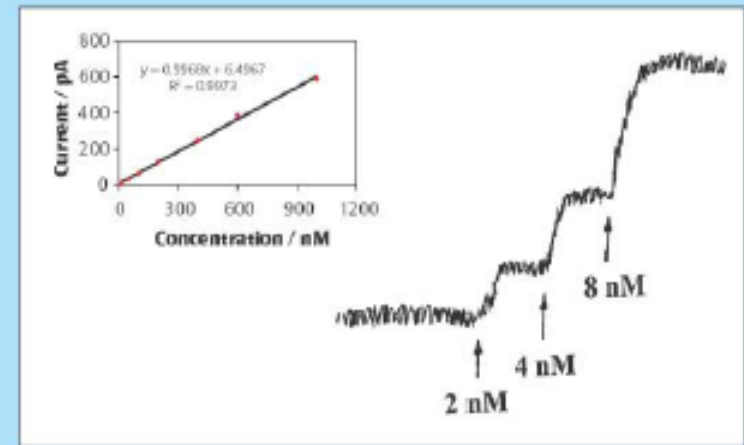
Electrochemical detection

Duo-18

Now records data directly from *NOMKII*, *EVOMX*, *ISO2*, *pH* electrodes and *Ion Selective Electrodes*!



Current / pA



Time / S

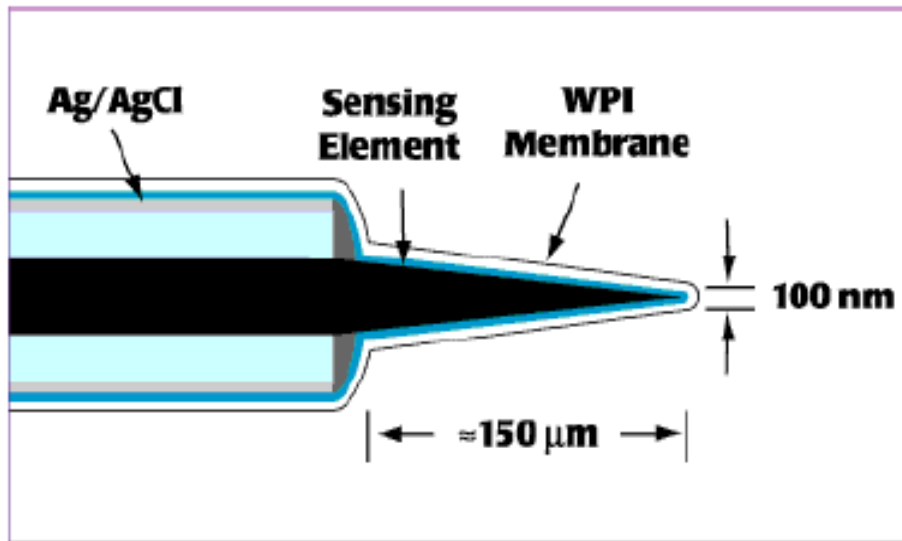
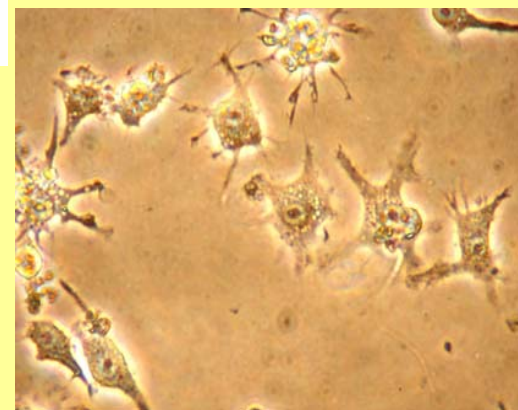
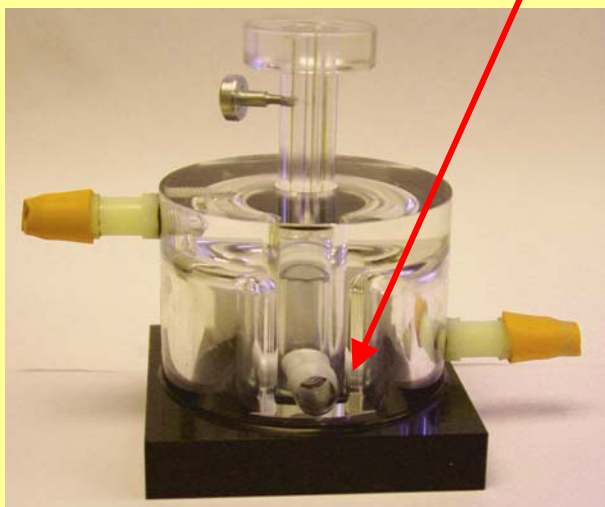
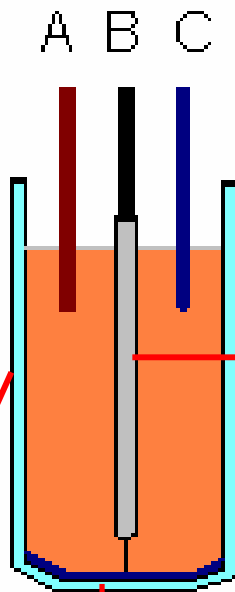


Schéma experimentu:

1. RAW 264.7 vysadíme na kultivačnú misku a kultivujeme v DMEM médiu v inkubátore pri 5% CO₂ a 37°C.
2. Počet buniek stanovujeme pomocou Coulter Countru (Coulter®, Coulter Electronics LTD, England)
3. Bunky o koncentrácii $1 \times 10^6 / 800 \mu\text{l}$ inkubujeme 60 min. v 800 μl MEM média.
4. Následne do skúmaviek s adherovanými bunkami aplikujeme lipopolysacharid (LPS) – 5ng/ml.
5. Mikroskúmavku umiestnime do meracej komorky a snažíme sa umiestniť elektródu na dno, tesne až k povrchu buniek.
6. Zapojíme elektródu a spustíme meranie.
7. Po ukončení pokusu a odpojení elektródy odpipetujeme médium.
8. V médiu následne pomocou Griessovej metódy spektrofotometricky stanovujeme koncentráciu nitritov (NO₂⁻), ktoré sú jedným z koncových metabolitov NO.

A - referenčná elektróda B - pracovná elektróda C – pomocná elektróda



RAW 264.7 (1×10^6)

DMEM + 10% FBS (5% CO₂, 37°C).

MEM (NaHCO₃, stále pH)

Hrbac J, Gregor C, Machova M, Kralova J, Bystron T, Ciz M, Lojek A. (2007) Nitric oxide sensor based on carbon fiber covered with nickel porphyrin layer deposited using optimized electropolymerization procedure. *Bioelectrochemistry*. Sep 27; [Epub ahead of print]

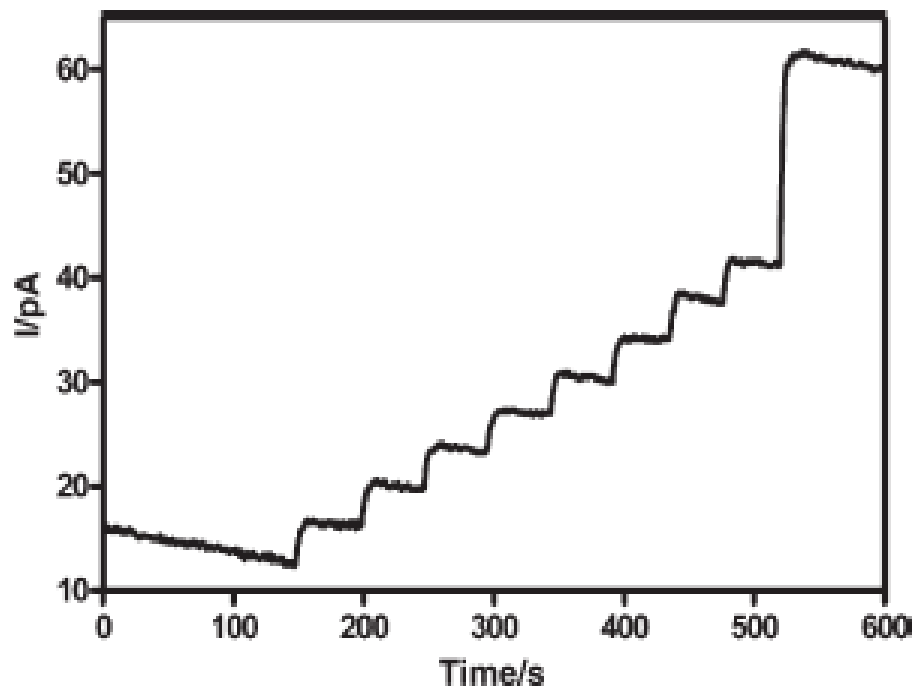


Fig. 2. Carbon fiber sensor's performance at nanomolar NO concentrations (CPA at 830 mV (vs. Ag/AgCl)). Eight additions of NO into aerated PBS, each resulting in 4 nM NO concentration, followed by response for 20 nM NO are shown. After pretreatment the electrode was coated with poly-NiTMHPP, electropolymerized from 0.4 mM NiTMHPP by 100 cycles from 0 to 1200 mV (vs. Ag/AgCl), scan rate 100 mV/s).

NO elektroda



