

# ANTIOXIDANTY A VOLNÉ RADIKÁLY



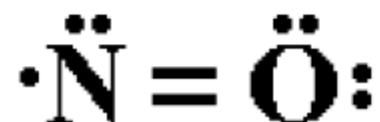
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## *Patologické stavy spojené s ROS a RNS - 1.část*

Úloha NO – přednáška přebraná od Doc. Lojka, MU, BFU

Aktualizace Doc. PharmDr. Renata Kubínová, Ph.D., 2018

## 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

## 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 plnicí 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 guanylátcyklastu a tak zvyšuje intracelulární koncentraci cGMP (Ferid Murad)

**1980** - objev endoteliálního relaxačního faktoru (EDRF, Robert Furchgott). Snaha identifikovat EDRF vedla bezprostředně k následujícímu objevu

**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)

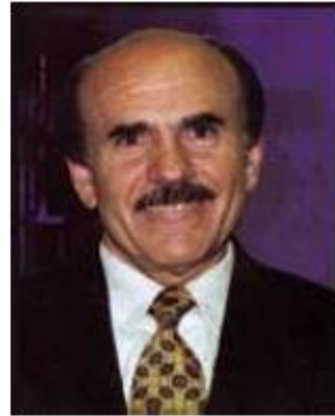
**1999** – inhalační terapie NO u PPHN a ARDS (schváleno FDA jako přípravek Inomax, za 10 let – 300 000 léčených pacientů)



**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

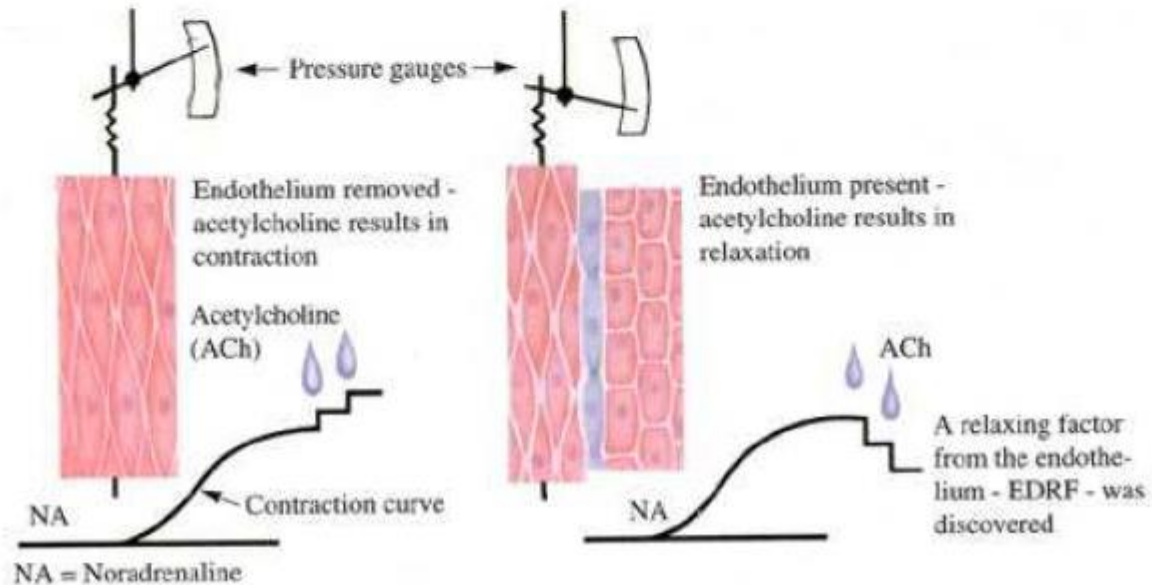
## Oxid dusnatý

- ještě před pár lety pouze nepříjemné a nebezpečné znečištění ovzduší přispívající ke smogu a kyselým dešťům, dnes nejstudovanější endogenní molekula posledních 30 let
- explozivní rozvoj znalostí (více než 500 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 (Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn, Acute Respiratory Distress Syndrome, šok, impotence)

# Furchgottův sandwich

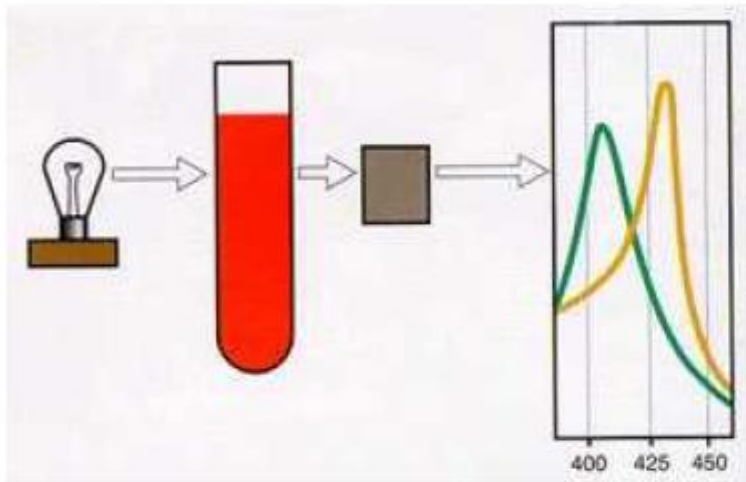
Furchgott prokázal, že relaxace cév indukovaná acetylcholinem je závislá na endotelu.

Použil dva kousky aorty, u jednoho odstranil endotel

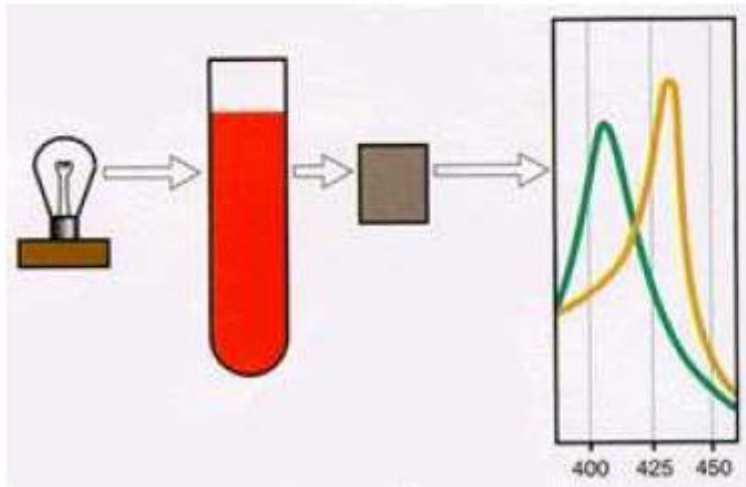


# Ignarrova spektrální analýza

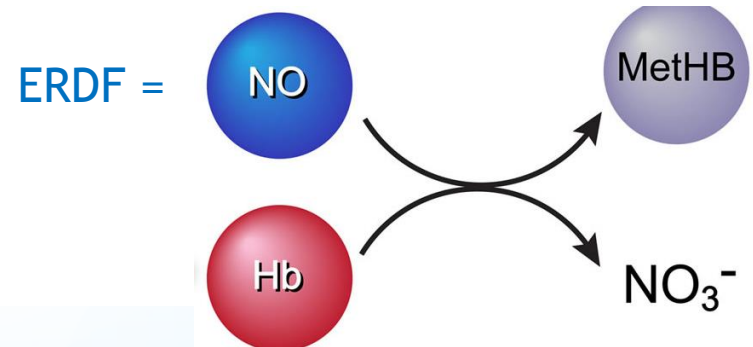
Ignarro pomocí spektrální analýzy prokázal, že EDRF je totožný s NO.



Hemoglobin (žlutý) exponovaný endoteliálními buňkami produkujícími EDRF (konverze oxyhemoglobinu na methemoglobin)



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





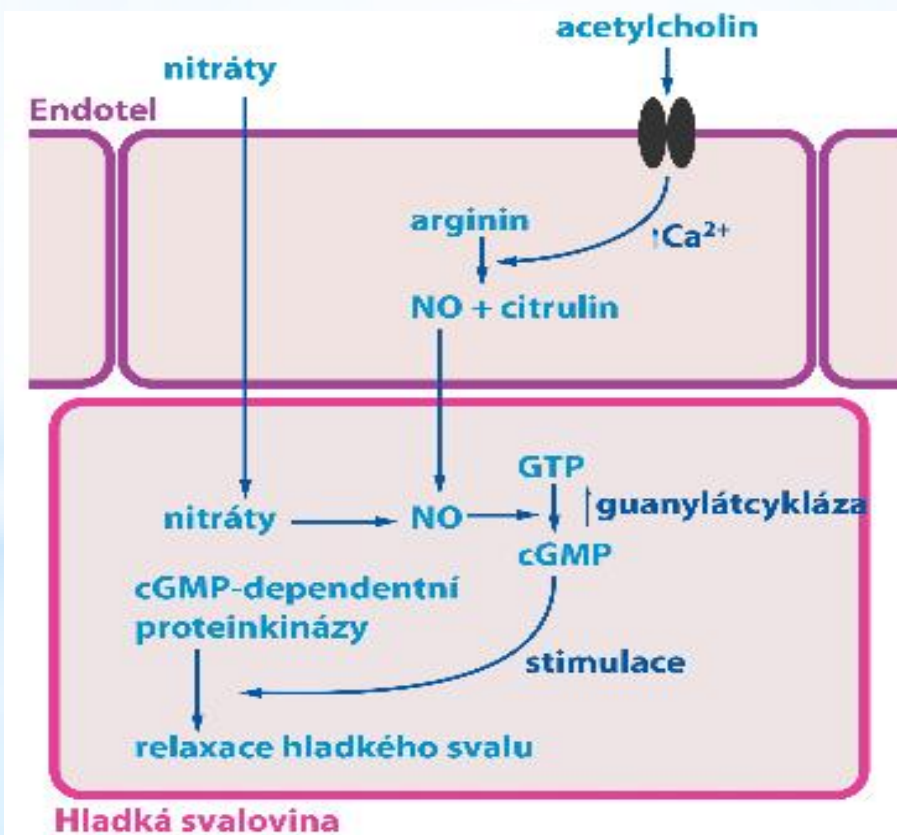
## Muradova enzymatická aktivace

Murad věděl, že nitroglycerin působí relaxaci hladké svaloviny.

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

Působí nitroglycerin cestou uvolňování NO ???

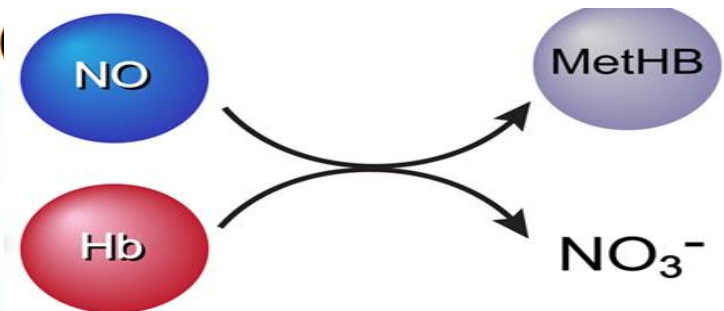
Probublával NO přes tkáň obsahující enzym – cGMP se zvyšoval.



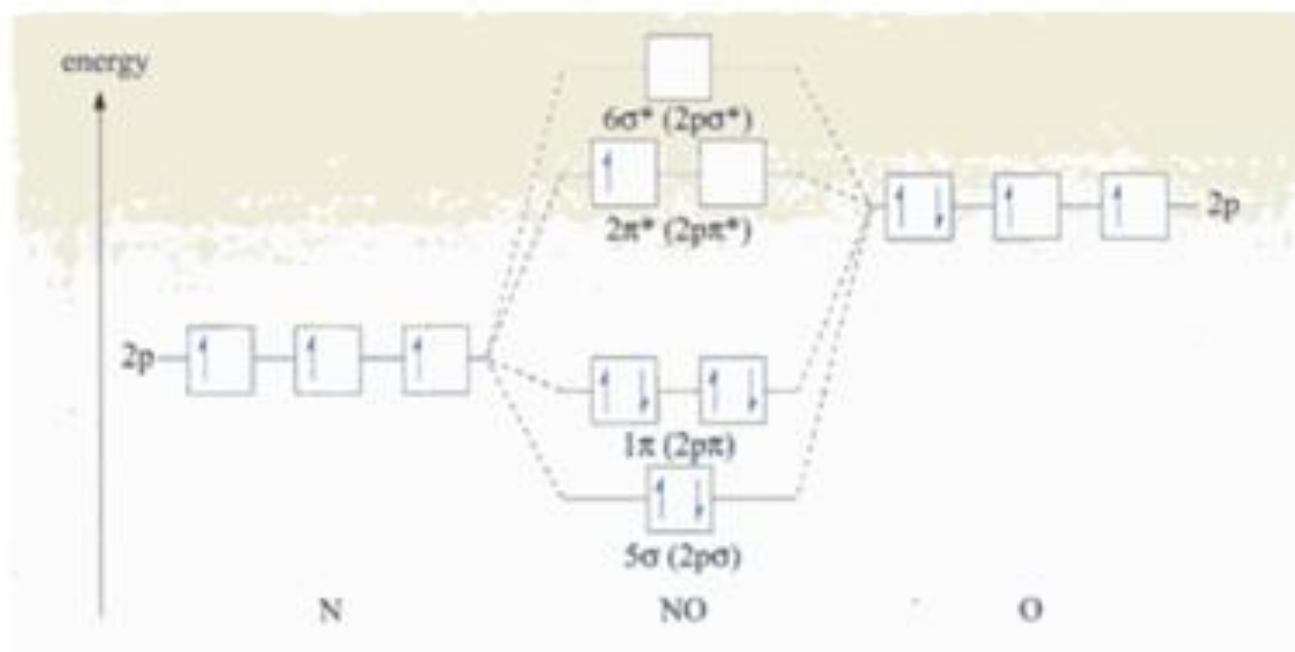
## Něco málo chemie o NO

- NO je **radikál** (lichý počet valenčních elektronů, konkrétně 11 - o 1 víc než  $N_2$ , o 1 méně než  $O_2$ )
- to, že je to radikál, se někdy zdůrazňuje tečkou ( $\cdot NO$ ), to ale není nutné, "radikálovost" je implicitní v označení NO
- z  $N_2$  a  $O_2$  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  $NO_2$  za měsíc (pozor na skladování v bombách!)
- poměrně málo rozpustný ve vodě ( $\sim 1.7$  mmol/l při  $25^\circ C$ ), t.j. řádově podobně jako  $O_2$  či  $N_2$

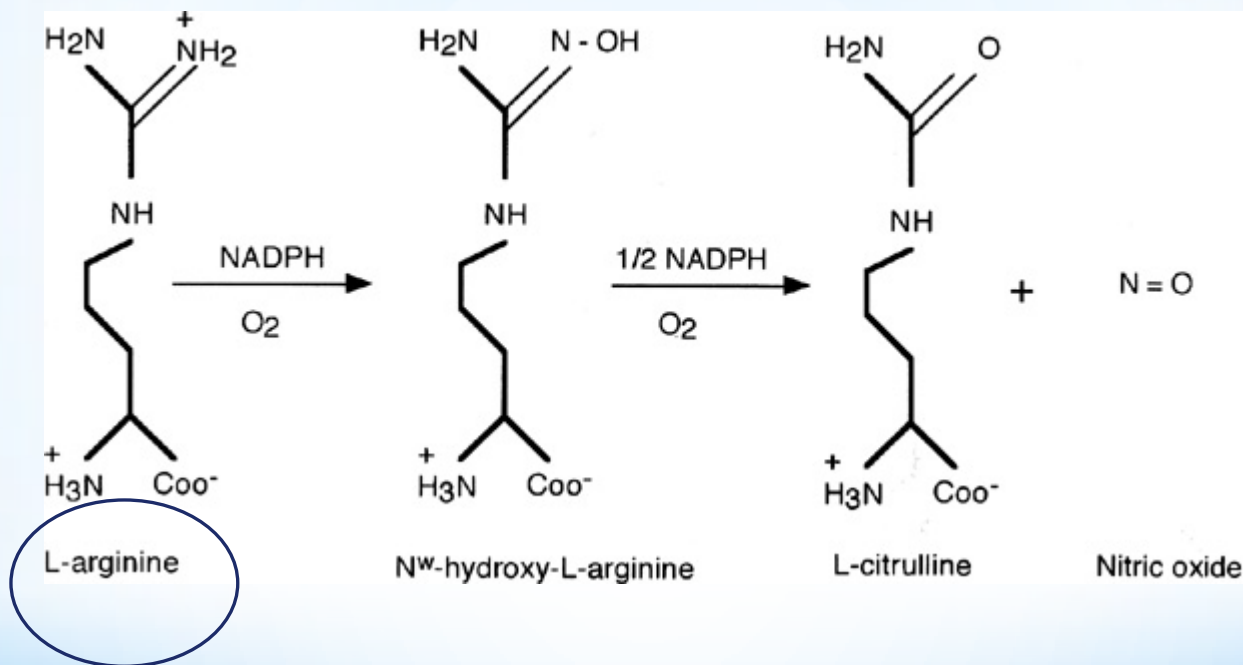
- v přítomnosti kyslíku podléhá **autooxidaci** za vzniku  $\text{NO}_2$ :  $2 \text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2$
- autooxidace je asi 200x rychlejší v roztoku než v plynné fázi
- autooxidace je rychlá (několik sec), je-li  $\text{NO}$  i  $\text{O}_2$  hodně, ale celkem pomalá, je-li  $\text{NO}$  málo - jako je tomu většinou v tkáních, kde je  $\text{NO}$  méně než  $10 \mu\text{M}$  (poločas  $\text{NO}$  tam může být až 500 sec)
- ve vodném roztoku jsou produktem autooxidace nitrity ( $\text{NO}_2^-$ ), pouze v přítomnosti hemoproteinů proběhne oxidace až na nitráty ( $\text{NO}_3^-$ )
- v přítomnosti **superoxidu** vzniká extrémně rychle **peroxynitrit**:  
 $\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \cdot\text{OONO}$   
 $\cdot\text{OONO}$  není radikál, ale je velmi reaktivní a cytotoxický
- $\text{NO}$  je velmi rychle **inaktivován** oxidací s železem **oxyhemoglobinu** za vzniku  $\text{NO}_3^-$



## Diagram vzniku molekulových orbitalů u NO



# Biosyntéza NO



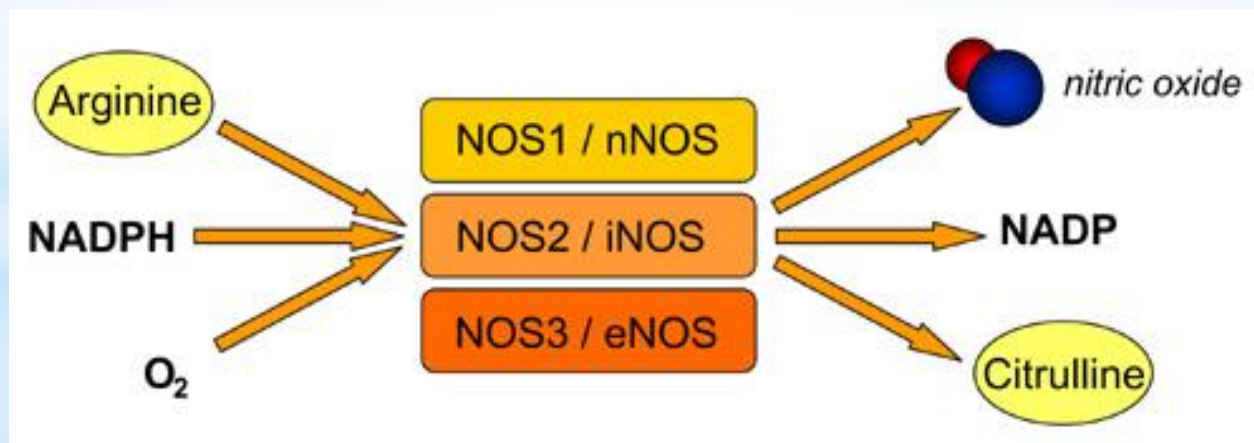
Celou komplexní reakci katalyzuje jediný enzym, NO-syntasa, která existuje ve 3 isoformách

# Syntasy oxidu dusnatého

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

Každá z těchto syntas:

- má rozdílnou tkáňovou distribuci
- lokalizovaná na různých chromozomech



# Všechny 3 isoformy NO syntasy:

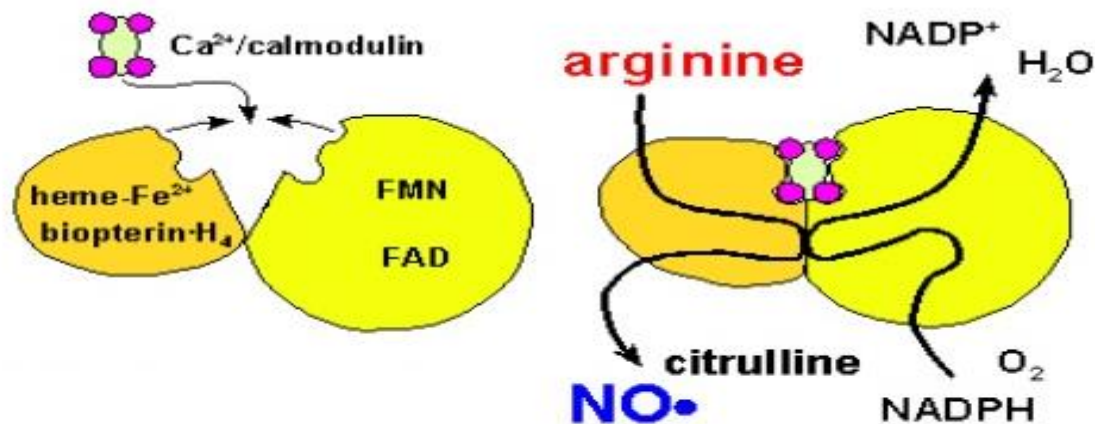
jsou aktivní jako homodimery

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

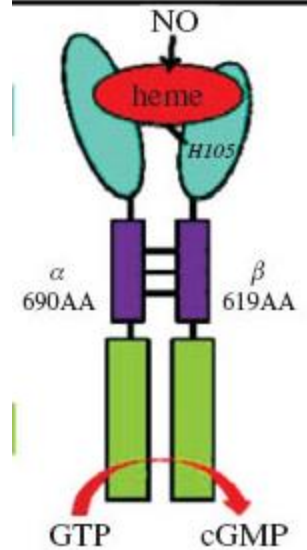


*modified from Griffith and Stuehr (1995)*

## 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

- **snižuje intracelulární koncentraci  $Ca^{2+}$** , v hladkém svalu přímo **inhibuje kontraktilní aparát**

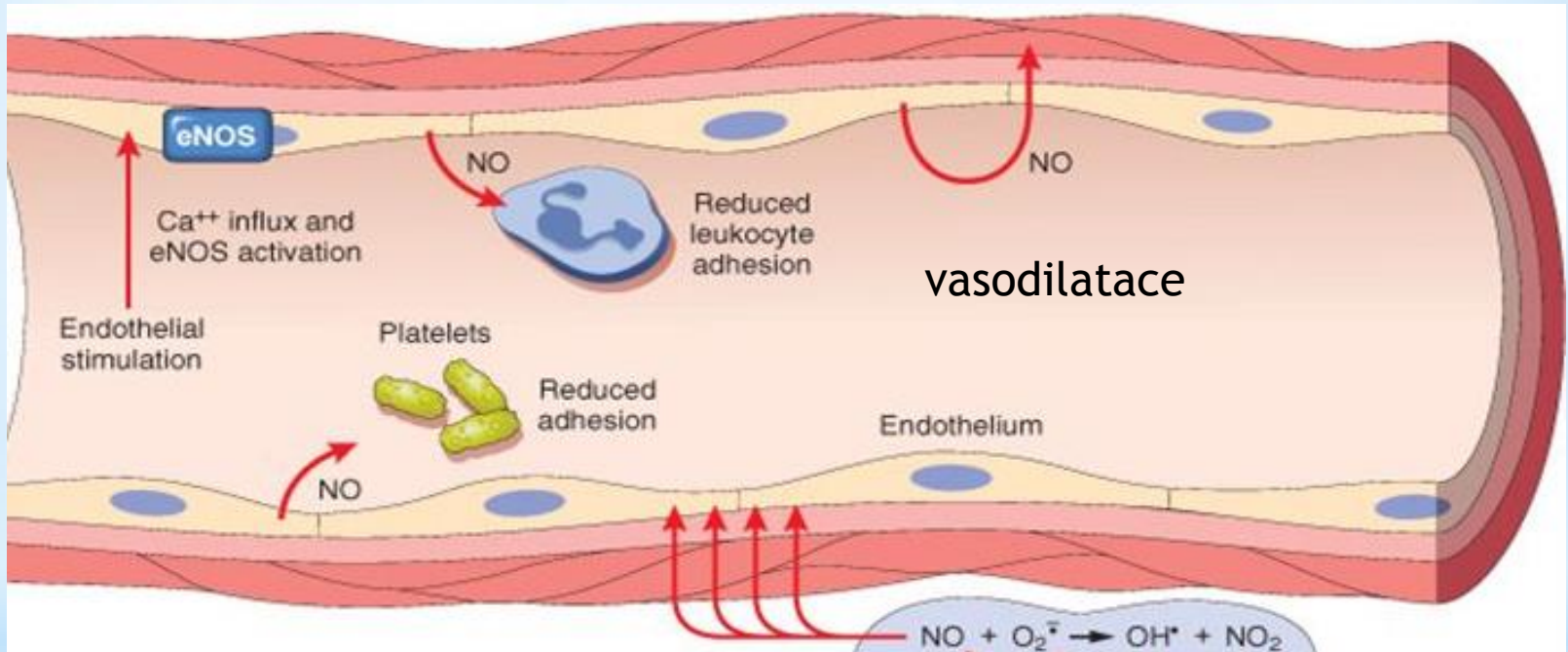




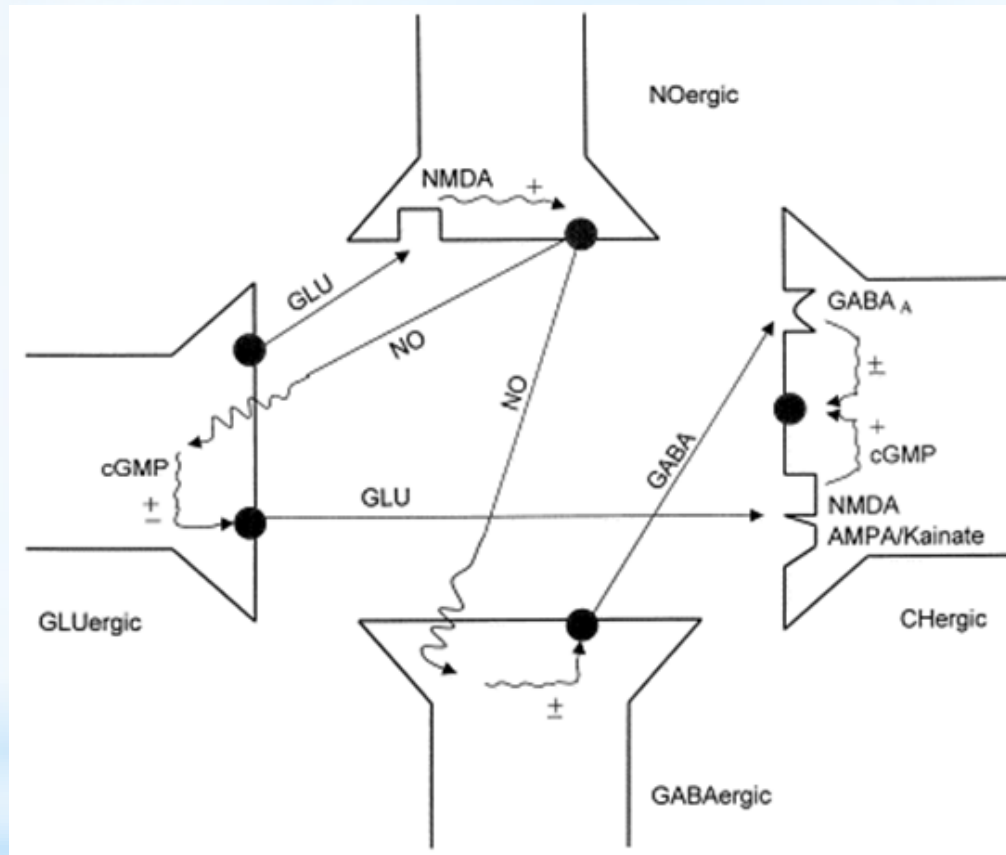
# Význam NO

- Zabíjí viry, bakterie, parazity, tumory (**iNOS**; indukci inhibují kortikosteroidy)
  - Inhibuje mitochondriální respiraci
- 
- Nejvíc NO se syntetizuje v nose a paranasálních dutinách
    - Pravděpodobně důležité pro jejich dezinfekci (NOSCN)
    - 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)

- Vazodilatace závislá na endotelu (ACh, eNOS)



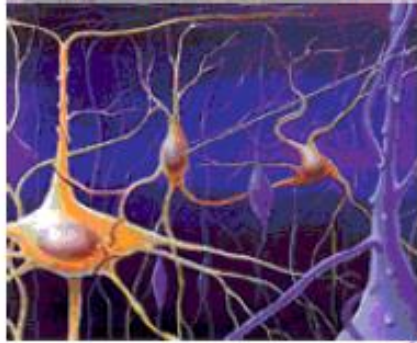
# NO jako signální molekula



- Neurotransmitter
  - učení, paměť, spánek, bolest, deprese

# Fyziologický význam NO

Komunikace mezi nervovými buňkami v mozku



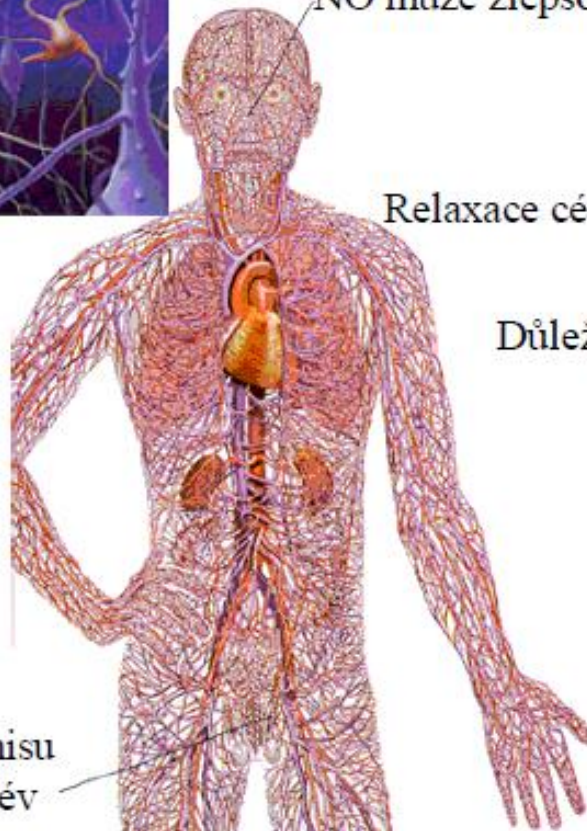
NO může zlepšovat čich

Relaxace cév při ateroskleróze (nitroglycerin)

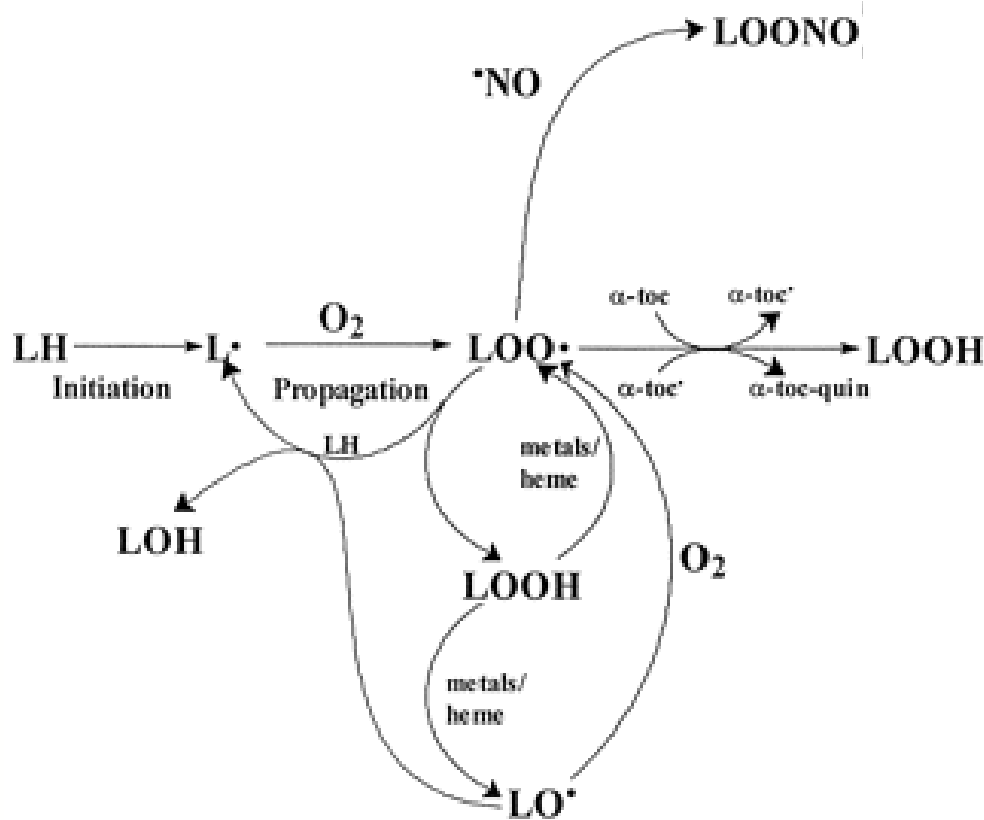
Důležitý zánětlivý mediátor



NO iniciuje erekci penisu  
roztažením krevních cév

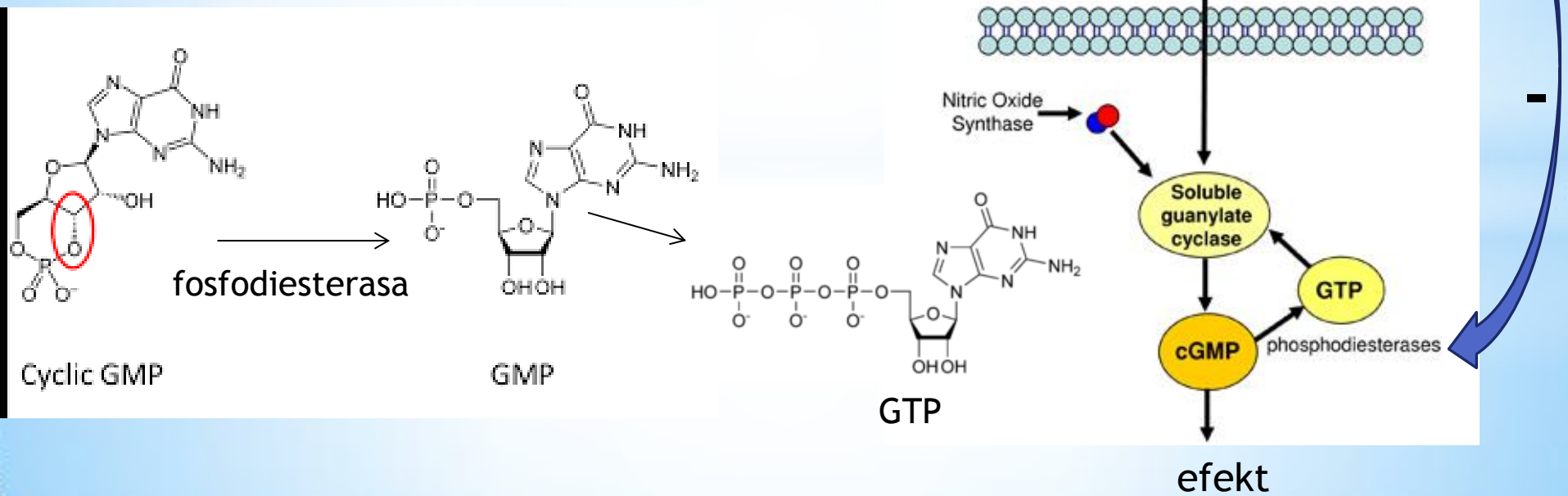


# NO jako antioxidant

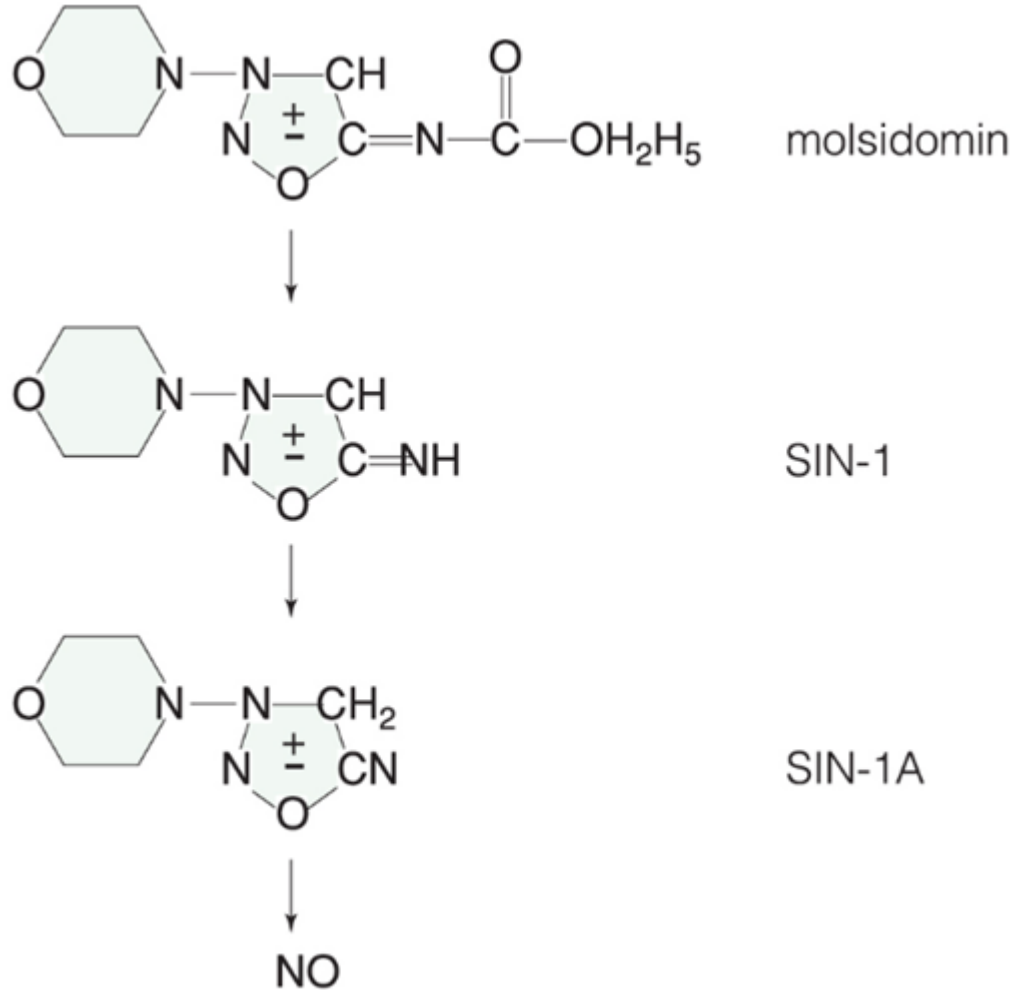


# FARMAKOLOGIE NO

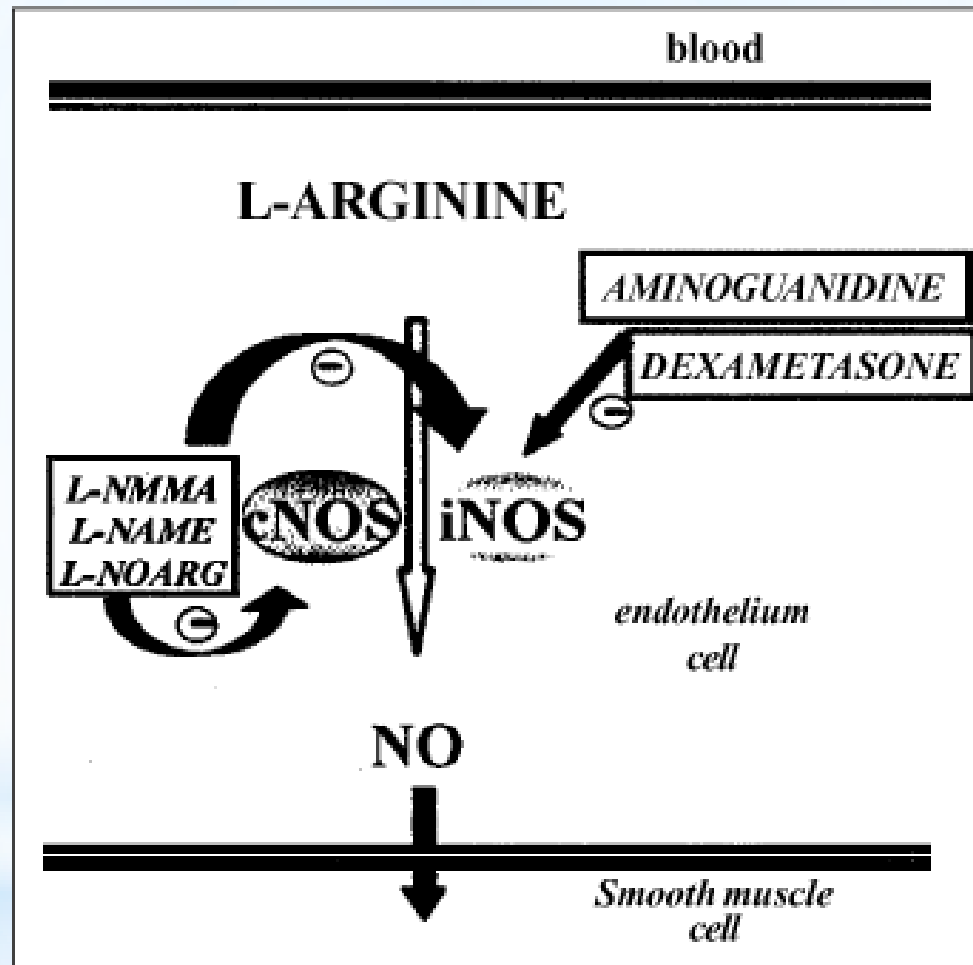
- Donory NO (nitroglycerin, nitroprusid, organické nitráty)
- Inhibitory NOS (L-NMMA, L-NAME, aminoguanidin, asymetrický dimethylarginin)
- Aktivátory eNOS (endotel-dependentní vazodilatancia)
- Inhibitory fosfodiesterasy 5 (sildenafil [Viagra], tadalafil, verdenafil, udenafil, avanafil)



# Donory NO

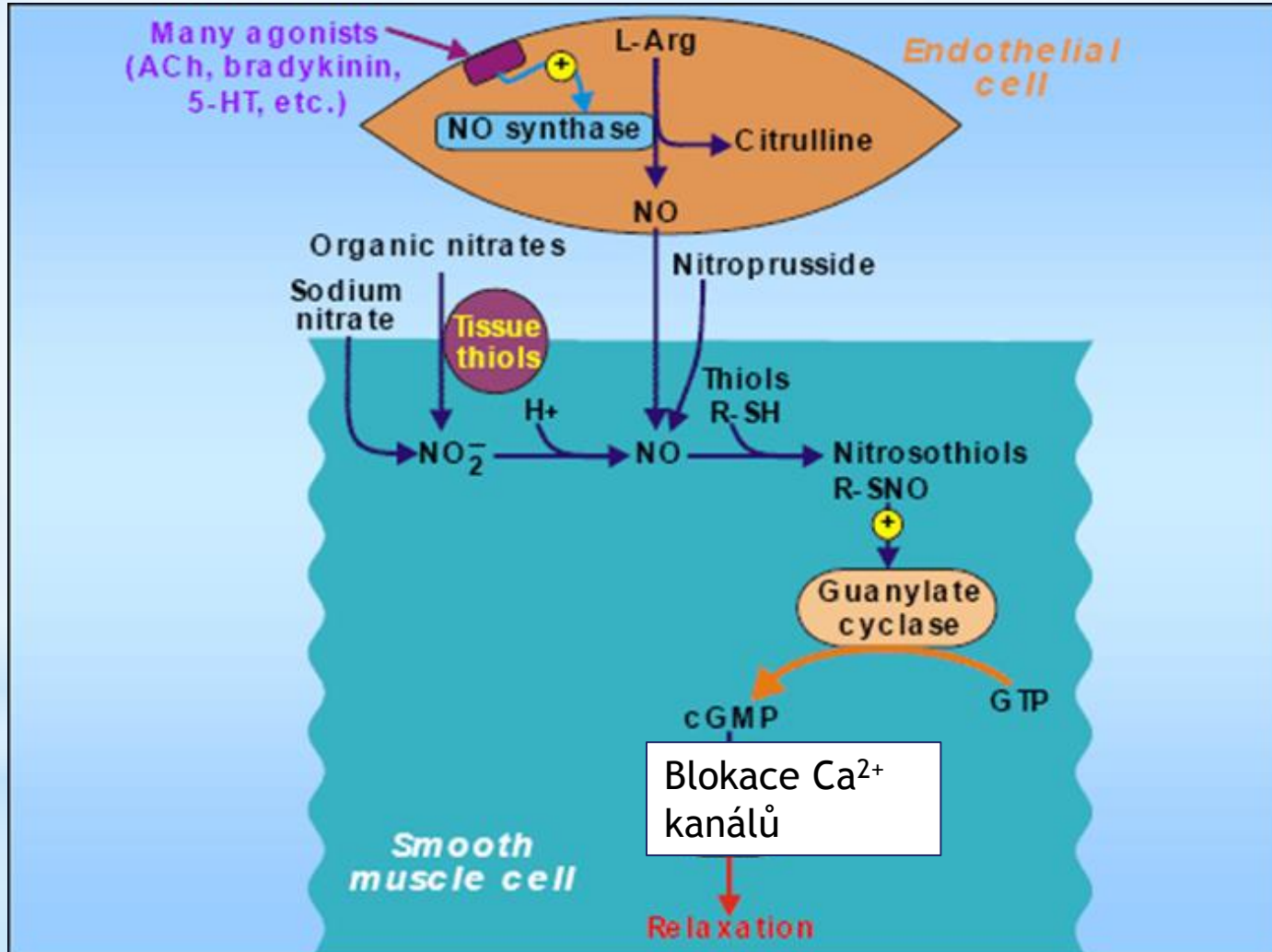


# Inhibitory NOS

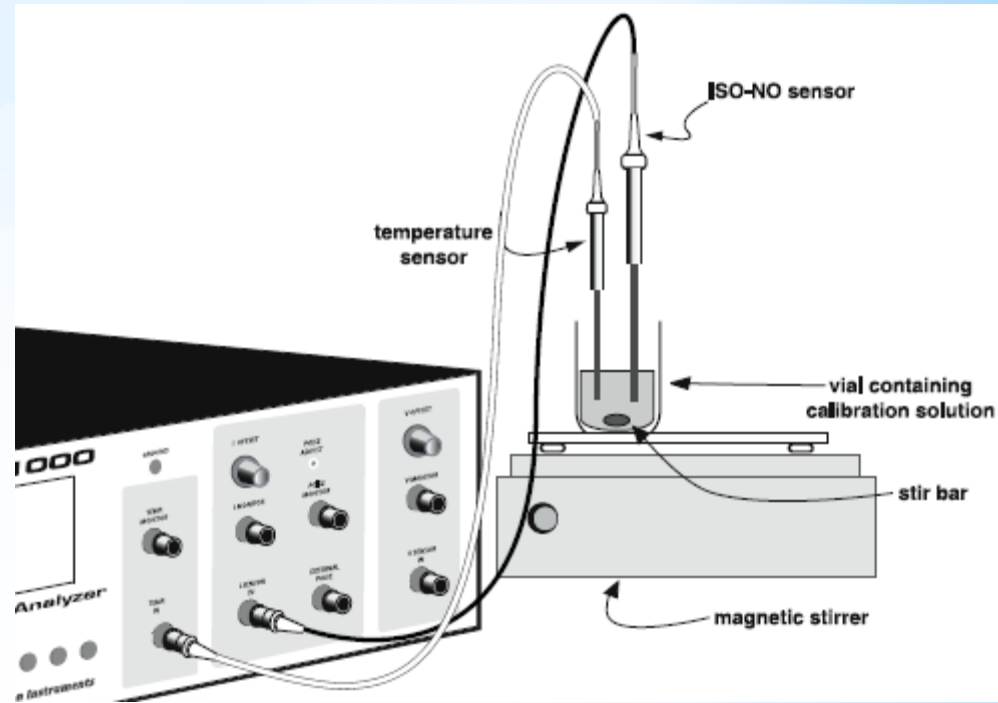
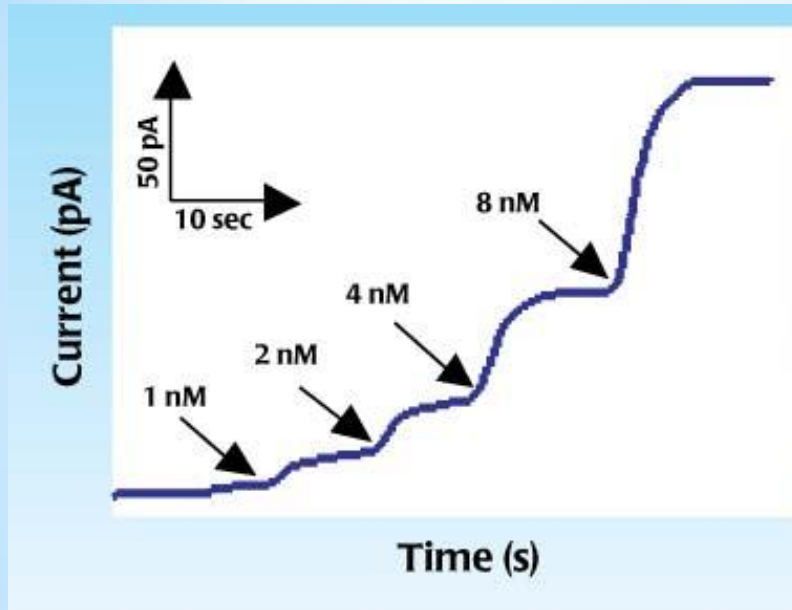


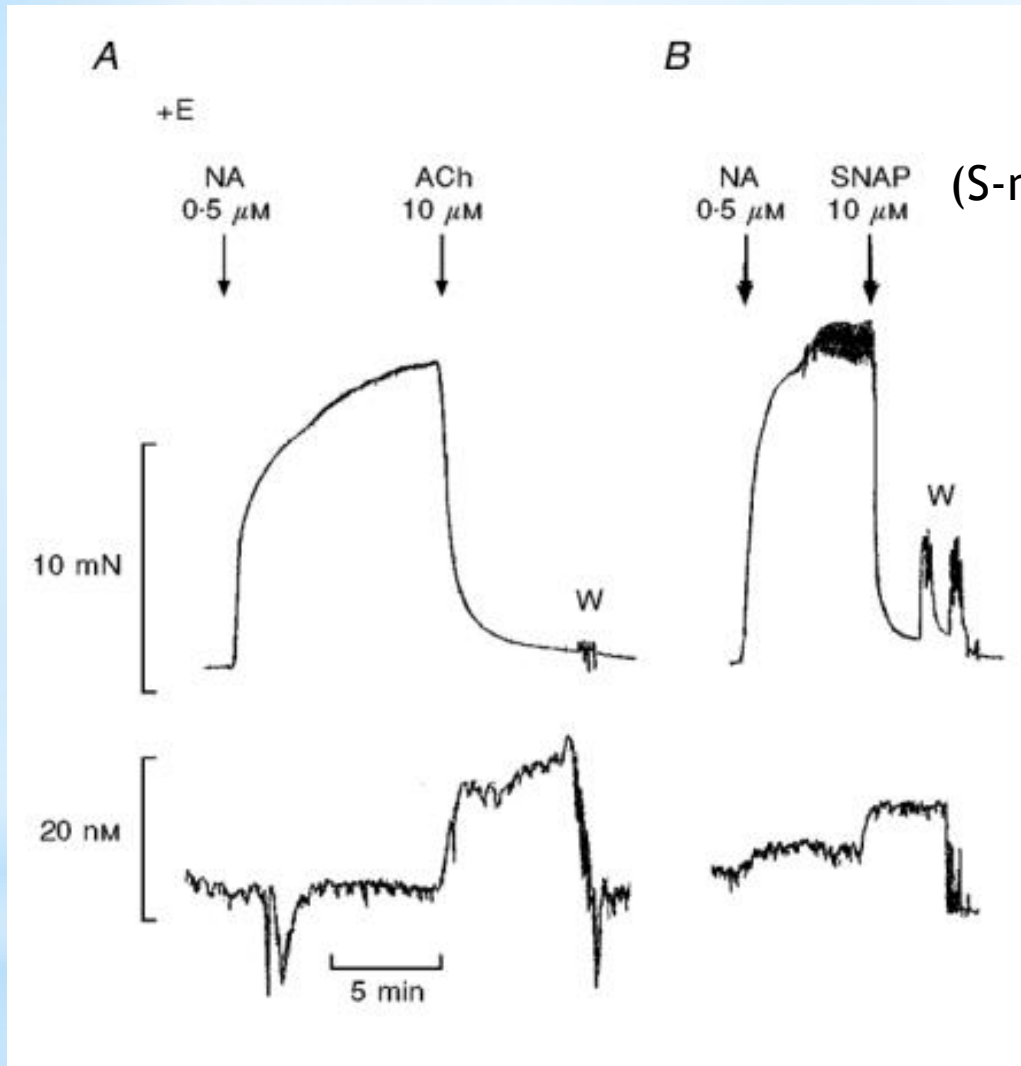


# Aktivátory NOS



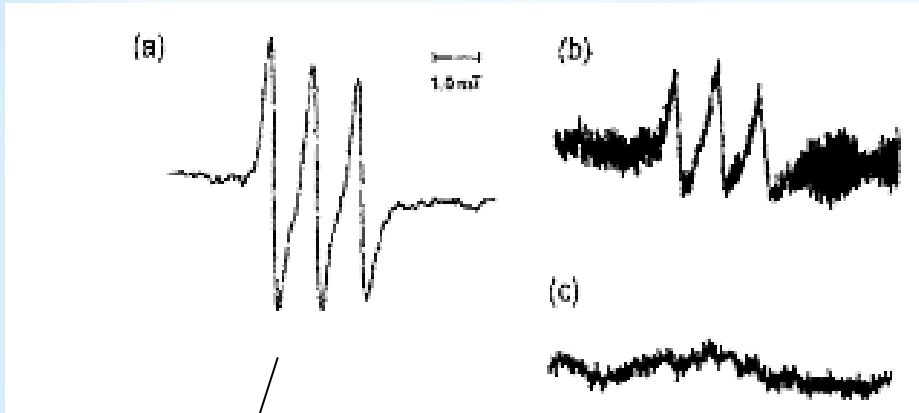
# Elektrochemická detekce NO





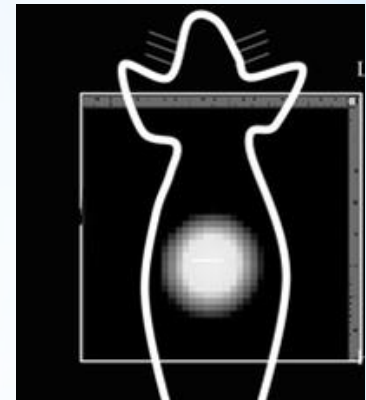
(S-nitroso-N-acetylpenicilamin)

# Detekce NO - ESR



signál NO-Fe-DTCS  
aduktu

*in vivo* signál z břišní  
dutiny myši



*in vivo* signál z břišní  
dutiny myši po podání  
inhibitoru produkce NO

Jackson S. K. at al. In vivo EPR spectroscopy: biomedical and potential diagnostic applications. Faraday Discuss. 2004, 126, 103-117