

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra fyziologie živočichů



Bakalářská práce

**Působení volných radikálů dusíku na srdce potkana v hypoxii
Effect of nitrogen free radicals in rat's heart under hypoxic
condition**

Michaela Cardová

Školitelka: RNDr. Jitka Žurmanová, PhD.

Praha 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jitky Žurmanové, PhD., a s použitím citované literatury.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Jitce Žurmanové, PhD. za trpělivost, vstřícnost a čas, které mi při psaní této práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě ve studiu vždy podporovala.

Abstrakt

Od roku 1987 kdy byla zjištěna schopnost buněk endogenní produkce NO a jeho úloha při vazodilataci cév, stal se oxid dusnatý předmětem zkoumání mnoha vědců. Nyní je NO velmi důležitou signální molekulou vyskytující se ve všech důležitých orgánových soustavách. Tato práce je zaměřena pouze na jeho funkci v srdeční tkáni během hypoxických stavů. Vliv oxidu dusnatého, přestože byly popsány i jeho škodlivé účinky, je v dnešní době považován za kardioprotektivní. Většinu cytotoxických efektů bylo možné vysvětlit působením peroxynitritu, který vzniká spontánní reakcí NO se superoxidem. Cílem této práce je shrnout nejdůležitější účinky působení oxidu dusnatého v srdci.

Klíčová slova: oxid dusnatý, peroxynitrit, superoxid, hypoxie, hypoxií indukovaný faktor, cyklický guanosin monofosfát, myokard, oxid dusnatý syntasa, endoteliální relaxační faktor, prolyl-hydroxylasa

Abstract

Since 1987 when the ability of cells was discovered to produce endogenous NO and its role in vascular vasodilatation was found, NO became to be the subject of examination by many scientists. NO is the important signaling molecule for now occurring in all important organ systems. This work is focused on its functionality in cardiac tissue under hypoxic stimulus. Effect of nitric oxide has been recently considered as cardioprotective, in spite of its known and well documented harmful influence. Most of the cytotoxic effects can be explained by peroxynitrit, which originates in the spontaneous reaction of NO with superoxid. The aim of this work is to summarize the most important effects of nitric oxide in the heart.

Keywords: nitric oxide, peroxynitrit, superoxide, hypoxia, hypoxia-induced factor, cyclic guanosine monofosfát, myocardium, nitric oxide synthase, endothelial relaxation factor, prolyl-hydroxylase

Seznam zkratek

NO	oxid dusnatý
NOS	oxid dusnatý syntasa
EDFR	endoteliální relaxační faktor
nNOS	neuronální NO syntasa
iNOS	inducibilní NO syntasa
eNOS	endoteliální NO syntasa
RyR	ryanodinový receptor
O ₂ ⁻	superoxid
ONOO ⁻	peroxynitrit
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
PHD	prolyl-hydroxylasa
CH	chronická hypoxie
IP	ischemický preconditioning
PI-3 K	fosfatidyl-inositol-3 kinasa
PKB/Akt	protein kinasa B
PKGs	protein kinas
PDE	fosfodiesteras
ARNT	arylhydrocarbon receptor nuclear translocator
pVHL	von Hippeln-Lindau protein
HRE	hypoxia- responsive element
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
EPO	erytropoetin
PTP	permeability transition pores
PARP-1	poly-(ADP-ribosylating) enzyme
NAD ⁺	nicotinamid adenin dinukleotid
SOD	superoxid dismutasa

Obsah

1.	Úvod.....	7
2.	Oxid dusnatý	8
2.1.	Vznik NO.....	8
2.1.1.	Neuronální NOS	9
2.1.2.	Inducibilní NOS.....	9
2.1.3.	Endoteliální NOS.....	10
2.1.4.	Neenzymatické zdroje NO.....	10
3.	Role NO během adaptací na hypoxii.....	11
3.1.	Hypoxie	11
3.1.1.	Experimentální modely.....	12
3.1.2.	Adaptace na hypoxii	12
3.2.	Rozdíly v expresi NOS během hypoxie	12
3.3.	Působení NO v buňce	13
3.3.1.	NO – cGMP signální dráha.....	14
3.3.2.	NO a HIF- 1	15
4.	Peroxyinitrit a jeho působení na myokard.....	17
4.1.	Cytotoxické působení	17
4.2.	Buněčná smrt	17
4.2.1.	Apoptóza.....	17
4.2.2.	Nekróza.....	18
4.3.	Protektivní působení	19
5.	Závěr.....	20
6.	Použitá literatura	21

1. Úvod

V současné době patří mezi nejvíce rozšířené a zároveň i nejvíce studované choroby kardiovaskulární onemocnění, která jsou nejčastější příčinou úmrtí. Přitom přibližně polovina těchto úmrtí je způsobena ischemickou chorobou srdeční a její akutní formou, infarktem myokardu.

Již od 50. let minulého století je pozorováno kardioprotektivní působení hypoxie v lidských populacích žijících ve vysokých nadmořských výškách (Hurtado, 1960). Od té doby je hlavní snahou pochopení mechanismů ochraňujících srdce a jejich dalšího využití v klinické praxi. V těchto mechanismech se uplatňují i volné radikály dusíku, zejména oxid dusnatý.

NO byl dlouho považován pouze za látku znečišťující prostředí. Ovšem v roce 1980 byl objeven endoteliální relaxační faktor (EDFR), který byl roku 1987 identifikován jako NO (Ignarro et al., 1987). Zároveň byla prokázána schopnost buněk syntetizovat NO pomocí NO syntas.

Oxid dusnatý získal status nejdůležitější signální molekuly v kardiovaskulárním systému. Tímto objevem bylo zároveň objasněno působení nitroglycerinu, který byl používán jako lék pro úlevu při angíně pectoris, a amylnitritu snižujícího krevní tlak při hypertenzi. Z obou látek je uvolňován oxid dusnatý, který na buňky působí vasodilatačně.

Cílem této práce bylo popsat účinky volných radikálů dusíku na srdce v hypoxii. Tím je myšlena zejména funkce NO a peroxynitritu. Důraz byl zejména kladen na mechanismy, které mají při hypoxii ochrannou funkci. Nemohla jsem ovšem opomenout zmínit ani možnost škodlivých funkcí, jejichž inhibice by mohla být do budoucna také využita pro léčbu různých nejen kardiovaskulárních onemocnění.

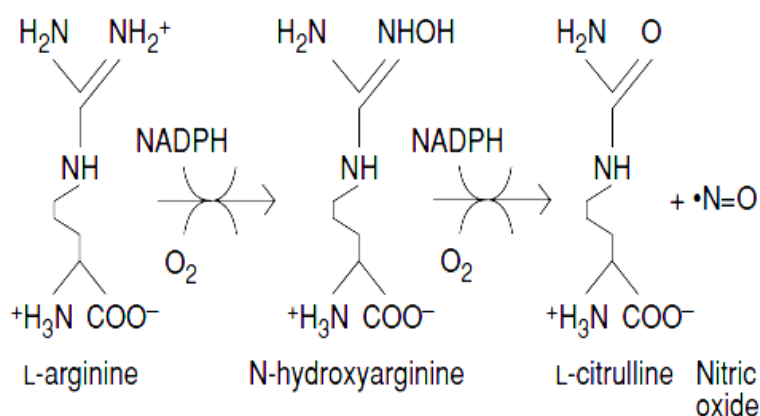
2. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je jednoduchá plynná sloučenina patřící mezi radikály. Má mnoho biologických funkcí nejen v kardiovaskulárním systému. Působí např. vasodilatačně na hladkou svalovinu, má protizánětlivý účinek, je také důležitým neurotransmiterem v nervové soustavě atd. Jelikož má jeden volný elektron, je schopen silné vazby k železu v hemových skupinách. Tato vlastnost je důležitá pro aktivaci guanylát cyklasy a pro ovlivnění mitochondriální respirace vazbou k cytochrom-c oxidase.

Protože je NO malá hydrofobní molekula, může volně procházet přes membrány bez použití kanálů nebo receptorů. Ve vodném prostředí se šíří difuzí, proto je vhodný pro rychlý přenos informací na krátké vzdálenosti. Má velmi krátký biologický poločas (několik sekund), během kterého stačí nastartovat celou řadu fyziologických dějů, ale pouze v několika buňkách nepříliš vzdálených od místa produkce. Při každém střetu NO se superoxidem, dochází ke spontánní tvorbě peroxynitritu. Pokud se se superoxidem nesetká, je oxid dusnatý rychle odstraňován v červených krvinkách reakcí s oxyhemoglobinem, při které vzniká nitrát a methemoglobin: $\text{NO} + \text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{Hb}(\text{Fe}^{3+})$ (Gow et al., 1999; Joshi et al., 2002).

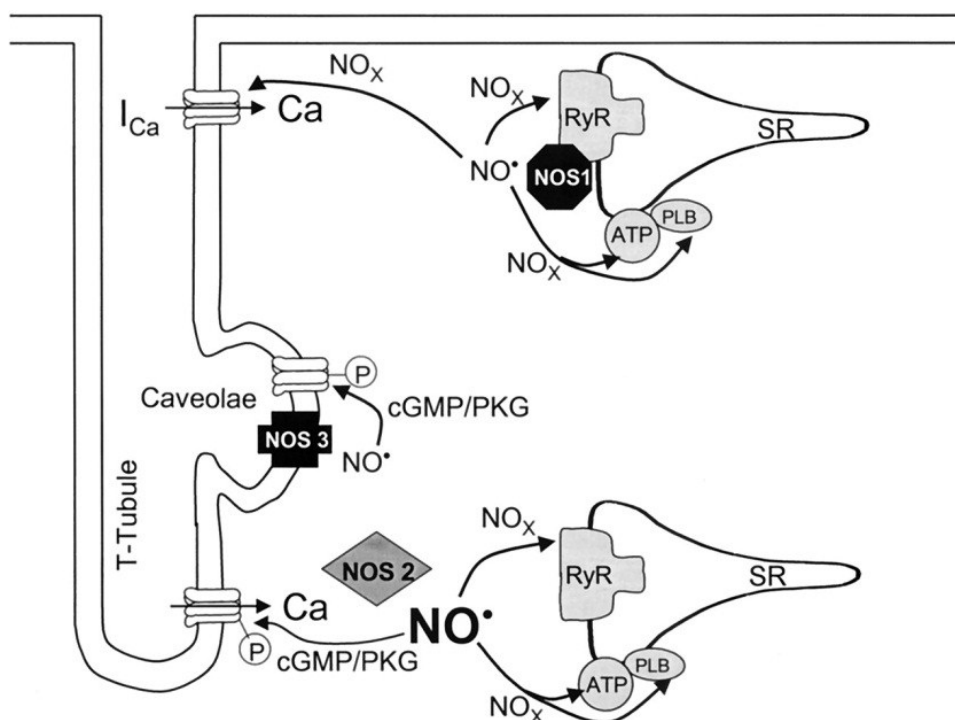
2.1. Vznik NO

Oxid dusnatý je syntetizován štěpením L-argininu na L- citrulin. Tato reakce je katalyzována NO syntasou (NOS). Tato reakce je schematicky znázorněna na následujícím obrázku (Obr. 1).



Obr. 1: Syntéza NO enzymatickou cestou (Singh and Evans, 1997)

Existují tři isoformy tohoto enzymu – neuronální (nNOS), indukibilní (iNOS) a endoteliální (eNOS), a všechny jsou exprimovány také v srdečních buňkách. V buňce jsou lokalizovány podle účinku produkovaného NO (Obr. 2).



Obr. 2: Lokalizace NOS a jejich působení v buňce (Ziolo and Bers, 2003)

2.1.1. Neuronální NOS

Neuronální NOS byla popsána ze všech isoform jako první v roce 1989 (Knowles et al., 1989). Proto se někdy používá také označení NOS1. Byla objevena v předním mozku – odtud název neuronální. Dnes již byla prokázána její exprese např. i v kardiomyocytech nebo kosterních svalech, kde je exprimována dokonce ve větším množství než v mozku (Nakane et al., 1993).

NOS1 je uvnitř buňky lokalizována poblíž sarkoplazmatického retikula (Xu et al., 1999) a působí tak zejména na vápníkové kanály nebo ryanodinový receptor (RyR) (Meszaros et al., 1996), čímž ovlivňuje transport vápníku v buňce.

2.1.2. Inducibilní NOS

Jako druhou se podařilo v roce 1992 naklonovat indukibilní NOS (iNOS, NOS2) v makrofázích (Lyons et al., 1992). Tato NOS není, na rozdíl od zbylých dvou, regulována změnami množství intracelulárního vápníku, ale v mnoha tkáních je indukována cytokiny. Její název je tedy odvozen od její funkce. NOS2 je exprimována pouze během imunitní odpovědi, tedy i během zánětlivých stavů při patofyziologických podmínkách (Balligand et al., 1994).

iNOS není v buňce přímo lokalizována, jedná se tedy o cytosolický protein. Proto také může účinkovat na více mechanismů v buňce. Bylo zjištěno, že účinek NO produkovaného touto syntasou není pouze pozitivní. Jelikož se jedná o vysokovýkonný enzym, který je schopen produkovat tisíc krát více oxidu dusnatého než eNOS(Singh and Evans, 1997), je vyšší pravděpodobnost tvorby peroxynitu.

2.1.3. Endoteliální NOS

Přestože endoteliální NOS (eNOS, NOS3) byla první identifikována jako zdroj oxidu dusnatého, naklonována byla až poslední. eNOS se vyskytuje v blízkosti kaveol, kde interaguje s kaveolinem-3. Produkuje NO, který působí na cGMP a v srdci má negativní ionotropní účinek (Brunner et al., 2001).

2.1.4. Neenzymatické zdroje NO

Zdrojem oxidu dusnatého může být například nitrát, ze kterého se v kyselém prostředí NO uvolňuje. Kyselé prostředí se nachází například v žaludku, kde byl tento efekt v roce 1994 objeven, nebo v ischemické tkáni, kde vlivem anaerobní glykolýzy stoupá poměr kyselých produktů v buňce (Zweier et al., 1999).

Využití takovýchto zdrojů je možné v klinické praxi při léčbě některých kardiovaskulárních onemocněních (např. dříve používaný nitroglycerin), případně při experimentální práci zkoumající mechanismy působení oxidu dusnatého.

3. Role NO během adaptací na hypoxii

Role NO během hypoxie je velmi komplexní a zatím ne zcela známa. Oxid dusnatý má mnoho kardioprotektivních účinků, mezi které patří například snížení množství vápníku v buňce stimulací guanylát cyklasy nebo ovlivnění hypoxií-indukovaného faktoru (HIF-1), které jsou v této práci popsány.

V některých pracích byly popsány i škodlivé účinky NO. Později bylo ovšem zjištěno, že tento jev zřejmě způsobuje peroxynitrit vznikající reakcí NO a O_2^- .

3.1. Hypoxie

Hlavní příčinou hypoxie je disproporce mezi dodávkou kyslíku a množstvím, které srdeční buňka potřebuje. Nejčastější příčinou snížené dodávky kyslíku v srdečním svalu je:

- **ischemická hypoxie**, která je vyvolána redukcí nebo přerušením koronárního krevního toku a většinou je příčinou ischemické choroby srdeční a její akutní formy, infarktu myokardu;
- **hypoxická (systémová) hypoxie**, která je charakterizovaná poklesem parciálního tlaku kyslíku v tepenné krvi a vzniká např. pobytem ve vysokých nadmořských výškách, při některých vrozených vadách a srdečních či plicních onemocněních;
- **anemická hypoxie**, při níž je sice parciální tlak kyslíku v arteriální krvi normální, ale množství hemoglobinu je sníženo;
- **histotoxická hypoxie**, kdy i při přiměřené saturaci a krevním toku dochází k hypoxii v důsledku snížení využití kyslíku uvnitř buňky např. inhibicí oxidativních enzymů při otravě kyanidem.

Existují ovšem dva případy, kdy je systémová hypoxie zcela normální. Jedná se o myokard plodu, který je vystaven hypoxii odpovídající nadmořské výšce 8000 m. Druhým případem jsou lidé žijící trvale ve vysokých nadmořských výškách. Tento jev byl zmíněn již v úvodu.

V literatuře bývají často zaměňovány termíny hypoxie a ischemie, přitom jsou účinky na buněčné úrovni rozdílné. Při ischemii dochází k omezení průtoku krve postiženou částí srdce. To způsobí, že z dané části nemohou být odstraňovány kyselé produkty anaerobního metabolismu a rychle klesá intracellulární pH. Naopak při srdeční hypoxii jsou kyselé

produkty glykolýzy stále odmyvány, tím se zpomaluje vývoj acidózy. Dalším rozdílem je rozsah účinku na srdce. Systémová hypoxie je celkový fenomén zahrnující celý myokard. Ischemie je omezena pouze na oblast zásobovanou postiženou cévou (Ošťádal B, 1999).

3.1.1. Experimentální modely

V laboratořích je hypoxie studována na experimentálních zvířatech umístěných v hypoxických komorách. Snížení obsahu kyslíku můžeme docílit dvěma způsoby.

- částečným odčerpáním vzduchu z komory (hypobarická neboli výšková hypoxie)
- řízenou změnou složení plynů (normobarická hypoxie)

Podle délky vystavení organismů hypoxii můžeme opět rozlišit dva modely akutní – nejčastěji 3, 24 a 72 hodinový, a chronický 3 týdenní s 1 nebo 8 hodinovou reoxygenací.

3.1.2. Adaptace na hypoxii

V dnešní době jsou známy dva typy kardioprotektivních mechanismů. Jedná se o dlouhodobou adaptaci na chronickou hypoxii (CH), která je studována již od pozdních padesátých let, a krátkodobou adaptaci srdce nazývanou ischemický preconditioning (IP). IP byl poprvé popsán v roce 1986 (Murry et al., 1986). I když molekulární mechanismy adaptace na chronickou hypoxii jsou méně známy než u IP, zdá se, že oba jsou částečně ovlivňovány stejnými signálními drahami (Neckar et al., 2002). U CH se navíc vyskytují proteiny pomáhající udržet kyslíkovou homeostázu, např. hypoxií-indukovaný faktor 1 (HIF-1), který bude v následujícím textu také zmíněn.

3.2. Rozdíly v expresi NOS během hypoxie

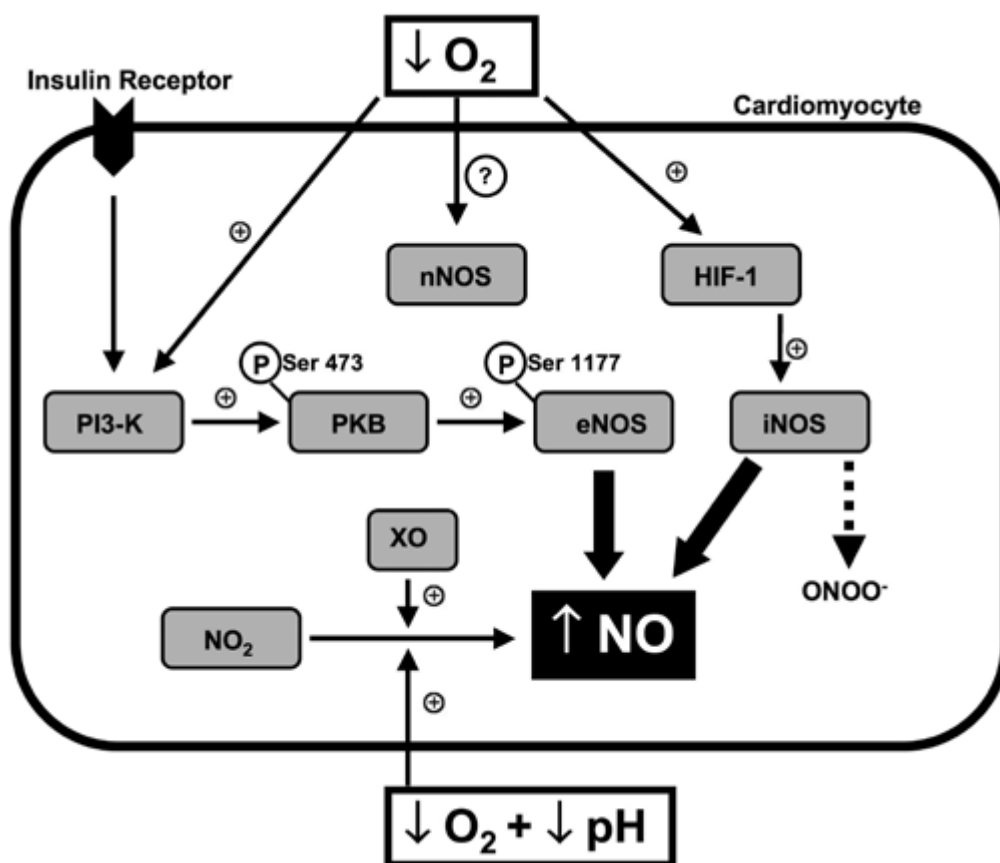
Bylo prokázáno, že během hypoxie stoupá produkce NO. Mnoho studií se zaměřilo na přímé měření rozdílné exprese NO syntasy během hypoxie a ischemie, jejíž mechanismus je v kardiomyocytech pro každou isoformu jiný (Takimoto et al., 2000).

Řada prací se zaměřila na možnou roli iNOS jako zdroje rostoucího množství NO během hypoxie a zejména během ischemického preconditioningu. V kardiomyocytech byla prokázána během hypoxie aktivace genů iNOS prostřednictvím HIF-1 (Jung et al., 2000).

V případě nNOS byl velkým pokrokem její objev v kardiomyocytech. Do té doby se vědci domnívali, že se v srdci vyskytuje pouze v nervových buňkách. Zatím není jasné, zda hypoxie její expresi zvyšuje, nebo snižuje. Ani neznáme mechanismus, kterým by mohla být exprese kontrolována.

Ačkoliv je eNOS hlavním zdrojem NO během fyziologických podmínek, její úloha během hypoxie je zatím stále studována. Aktivace této isoformy probíhá prostřednictvím dráhy zahrnující fosfatidyl-inositol-3 kinasu (PI-3 K) a protein kinasu B (PKB/Akt). eNOS je aktivována prostřednictvím fosforylace serinového zbytku. Tato reakce je katalyzována PKB/Akt, která je aktivována během hypoxie také fosforylací serinového zbytku prostřednictvím PI-3 K (Strijdom et al., 2009b).

Jednotlivé aktivační dráhy NO syntas v kardiomyocytech během sníženého množství kyslíku jsou schematicky znázorněny na obrázku (Obr. 3)



Obr. 3: Mechanismy aktivace NO syntas během hypoxie (Strijdom et al., 2009a)

3.3. Působení NO v buňce

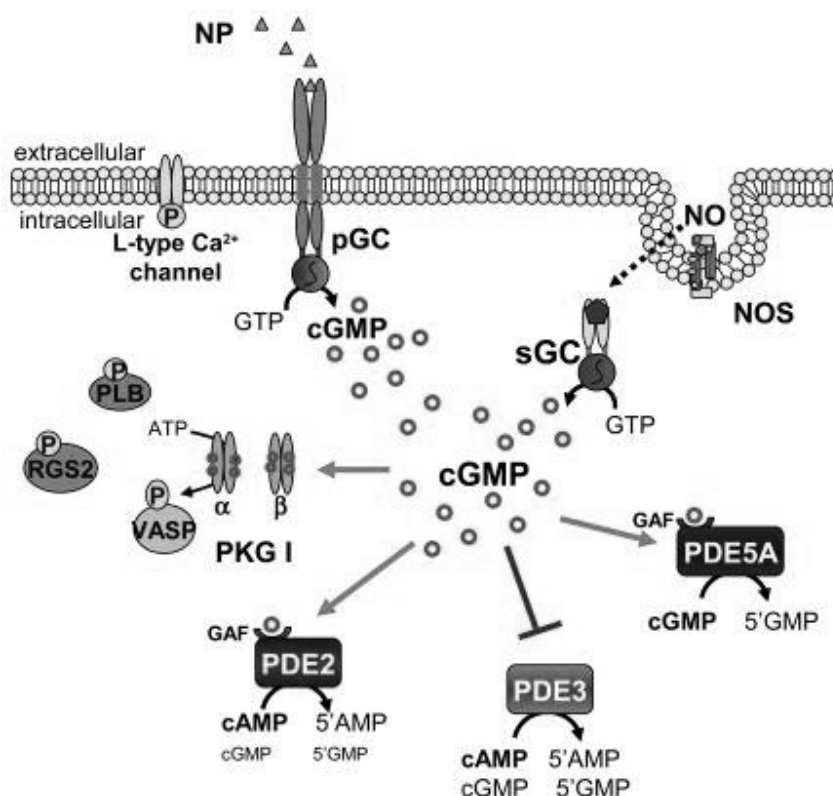
Účinek NO v buňce je možné rozdělit na závislé a nezávislé na cGMP. cGMP závislá dráha je velmi dobře prostudována. Jejím prostřednictvím například dochází k vasodilataci cév, kontraktility srdce, ovládnání množství vápníku v buňce.

cGMP nezávislé působení NO spočívá především v jeho schopnosti vazby k hemovému i nehemovému železu (například vazba na oxyhemoglobin nebo prolyl-hydrogenasu), S-nitrosylace cysteinových zbytků nebo nitrace tyrosinu.

3.3.1. NO – cGMP signální dráha

Tato signální dráha má mnoho různých účinků např. na vazodilataci, agregaci krevních destiček atd. V hypoxii je velmi důležitou funkcí ochrana buňky před nadbytkem Ca^{2+} , kdy působením této dráhy vzrůstá aktivita K_{ATP} kanálů v sarkoplasmatickém retikulu (Baker et al., 1997).

Na začátku této dráhy je guanylát cyklasa aktivována pomocí oxidu dusnatého, která katalyzuje tvorbu cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) z GTP. Guanylát cyklasa je heterodimer složený ze dvou podjednotek (Kamisaki et al., 1986). Na jednu z podjednotek je navázán protoporphyrin-IX. Již v úvodu byla zmíněna specifická vlastnost NO vázat se na hemové skupiny. NO má schopnost aktivovat tento enzym již při velmi malých nanomolárních koncentracích. cGMP se po té váže na cGMP-dependentní protein kinasu (PKG), čímž aktivuje následující signální dráhy a současně aktivuje cGMP-dependentní fosfodiesterasy 2 a 3 (PDE), které cGMP inaktivují na guanosin - 5'- monofosfát (GMP). Aktivovaná PKG inaktivuje vápenaté iontové kanály fosforylací na sarkoplasmatickém retikulu a tím snižuje intracelulární koncentraci Ca^{2+} . PKG dále přispívá k vazodilataci tím, že snižuje senzitivitu troponinu C k Ca^{2+} (Rastaldo et al., 2007). Tyto molekuly ovlivňují kontraktilitu srdce a působí jako modulátory cévního tonu.



Obr. 4: NO- cGMP signální dráha (Tsai and Kass, 2009)

3.3.2. NO a HIF- 1

V této části práce je zmíněno, jakým způsobem spolu interagují NO a hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF-1). V tomto případě se jedná zejména o mechanismy nezávislé na cGMP.

3.3.2.1. HIF-1

Snížení obsahu kyslíku v tkáních vyvolává adaptivní změny v genové expresi. Udržení kyslíkové homeostaze je podstatné pro přežití organismu. V roce 1992 byl objeven hypoxií indukovaný faktor 1 v souvislosti s aktivací genu pro erytropoetin (EPO) během hypoxie (Semenza and Wang, 1992). Následně roku 1995 byla stejnou skupinou vědců popsána jeho struktura (Wang and Semenza, 1995). HIF-1 je heterodimer složený z jedné ze tří α podjednotek (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) a jedné podjednotky β , která je nazývána také jako ARNT (arylhydrocarbon receptor nuclear translocator).

Délka života α podjednotky je závislá na pO₂. Pokud je v buňce dostatečné množství kyslíku, podléhá tato podjednotka hydroxylaci specifickou prolyl-hydroxylasou (PHD). Po hydroxylaci se na ni naváže pVHL (von Hippeln-Lindau protein). Tato vazba umožňuje polyubigitinylaci a následnou degradaci v proteasomu (Kallio et al., 1999). Z tohoto důvodu se během normoxie α podjednotka vyskytuje v buňce ve velmi nízkých, často nedetekovatelných koncentracích.

Během hypoxie se z podjednotek α a β vytvoří komplex, který je translokován do jádra a váže se na DNA k HRE (hypoxia- responsive element). Touto vazbou dochází k aktivaci více než 50 genů důležitých pro funkci buňky v hypoxii. Jsou to například geny zvyšující počet červených krvinek (erytropoetin), ovlivňující vazodilataci cév (vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), iNOS) nebo zajišťující přepnutí oxidativní fosforylace na anaerobní glykolýzu.

3.3.2.2. Vliv NO na stabilitu HIF-1

K akumulaci HIF-1 může docházet i pokud je v buňce kyslíku dostatek. Děje se tak působením různých růstových faktorů, hormonů, cytokinů (Hellwig-Bürgel et al., 1999) a také oxidu dusnatého (Palmer et al., 2000).

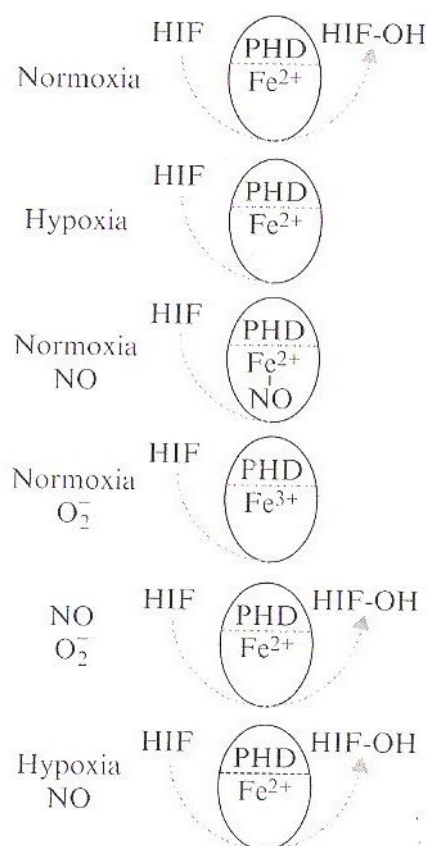
Snaha o poznání mechanismu, kterým NO působí na stabilizaci HIF-1 α , odhalila sníženou ubiquitinaci proteinu a zrušení jeho vazby k pVHL. Z této skutečnosti vyplývá, že NO oslabuje aktivitu PHD a tím inhibuje hydroxylaci HIF-1 α . Mechanismus této reakce nejspíš spočívá ve schopnosti NO vázat se k hemovým i nehemovým železnatým iontům

v proteinech. Nehemové Fe^{2+} obsahuje i PHD. O toto místo za normoxických podmínek soutěží NO s O_2 . Po jeho obsazení oxidem dusnatým dochází k inhibici enzymu.

Dalšími molekulami, které mají stabilizační funkci během normoxie, jsou reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS působí také na PHD, tím že oxiduje Fe^{2+} na Fe^{3+} (Köhl et al., 2006). Působení NO a ROS se navzájem vylučují. Pokud jsou v buňce přítomny ve stejné koncentraci, zůstává PHD aktivní. Proto k dosažení odpovědi stejné jako v přítomnosti pouze NO, musí být množství NO v buňce výrazně větší než množství ROS (totéž platí i naopak pro ROS).

Během hypoxie naopak NO funkci HIF-1 inhibuje (Sogawa et al., 1998). Jelikož HIF-1 ovlivňuje expresi iNOS, NO touto interakcí reguluje také své množství v buňce. Významnou roli zde nejspíš hraje opět PHD, která je za těchto podmínek aktivována. Přesný mechanismus není zatím bohužel znám.

Působení NO a superoxidu na PHD během normoxie a hypoxie je shrnuto na následujícím obrázku (Obr. 5)



Obr. 5: Regulace aktivity PHD (Brune and Zhou, 2007)

4. Peroxynitrit a jeho působení na myokard

V některých studiích byl sledován škodlivý vliv oxidu dusnatého během hypoxie. Dnes již víme, že mnoho pozorovaných cytotoxických efektů nezpůsobuje přímo NO, ale molekula tvořící se jeho reakcí se superoxidem- peroxynitrit. Během normálních fyziologických podmínek, kdy se NO vyskytuje v buňce ve velmi nízkých koncentracích (přibližně 10nM), je superoxid přeměněn na méně toxický peroxid vodíku. Tato reakce je katalyzována superoxid dismutasou (SOD). Jakmile koncentrace NO vzroste (více než 1μM), např. během hypoxie, tvorba ONOO⁻ převládne nad dismutací pomocí SOD (Hogg et al., 1992).

4.1. Cytotoxické působení

Peroxynitrit způsobuje snížení kontraktilní funkce kardiomyocytů a nevratné poškození dýchacího řetězce (Xie et al., 1998). Tento efekt je dán jeho schopností měnit proteinovou strukturu reakcí s aminokyselinami v peptidových řetězcích, nejčastěji oxidací cysteinu a nitrací tyrosinu, a s kovovými centry enzymů (například železo- sirmé jádro akonitasy). Peroxynitrit takto působí například na komplexy dýchacího řetězce (NADH dehydrogenasu, sukcinát dehydrogenasu, cytochrom c reduktasu a ATP syntasu) a kreatin kinasu, která je důležitým enzymem pro srdeční kontrakci. Cytochrom-c oxidasa, která je inhibována NO, je proti účinkům ONOO⁻ odolná (Pearce et al., 2002).

4.2. Buněčná smrt

4.2.1. Apoptóza

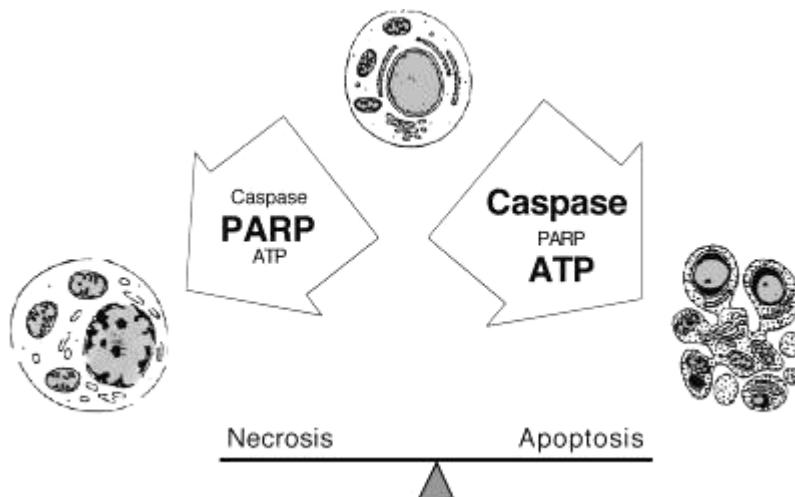
Cytotoxické účinky peroxynitritu vedou následně až k programované buněčné smrti, apoptóze. Apoptóza je v buňce spouštěna celou řadou signalizačních kaskád. V jedné z nich hraje důležitou úlohu i cytochrom c, který je uvolňován z mitochondrií otevřením mitochondriálních kanálů PTP (permeability transition pores). Aktivita PTP je ovlivňována proteiny z rodiny Bcl-2 (Marchetti et al., 1996; Tsujimoto and Shimizu, 2000). Vliv na tyto kanály má také peroxynitrit, jehož účinek reguluje hladina vápníku v buňce a SOD (Brookes and Darley-Usmar, 2004).

4.2.2. Nekróza

Pokud buňku vystavíme vysoké koncentraci oxidantů, dochází k patologické buněčné smrti- nekróze. Hlavním mechanismem vzniku nekrózy je poškození DNA a následná aktivace PARP-1 (poly-(ADP-ribosylating) enzyme), která toto poškození opraví. PARP-1 opravuje poškození způsobená zlomem DNA, jehož příčinou může být například působení silných oxidantů, mezi které patří i peroxynitrit a superoxid, nebo volné radikály. Po tom co se PARP-1 naváže na zlomenou DNA, spojí ji opět pomocí ADP-ribosy, jehož donorem je nicotinamid adenin dinukleotid (NAD^+). Avšak pokud je zlomů hodně, dochází v buňce k vyčerpání zásob NAD^+ , který je významným kofaktorem pro mnoho dalších reakcí, zejména respiračního cyklu (Schraufstatter et al., 1986). Tím postupně dochází k vyčerpání zásob ATP a celkovému selhání buněčných funkcí. Při nekróze nakonec dojde k narušení plasmatické membrány, které je následováno vylitím buněčného obsahu do extracelulární matrix. Tím je nekrotický účinek přenášen i na okolní buňky.

V buňce existuje mechanismus, který je schopen dalšímu rozšíření zabránit. PARP-1 může být inaktivována prostřednictvím kaspasy-3 a -7. Tyto enzymy rozštěpí PARP-1 na menší fragmenty. Po inaktivaci PARP-1 následují kroky vedoucí k apoptóze. Tato reakce je tedy prevencí před ztrátou ATP, které je potřeba pro řízení apoptózy (Los et al., 2002).

Na následujícím obrázku je schematicky znázorněna závislost působení kaspasy, ATP, PARP na typu buněčné smrti (Obr. 6)



Obr. 6: Schematické znázornění vliv kaspasy, ATP a PARP na vznik nekrózy případně apoptózy (Los et al., 2002).

4.3. Protektivní působení

Otázkou zůstává, zda je vliv peroxynitritu pouze škodlivý. V roce 1997 byly provedeny pokusy, při kterých bylo zjištěno, že jeho působení může být naopak cytoprotektivní. Byla demonstrována jeho schopnost inhibovat adhezi leukocytů na vaskulární endotel. Zároveň peroxynitrit redukuje srdeční dysfunkce způsobené neutrofily při hypoxických stavech u potkanů (Lefter et al., 1997). V další práci opět z roku 1997 se dokonce objevila jeho schopnost redukovat velikost infarktu myokardu a chránit koronární endotel tentokrát u koček (Nossuli et al., 1997).

Jedním ze závěrů vyplývajících z těchto posledních dvou prací je závislost koncentrace podávaného peroxynitritu na jeho dalším působení. Ve všech studiích prokazujících jeho cytotoxické vlivy byly podávané koncentrace peroxynitritu řádově mikromolární případně i milimolární. Pokud ovšem použijeme koncentrace pouze nanomolární, jsou jeho účinky zpravidla protektivní.

5. Závěr

Oxid dusnatý se účastní mnoha rozmanitých reakcí, které ovlivňují fyziologické i patofyziologické děje. O jeho působení během hypoxie bylo napsáno mnoho protichůdných prací, ve kterých bylo zaznamenáno jak kardioprotektivní tak i škodlivé působení NO. Postupem času bylo zjištěno, že příčinou těchto škodlivých efektů není přímo NO, ale látky z něho odvozené, zejména peroxynitrit.

Mezi protektivní účinky NO v srdci patří zejména vzrůst tolerance k ischemii, snížení apoptózy a nekrózy, zlepšení kontraktilní funkce a relaxace kardiomyocytů atd. Nezanedbatelný je také efekt na HIF-1, který je významným transkripčním faktorem genů důležitých pro buněčnou funkci během hypoxie. Oxid dusnatý za normoxických podmínek HIF-1 aktivuje a naopak během hypoxie inhibuje.

Vzhledem k dosud zjištěným skutečnostem NO v sobě skýtá velký potenciál. Pokud by se nám podařilo lépe porozumět mechanismům, kterými ovlivňuje buněčné pochody zejména v souvislosti s hypoxií, mohl by být využit pro prevenci a léčbu nejen ischemické choroby srdeční.

6. Použitá literatura

- Baker, J. E., B. D. Curry, G. N. Olinger, and G. J. Gross, 1997, Increased tolerance of the chronically hypoxic immature heart to ischemia. Contribution of the KATP channel: *Circulation*, v. 95, p. 1278-85.
- Balligand, J. L., D. Ungureanu-longrois, W. W. Simmons, D. Pimental, T. A. Malinski, M. Kapturczak, Z. Taha, C. J. Lowenstein, A. J. Davidoff, R. A. Kelly, T. W. Smith, and T. Michel, 1994, CYTOKINE-INDUCIBLE NITRIC-OXIDE SYNTHASE (INOS) EXPRESSION IN CARDIAC MYOCYTES - CHARACTERIZATION AND REGULATION OF INOS EXPRESSION AND DETECTION OF INOS ACTIVITY IN SINGLE CARDIAC MYOCYTES IN-VITRO: *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 27580-27588.
- Brookes, P. S., and V. M. Darley-Usmar, 2004, Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 286, p. H39-46.
- Brune, B., and J. Zhou, 2007, Hypoxia-inducible factor-1 alpha under the control of nitric oxide, *Oxygen Biology and Hypoxia: Methods in Enzymology*, v. 435: San Diego, Elsevier Academic Press Inc, p. 463-478.
- Brunner, F., P. Andrew, G. Wolkart, R. Zechner, and B. Mayer, 2001, Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase: *Circulation*, v. 104, p. 3097-102.
- Gow, A. J., B. P. Luchsinger, J. R. Pawloski, D. J. Singel, and J. S. Stamler, 1999, The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 9027-32.
- Hellwig-Bürgel, T., K. Rutkowski, E. Metzen, J. Fandrey, and W. Jelkmann, 1999, Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1.: *Blood*, v. 94, p. 1561-7.
- Hogg, N., V. M. Darley-Usmar, M. T. Wilson, and S. Moncada, 1992, Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide: *Biochem J*, v. 281 (Pt 2), p. 419-24.
- Hurtado, A., 1960, SOME CLINICAL ASPECTS OF LIFE AT HIGH ALTITUDES: *Annals of Internal Medicine*, v. 53, p. 247-258.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri, 1987, ENDOTHELIUM-DERIVED RELAXING FACTOR PRODUCED AND RELEASED FROM ARTERY AND VEIN IS NITRIC-OXIDE: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, p. 9265-9269.
- Joshi, M. S., T. B. Ferguson, T. H. Han, D. R. Hyde, J. C. Liao, T. Rassaf, N. Bryan, M. Feelisch, and J. R. Lancaster, 2002, Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 10341-10346.
- Jung, F., L. Palmer, N. Zhou, and R. Johns, 2000, Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes.: *Circ Res*, v. 86, p. 319-25.
- Kallio, P. J., W. J. Wilson, S. O'Brien, Y. Makino, and L. Poellinger, 1999, Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway: *J Biol Chem*, v. 274, p. 6519-25.

- Kamisaki, Y., S. Saheki, M. Nakane, J. A. Palmieri, T. Kuno, B. Y. Chang, S. A. Waldman, and F. Murad, 1986, Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer: *J Biol Chem*, v. 261, p. 7236-41.
- Knowles, R. G., M. Palacios, R. M. J. Palmer, and S. Moncada, 1989, FORMATION OF NITRIC-OXIDE FROM L-ARGININE IN THE CENTRAL NERVOUS-SYSTEM - A TRANSDUCTION MECHANISM FOR STIMULATION OF THE SOLUBLE GUANYLATE-CYCLASE: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, p. 5159-5162.
- Köhl, R., J. Zhou, and B. Brüne, 2006, Reactive oxygen species attenuate nitric-oxide-mediated hypoxia-inducible factor-1 α stabilization.: *Free Radic Biol Med*, v. 40, p. 1430-42.
- Lefer, D. J., R. Scalia, B. Campbell, T. Nossuli, R. Hayward, M. Salamon, J. Grayson, and A. M. Lefer, 1997, Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats: *J Clin Invest*, v. 99, p. 684-91.
- Los, M., M. Mozoluk, D. Ferrari, A. Stepczynska, C. Stroh, A. Renz, Z. Herceg, Z. Q. Wang, and K. Schulze-Osthoff, 2002, Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling: *Mol Biol Cell*, v. 13, p. 978-88.
- Lyons, C. R., G. J. Orloff, and J. M. Cunningham, 1992, MOLECULAR-CLONING AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF AN INDUCIBLE NITRIC-OXIDE SYNTHASE FROM A MURINE MACROPHAGE CELL-LINE: *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 6370-6374.
- Marchetti, P., M. Castedo, S. A. Susin, N. Zamzami, T. Hirsch, A. Macho, A. Haeffner, F. Hirsch, M. Geuskens, and G. Kroemer, 1996, Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis: *J Exp Med*, v. 184, p. 1155-60.
- Meszáros, L. G., I. Minarovic, and A. Zahradnikova, 1996, Inhibition of the skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide: *Febs Letters*, v. 380, p. 49-52.
- Murry, C. E., R. B. Jennings, and K. A. Reimer, 1986, Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium: *Circulation*, v. 74, p. 1124-36.
- Nakane, M., H. Schmidt, J. S. Pollock, U. Forstermann, and F. Murad, 1993, CLONED HUMAN BRAIN NITRIC-OXIDE SYNTHASE IS HIGHLY EXPRESSED IN SKELETAL-MUSCLE: *Febs Letters*, v. 316, p. 175-180.
- Neckar, J., F. Papousek, O. Novakova, B. Ost'adal, and F. Kolar, 2002, Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive: *Basic Res Cardiol*, v. 97, p. 161-7.
- Nossuli, T. O., R. Hayward, R. Scalia, and A. M. Lefer, 1997, Peroxynitrite reduces myocardial infarct size and preserves coronary endothelium after ischemia and reperfusion in cats: *Circulation*, v. 96, p. 2317-24.
- Ošťádal B, K. F., 1999, *Cardiac Ischemia: From Injury to Protection*, Norwell, Kluwer academic publishers.
- Palmer, L., B. Gaston, and R. Johns, 2000, Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides.: *Mol Pharmacol*, v. 58, p. 1197-203.
- Pearce, L., A. Kanai, L. Birder, B. Pitt, and J. Peterson, 2002, The catabolic fate of nitric oxide: the nitric oxide oxidase and peroxynitrite reductase activities of cytochrome oxidase.: *J Biol Chem*, v. 277, p. 13556-62.
- Rastaldo, R., P. Pagliaro, S. Cappello, C. Penna, D. Mancardi, N. Westerhof, and G. Losano, 2007, Nitric oxide and cardiac function: *Life Sci*, v. 81, p. 779-93.

- Schraufstatter, I. U., D. B. Hinshaw, P. A. Hyslop, R. G. Spragg, and C. G. Cochrane, 1986, OXIDANT INJURY OF CELLS - DNA STRAND-BREAKS ACTIVATE POLYADENOSINE DIPHOSPHATE-RIBOSE POLYMERASE AND LEAD TO DEPLETION OF NICOTINAMIDE ADENINE-DINUCLEOTIDE: *Journal of Clinical Investigation*, v. 77, p. 1312-1320.
- Semenza, G. L., and G. L. Wang, 1992, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation: *Mol Cell Biol*, v. 12, p. 5447-54.
- Singh, S., and T. W. Evans, 1997, Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction?: *Eur Respir J*, v. 10, p. 699-707.
- Sogawa, K., K. Numayama-Tsuruta, M. Ema, M. Abe, H. Abe, and Y. Fujii-Kuriyama, 1998, Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 7368-7373.
- Strijdom, H., N. Chamane, and A. Lochner, 2009a, Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions: *Cardiovascular Journal of Africa*, v. 20, p. 303-310.
- Strijdom, H., S. Friedrich, S. Hattingh, N. Chamane, and A. Lochner, 2009b, Hypoxia-induced regulation of nitric oxide synthase in cardiac endothelial cells and myocytes and the role of the PI3-K/PKB pathway.: *Mol Cell Biochem*, v. 321, p. 23-35.
- Takimoto, Y., T. Aoyama, R. Keyamura, E. Shinoda, R. Hattori, Y. Yui, and S. Sasayama, 2000, Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat.: *Int J Cardiol*, v. 76, p. 135-45.
- Tsai, E. J., and D. A. Kass, 2009, Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics: *Pharmacol Ther*, v. 122, p. 216-38.
- Tsujimoto, Y., and S. Shimizu, 2000, VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins: *Cell Death Differ*, v. 7, p. 1174-81.
- Wang, G. L., and G. L. Semenza, 1995, Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1: *J Biol Chem*, v. 270, p. 1230-7.
- Xie, Y., P. Kaminski, and M. Wolin, 1998, Inhibition of rat cardiac muscle contraction and mitochondrial respiration by endogenous peroxynitrite formation during posthypoxic reoxygenation.: *Circ Res*, v. 82, p. 891-7.
- Xu, K. Y., D. L. Huso, T. M. Dawson, D. S. Brecht, and L. C. Becker, 1999, Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 657-662.
- Ziolo, M., and D. Bers, 2003, The real estate of NOS signaling: location, location, location.: *Circ Res*, v. 92, p. 1279-81.
- Zweier, J. L., A. Samouilov, and P. Kuppusamy, 1999, Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems: *Biochim Biophys Acta*, v. 1411, p. 250-62.