

CHEMICKÉ VLASTNOSTI, BIOLOGICKÉ ÚČINKY A METODY DETEKCE BIOLOGICKÉHO OXIDU DUSNATÉHO

ZDEŇKA KUPKOVÁ a LUDĚK BENEŠ

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,
Palackého 1-3, 612 42 Brno
kupkova@vfu.cz

Došlo 17.12.02, přepracováno 12.5.03, přijato 30.12.03.

Klíčová slova: oxid dusnatý, detekce, NO-syntasa

Obsah

1. Úvod
2. Chemické vlastnosti a reakce oxidu dusnatého
3. Biosyntéza oxidu dusnatého
4. Biologické účinky oxidu dusnatého
 - 4.1. Fyziologická funkce NO
 - 4.2. Patofyziologická funkce NO
5. Analýza oxidu dusnatého a jeho metabolitů
 - 5.1. Přímá stanovení
 - 5.1.1. Chemiluminiscence
 - 5.1.2. Elektrochemická (amperometrická) detekce
 - 5.1.3. Elektronová spinová (paramagnetická) rezonance ESR (EPR)
 - 5.2. Nepřímá stanovení
 - 5.2.1. Griessova metoda
 - 5.2.2. Oxidace hemoglobinu
 - 5.2.3. Fluorescenční detekce
 - 5.2.4. Chemiluminiscenční reakce NO s luminolem
 - 5.2.5. Přeměna argininu na citrulin
 - 5.2.6. Analýza dusitanů a dusičnanů metodou HPLC
 - 5.2.7. Ostatní metody
6. Závěr

1. Úvod

V roce 1980 objevil a popsal Robert Furchgott biologický účinek endoteliálního relaxačního faktoru (EDRF). V roce 1987 bylo zjištěno, že EDRF je identický s oxidem dusnatým¹. Jeho biochemickou tvorbu objasnil Moncada v r. 1989. Oxid dusnatý se stal jednou z nejsledovanějších molekul posledních 10 let. Roku 1992 časopis *Science* vyhlásil oxid dusnatý molekulou roku, v roce 1998 Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro a Ferid Murad získali Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství „za klíčové objevy týkající se NO jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému“ (cit.²).

Oxid dusnatý působí jako mediátor v imunitním systému, uplatňuje se ve vazomotorice i při neurotransmisí³⁻⁵. Nejvýznamnější odlišností NO od jiných mediátorů

je jeho schopnost difundovat volně a rychle přes membrány, tzn. působit na okolní buněčné elementy bez ohledu na anatomické spojení.

Intenzivní studium oxidu dusnatého a jeho metabolitů dalo vzniknout novému termínu: „reaktivní formy dusíku“ (reactive nitrogen species, RNS), což jsou sloučeniny primárně odvozené od oxidu dusnatého⁶.

2. Chemické vlastnosti a reakce oxidu dusnatého

Oxid dusnatý je v atmosférických podmínkách dráždivým plynem, který přispívá k znečišťování ovzduší. Za standardních podmínek je koncentrace oxidu dusnatého v nasyceném vodném roztoku asi 2 mM (cit.⁷).

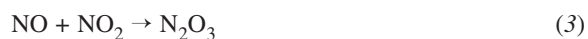
Je relativně stabilním radikálem s 15 elektrony (jeden je nepárový), a proto bývá označován též NO[•]. Odstraněním antivazebného elektronu z NO vzniká nitrosoniový ion NO⁺. Redukcí NO (přidáním elektronu) vzniká nitroxylový ion NO⁻.

S kyslíkem reaguje NO podle rov. (1) za vzniku oxidu dusičitého NO₂, což je hnědý jedovatý plyn, rovněž radikál. Reakce je 1. řádu vzhledem ke kyslíku a 2. řádu vzhledem k NO. Poločas této reakce není konstantní, ale závisí na počáteční koncentraci (2). Čím je koncentrace NO vyšší, tím rychleji reakce s kyslíkem probíhá⁸.

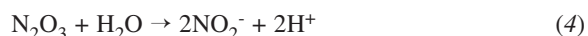


Oxid dusičitý může dimerizovat v bezbarvou formu (N₂O₄ – dimer NO₂), která už nemá charakter radikálu. Vyskytuje se především v atmosféře jako polutant⁸. Při vystavení vyšším dávkám oxidu dusičitého (nebo jeho dimeru) dochází k poškození epitelálních buněk dýchacích cest, včetně fibrózy, která může být smrtelná⁹.

Oxid dusičitý jako oxidační činidlo reaguje s nenasycenými mastnými kyselinami za vzniku allylového radikálu a kyseliny dusité, jakožto možného zdroje karcinogenních nitrosaminů. Patologické následky má i nitrace tyrosinu v proteinech způsobená NO₂, která vede k destrukci tkání⁸. Reakcí (3) oxidu dusičitého s oxidem dusnatým vzniká oxid dusitý, který je vlastním nitrosylačním činidlem. Jeho tvorba je usnadněna v hydrofobním prostředí proteinů micelární katalýzou¹⁰.

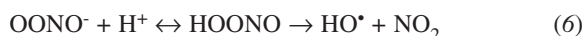


Hlavním rozkladným produktem vodného roztoku oxidu dusnatého jsou dusitany, které se v přítomnosti hemoproteinů oxidují až na dusičnany (4).



Rychlost autooxidace závisí na koncentraci NO a kyslíku⁷. Oxid dusnatý nereaguje v anaerobních podmínkách. Ve tkáních reaguje kyslík s oxidem dusnatým v hydrofobním prostředí membrán, reakce zde probíhá 300× rychleji než ve vodě¹¹.

Patologicky významná je reakce NO se superoxidem ($O_2^{\bullet -}$), při níž vzniká toxický peroxodusan ($OONO^-$)^{12,13} (5). Za fyziologického pH existuje v protonované formě jako kyselina peroxydusitá, která se rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý (6).



Toxicita peroxodusitanu pramení z oxidace SH skupin bílkovin, atomů železa a síry v biologických molekulách a z peroxidace lipidů. Může indukovat poškození DNA a apoptózu⁶.

In vivo se oxid dusnatý v přítomnosti akceptorů elektronů (přechodné kovy, NO_2) snadno slučuje s fenoly, thioley a se sekundárními aminy. Reaguje jako elektrofilní nebo jako oxidační činidlo. Reakcí se železem v erytrocytech vzniká methemoglobin, vazbou na železo enzymu guanylátcyklyazy stimuluje syntézu cyklického guanosinmonofosfátu vedoucího k vazodilataci¹⁴.

Nitrosylace¹⁵ je jednou z rozšířených modifikací bílkovin, vyskytující se za fyziologických i patologických podmínek. Nitrosylačním činidlem je oxid dusitý. S-Nitrosylsloučeniny mohou sloužit jako zdroj oxidu dusnatého.

3. Biosyntéza oxidu dusnatého

Oxid dusnatý vzniká¹⁶⁻¹⁸ oxidací guanidinového dusíku aminokyseliny L-argininu působením NO-syntasy za vzniku L-citrulinu. NO-syntasa (NOS) byla izolována v několika formách, které se mezi sebou liší subcelulární lokalizací, kinetikou, způsobem aktivace, a tedy i funkcí. Konstitutivní (stále přítomné – cNOS) se nachází v buňkách endotelu a v neuronech. Aktivují se vazbou vápenatých iontů na kalmodulin. Další dvě jsou induktivní (iNOS) a jsou obsaženy v makrofázích, hepatocytech, srdečních myocytech a dalších buňkách. Aktivují se jen po stimulaci těchto buněk. Všechny isoenzymy NOS obsahují hemové železo (protoporfyrin IX), flavinmononukleotid (FMN), flavinadeninindinukleotid (FAD), jako kofaktor potřebují nikotinamidadeninindinukleotidfosfát (NADPH) a tetrahydrobiopterin. Katalyticky účinné jsou jen ve formě dimerů a jsou stereospecifické.

NO-syntasy se též klasifikují podle svého zdroje na endotelovou (eNOS), neuronovou (nNOS) a makrofágovou nebo-li indukibilní NO-syntasu (iNOS).

4. Biologické účinky oxidu dusnatého

NO je buněčný posel, který difuzí ovlivňuje fyziologicky i patofyziologicky různé typy savčích buněk.

4.1. Fyziologická funkce NO

Oxid dusnatý stimuluje aktivitu solubilní guanylátcyklyazy, a tím reguluje syntézu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), který vyvolává prostřednictvím cGMP-dependentní proteinkinasy vazodilataci¹⁹. V imunitním systému se účastní nespecifické obrany organismu hlavně proti prvokům, některým bakteriím, virům a nádorům, zasahuje do procesu fagocytózy a zánětu. Také indukuje tvorbu interferonu γ , který působí antivirově²⁰.

V kardiiovaskulárním systému se oxid dusnatý podílí na udržování tonu cév a krevního tlaku, inhibuje adhezi i agregaci trombocytů, tlumí aktivaci leukocytů a má antiproliferační účinek²¹.

V centrálním nervovém systému působí jako buněčný posel. Hraje roli při morfogenezi mozku, reguluje tvorbu synapsí, výbojovou aktivitu neuronů, výdej neurotransmiterů. NO je považován za jeden z mediátorů bolesti, může hrát určitou roli při vzniku morfinové tolerance i při závislosti na kokainu a alkoholu²².

Oxid dusnatý inhibuje apoptózu (geneticky programovaná smrt buněk) tím, že inhibuje (prostřednictvím cGMP a G-kinasy) apoptické fosforylační signály. Současně přímo inhibuje kaspasy (specifické proteasy, které obsahují v aktivním místě cystein, s možností S-nitrosylace oxidem dusnatým)²³.

Oxid dusnatý relaxuje střešní hladkou svalovinu včetně svěračů, prostřednictvím vazodilatace způsobuje erekci. Selektivním inhibitorem enzymu rozkládajícího cGMP (fosfodiesterasa typu 5) v corpus cavernosum je sildenafilcitrát (ViagraR), léčivo používané k terapii erektilní dysfunkce²⁴.

Oxid dusnatý významně ovlivňuje renální hemodynamiku a tubulární funkce. Zvýšená produkce NO v glomerulech infiltrovaných leukocyty přispívá k udržení perfuze glomerulů a k inhibici trombózy²⁵.

Oxid dusnatý má klíčový význam pro obranné schopnosti mukózní vrstvy gastrointestinálního traktu. Má ochranný vliv na mukózu žaludku, napodobuje některé funkce prostaglandinů²⁶.

Inhalace NO jako selektivního plicního vazodilatancia je úspěšně používána pro léčbu akutních i subakutních plicních hypertenzních stavů²⁷.

4.2. Patofyziologická funkce NO

Oxid dusnatý se účastní septického šoku²⁸, může být klíčovou molekulou při migréně i jiných vaskulárně podmíněných bolestech hlavy²².

Snížená koncentrace NO je jedním z faktorů hypertenze a erektilní dysfunkce²⁴.

Inhibitory indukibilní NOS mají pozitivní vliv u artritíd, zánětů²⁹, bronchiálního astmatu. Pravidelné měření exhalovaného NO je novou neinvazivní metodou umožňující kontrolu astmatu. Bylo potvrzeno, že hladina vydechaného NO je jedním z markerů stavu zánětu dýchacích cest³⁰.

Je pravděpodobný vliv NO při rozvoji Alzheimerovy choroby a epilepsie, kdy přemíra NO má neurotoxické účinky vyvolané hlavně jeho reakcí se superoxidem³¹.

Vliv oxidu dusnatého se uplatňuje i u očních chorob, kde se patologicky projevuje nejen jeho snížená, ale i zvýšená produkce (hlavně tvorba dalších RNS, cit.³²).

Autooxidací NO vzniklá nitrosylační činidla mohou poškozovat deaminací báze DNA a tak vyvolat mutace³³.

Existuje i vztah mezi diabetem a volnými radikály. U nemocných s diabetem 1. typu (insulindependentní diabetes mellitus) jsou β -buňky Langerhansových ostrůvků ničeny autoimunitní reakcí, způsobenou antigen-specifickými protilátkami a reaktivními formami kyslíku a dusíku – hlavně peroxodusitanem³⁴.

Oxid dusnatý je zapojen i v onemocněních gastrointestinálního traktu, jako je porucha motility (NO je extrémně důležitý u regulace průchodu tráveniny nebo pro tonus svěračů), vředová choroba. Jeho nadměrná tvorba je spojena se zánětlivým onemocněním střev (kolitidou)³⁵.

5. Analýza oxidu dusnatého a jeho metabolitů

Oxid dusnatý je *in vivo* tvořen v malém množství a rychle reaguje s kyslíkem, thioly, hemoglobinem a jinými látkami. Proto je jeho existence velice krátká (3–5 s). Stanovit ho lze přímo nebo nepřímo z jeho produktů.

5.1. Přímá stanovení

5.1.1. Chemiluminiscence

Luminiscenční analýza je založena na měření luminiscenčního záření, které zkoumaný vzorek emituje. Luminiscencí rozumíme vlastní záření látky ve viditelné oblasti spektra nebo blízko ní, které zpravidla vzniká po nebo při ozáření této látky. Luminiscenční záření není tepelným zářením, má jinou vlnovou délku než záření primární a trvá i po přerušení primárního záření. Zdrojem excitace u chemiluminiscence je energie chemické reakce³⁶.

NO reaguje s ozonem (7) za tvorby oxidu dusičitého v excitovaném stavu. Při návratu excitovaných molekul na základní hladinu je přebytečná energie emitována ve formě světla (8).



Intenzita chemiluminiscence je přímo úměrná koncentraci NO. Vlnová délka emitovaného světla leží v červené a infračervené oblasti spektra (640–3000 nm). Přestože jsou detektory emitovaného světla citlivé jen v oblasti vlnových délek pod 900 nm, patří metoda chemiluminiscence k nejcitlivějším metodám pro stanovení NO – detekční limit je 1–2 pM (cit.^{27,37}). Pro vysokou rychlost reakce NO s O_3 a citlivost detekce emitovaného světla je možné měřit hladinu NO v reálném čase, a to v plynné i v kapalně fázi. Lze stanovit i oxidační produkty NO, ale až po převedení dusičnanů na dusitany (např. bakteriálními reduktasami nebo

kadmíem) a jejich redukci zpět na NO (v kyselém prostředí vzniká z dusitanu nitrosoniový ion, který je možné redukovat např. jodidem nebo dvojmocným vanadem na NO)³⁷.

Tato metoda je použitelná např. k měření NO ve vydechovaném vzduchu během konstantního výdechového proudu³⁸.

5.1.2. Elektrochemická (ampérometrická) detekce

Biologický poločas oxidu dusnatého (řádově sekundy) a jeho produkci jednotlivými buňkami je možné sledovat ampérometricky³⁹. Referenční elektroda je nejčastěji Ag/AgCl ponořená do roztoku NO. Na pracovní elektrodě je odevzdáván elektron za vzniku NO^+ . V přítomnosti OH^- vzniká HNO_2 a dusitany mohou být dále oxidovány na dusičnany. Množství oxidovaného NO je úměrné proudu protékajícímu mezi elektrodami. Původně používaná Clarkova platínová elektroda je dnes nahrazována uhlíkovou elektrodou modifikovanou porfyrinem, která je potažena vrstvou Nafionu (kationový iontoměnič odpuzující negativně nabitě ionty, např. NO_2^-). Využívána je i elektroda z polykrystalické platiny, vykazující vyšší účinnost oxidace NO, potažená vrstvou Nafionu a acetátem celulosy⁴⁰. Nejnovější přístroje jsou založeny na mikročipovém senzoru, jehož citlivost je 16 pA/nM NO s detekčním limitem přibližně 300 pM (cit.⁴¹).

Byl připraven biosenzor selektivní na NO na bázi optických vláken založený na měření změn fluorescence způsobené cytochromem c, který je označen fluorescenčním barvivem a zabudován do senzoru. Detekční limit je 20 μM (cit.⁴²).

Kalibrace NO senzoru je založena na vzniku oxidu dusnatého z dusitanu nebo na rozkladu donoru NO *N*-acetyl-*S*-nitroso-DL-penicillaminu⁴³ či na užití standardního NO roztoku připraveného z plynného NO. Elektroda citlivá na NO byla např. použita k přímému měření NO *in vivo* v žiludeční mukózní vrstvě během ischemické reperfuze⁴⁴.

5.1.3. Elektronová spinová (paramagnetická) rezonance ESR (EPR)

Po vložení látky s nepárovým elektronem (radikálu) do vnějšího magnetického pole dochází k orientaci magnetického momentu elektronu do dvou povolených orientací, které se liší energií. Dodáním záření o vhodné energii lze změřit hodnotu rozdílu mezi oběma spinovými stavy elektronu. Záznamem měření je spektrum ESR (cit.⁴⁵).

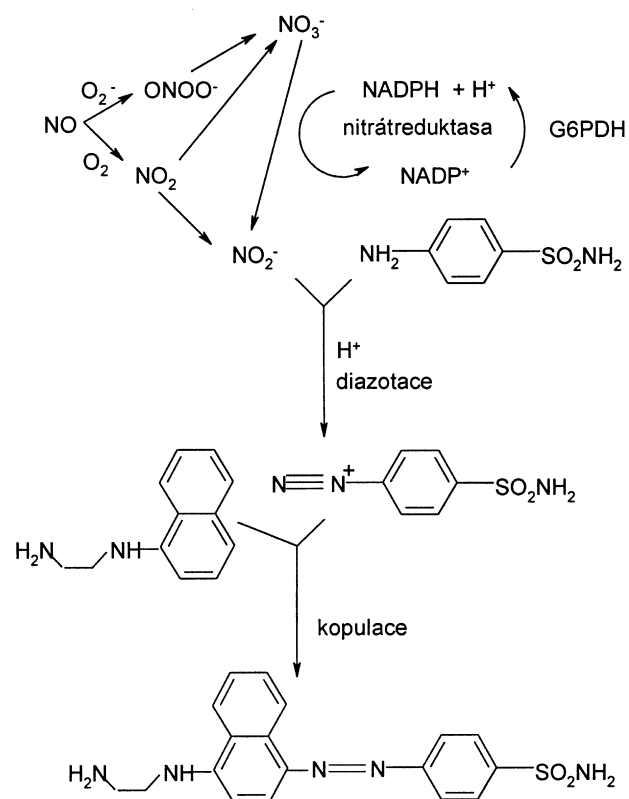
NO obsahuje v molekule 11 valenčních elektronů, ale ESR spektrum vzniká u volné molekuly NO, jen pokud je v excitovaném stavu. Pro detekci NO se užívá metoda zachytu spinu, kdy reakcí radikálu s diamagnetickou látkou náchylnou k tvorbě komplexu vzniká radikál, který má delší biologický poločas, a tím i lepší detegovatelnost. NO tvoří komplex nejčastěji s přechodnými kovy (Fe^{2+}), thioly nebo s reaktivními kyslíkovými centry. Pro zachycení NO se nejčastěji používá Fe^{2+} -*N*-methyl-D-glukamin-dithiokarbamat⁴⁶ nebo hemoglobin⁴⁷. Detekční limit vzniklých nitro-

soslučenin nebo methemoglobinu je přibližně 1 nM (cit.⁴⁸).

5.2. Nepřímá stanovení

5.2.1. Griessova metoda

Je založena na spektrofotometrickém stanovení dusitanů po diazotaci sulfanilamidu a kopulaci s *N*-(1-naftyl)ethylen-diaminem⁴⁹ (viz obr. 1) s detekcí v oblasti při 540 nm. V biologických vzorcích musí být dusičnany (vzniklé reakcí NO s hemoglobinem) zpět zredukovány na dusitany, které podléhají reakci, čímž je zajištěno stanovení celkové hladiny oxidačních produktů NO.



Obr. 1: Reakční mechanismus NO při Griessově reakci (8)

Při analýze séra musí být před stanovením provedena deproteinizace (např. ultrafiltrací). K redukci nitrátů se nejčastěji používá NADPH-dependentní nitrátreduktasa. Vyšší koncentrace NADP⁺ inhibuje Griessovu reakci. Proto se do reakční směsi přidává glukosa-6-fosfátdehydrogenasa a glukosa-6-fosfát, které NADP⁺ regenerují na redukovanou formu koenzymu.

Významné je postupné přidávání obou složek Griessova činidla pro dosažení maximální citlivosti testu. Pokud reaguje postupně kyselý roztok sulfanilamidu a pak teprve

N-(1-naftyl)ethylen-diamin, je reakce téměř třikrát citlivější než v případě, kdy se obě složky smíchají před přidáním do reakční směsi⁵⁰. Úskalím metody je možnost interference antikoagulantů nebo hemoglobinu ve vzorcích plazmy⁵¹. Kalibrační křivka s limitem citlivosti 5 μM (cit.⁵⁰) je sestavena pomocí vodného roztoku dusitanu sodného.

5.2.2. Oxidace hemoglobinu

Reakcí oxyhemoglobinu (Fe²⁺) s NO vzniká methemoglobin (Fe³⁺) a dusičnan (9).



Výhodou reakce je její vysoká rychlost (probíhá 26× rychleji než autooxidace NO), nenáročnost provedení, možnost měření *in vivo* i *in vitro* a vysoká citlivost a specifita pro NO (cit.⁵²). Spektrum oxyhemoglobinu je charakterizováno intenzivním absorpčním pásem s maximem při 415 nm a dvěma užšími absorpčními maximy při 542 nm a 577 nm. Methemoglobin vykazuje hlavní absorpční maximum při 406 nm (cit.⁵³).

NO je detegován díky charakteristické změně absorpčního maxima hemoglobinu z 415 nm (oxyHb) na 406 nm (metHb). Měřit lze i konverzi oxyhemoglobinu na redukováný methemoglobin jako rozdíl absorbance při 401 nm a 411 nm (izosbestický bod, cit.⁵³). Při měření chalkonů (prekurzory flavonoidů, u nichž ještě nedošlo k úplné cykлизaci na flavonoidní skelet) jako inhibitorů NO (cit.⁵⁴) byla sledována tvorba methemoglobinu pomocí poklesu absorbance oxyhemoglobinu při 576 nm.

Detekční limit metody pro měření NO *in vivo* je 1–10 nM (cit.⁵²).

5.2.3. Fluorescenční detekce

Pro fluorescenční detekci NO se užívají různé aromatické diaminy, např. naftalen-2,3-diamin (DAN, cit.⁵⁵) či 4,5-diaminofluorescein (DAF-2, cit.⁵⁶), které v přítomnosti kyslíku reagují s NO za vzniku triazolů. Metoda není selektivní pro NO, neboť reagují i dusitany. Schopnost DAF-2 detegovat NO je vyšší v přítomnosti dvojmocných kationů. Vápník zvyšuje signál NO uvolněného z NO donoru 200×. Současně bylo pozorováno zvýšení fluorescence s rostoucí dobou osvětlení⁵⁷.

Protože DAN je málo rozpustný ve vodě, není příliš vhodný pro měření biologických vzorků. Rozpustnější je 5,6-diaminonaftalen-1,3-disulfonová kyselina (DANDS) s maximem absorbance při 267 nm (cit.⁵⁸). DANDS reaguje s NO za vzniku 1*H*-naftotriazol-6,8-disulfonové kyseliny (NTADS) s maximem absorbance při 415 nm. Přirozená fluorescence DANDS je velice nízká a zvyšuje se reakcí s NO. Intenzita fluorescence je měřena při 428,8 nm s excitací při 302,4 nm. Měření se provádí na fluorescenčním spektrometru nebo metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Detekční limit je 0,6 nM (cit.⁵⁸).

5.2.4. Chemiluminiscenční reakce NO s luminolem

Luminol (5-aminoftalazin-1,4(2*H*,3*H*)-dion) je široce užívané chemiluminiscenční činidlo pro detekci reaktivních forem kyslíku a dusíku v biologickém systému. Oxid dusnatý reaguje s peroxidem vodíku za vzniku peroxodusitanu, který oxiduje luminol a vyvolá emisi chemiluminiscenčního záření.

Metoda byla použita při studiu patofyziologické role oxidu dusnatého v ledvinách potkanů u hypertenze⁵⁹. Detegovaná koncentrace NO uvolněného po průniku ledvinami byla 39 pM.

Yao a spol.⁶⁰ používají metodu pro měření NO *in vivo*, kde je vzorek odebrán mikrodiálýzou a detekce NO probíhá chemiluminiscenčně pomocí luminolu. Speciální mikrodiálýzační sonda je vysoce selektivní pro NO. Systém byl užit pro měření NO v krvi a tkáních a je dostatečně citlivý na změny koncentrace NO, způsobené teplotou nebo efekty donorů NO. Validovaný lineární rozsah metody je 5 nM až 1 μM s detekčním limitem 1 nM.

Je užívána i metoda založená na spojení chemiluminiscenční detekce NO (peroxodusitanu) luminolem a průtokové injekční analýzy (FIA, cit.^{61,62}). NO vzniká reakcí jodidu s dusitanem, prochází selektivní membránou a reaguje s peroxidasou za vzniku stabilnějšího komplexu. Ten po denaturaci uvolňuje NO, který je detegován technikou FIA na základě chemiluminiscence vznikající při reakci s luminolem. Detekční limit metody je 0,9 μM (cit.⁶¹).

Peroxodusitan může být k chemiluminiscenčnímu detektoru přiváděn dialýzační, vysoce selektivní membránou z acetátu celulosy. Metoda má vysokou citlivost, detekční limit je 10 pM (bez dialýzační membrány) a 100 pM (s dialýzační membránou)⁶².

5.2.5. Přeměna argininu na citrulin

Schopnost tkání nebo buněk využívat generovaný NO může být sledována na základě tvorby citrulinu z argininu v přítomnosti NOS kofaktorů FAD, FMN, NADPH, tetrahydrobiopterinu, vápníku a kalmodulinu (v případě NOS neuronové nebo endotelové). Reakci iniciuje radionuklidem označený arginin, terminační účinek má EDTA při pH 5,5, která váže vápník, což vede k inaktivaci enzymů. Vzorek prochází katexem. Za těchto podmínek se arginin váže na iontoměničiči, zatímco citrulin je eluován a měřen scintilačním počítacem⁶³.

Přeměna argininu na citrulin NO-syntasou a tvorba NO *in situ* může být monitorována metodou FIA s chemiluminiscenční detekcí⁶⁴. Imobilizovaná NOS produkuje NO v množství úměrném koncentraci L-argininu. Kalibrační křivka se sestaví s argininem, mez detekce je 0,5 mM (cit.⁶⁴).

5.2.6. Analýza dusitanů a dusičnanů metodou HPLC

Pro současné měření dusitanů i dusičnanů v plazmě byla vypracována metoda HPLC s detekcí spektrofotometric-

kou⁶⁵ nebo elektrochemickou (především amperometrickou nebo coulometrickou⁶⁶). V práci⁶⁷ je pro simultánní měření dusitanů i dusičnanů užívána metoda HPLC se 2 detektory. Prvním je DAD detektor, detegující dusitany a dusičnany při 212 nm a druhým je citlivější elektrochemický detektor s elektrodou ze skelného uhlíku, monitorující dusitanové ionty. Detekční limit pro dusitany je při použití UV-VIS detektoru 0,1 μM a u elektrochemického detektoru 0,001 μM; pro dusičnany s UV-VIS detekcí je 0,2 μM.

Dusitany lze měřit také pomocí HPLC s fluorescenční detekcí po jejich derivatizaci naftalen-2,3-diaminem za tvorby 3,4-dihydro-1,2,4-triazaanthracenu (excitace při 375 nm a emise při 415 nm). Detekční limit metody je 10 nM (cit.⁶⁸).

Další metoda HPLC je založena na nitrosaci dusitanu a *N*-acetyl-L-cysteinu na *N*-acetyl-S-nitroso-L-cystein, který je detegován při 333 nm. Mez detekce je 50 nM (cit.⁶⁹).

Pro stanovení dusitanů a dusičnanů byla vypracována také metoda iontové chromatografie^{70,71} s detekcí konduktometrickou, spektrofotometrickou (214 nm) a elektrochemickou.

5.2.7. Ostatní metody

Pro detekci plynného NO se používá hmotnostní spektrometrie⁷², pro detekci dusitanů plynová chromatografie⁷³, případně kombinace plynové a hmotnostní spektrometrie (GC-MS)⁷⁴. Pro analýzu a detekci vazeb NO se užívá infračervená spektrometrie⁷⁵. Dusitany a dusičnany se dají stanovit také kapilární elektroforézou⁷⁶, případně polarografií^{77,78}.

6. Závěr

Oxid dusnatý je v přítomnosti kyslíku reaktivním a nestálým radikálem s krátkým poločasem. Podléhá snadno oxidaci, reaguje se železem hemoglobinu, případně se superoxidem. Má funkci neurotransmiteru, účastní se nespecifické obrany organismu, například při chronických zánětech (revmatoidní artritida, bronchiální astma), při ateroskleróze, diabetu, epilepsii a septickém šoku. Výzkum metod stanovení oxidu dusnatého a objev potenciálních léčiv, která by byla schopná zasahovat do procesu tvorby a působení NO, patří k novým přístupům v ovlivnění zánětlivých, autoimunitních, neurodegenerativních a dalších civilizačních chorob.

*Práce byla realizována v rámci řešení Výzkumného zá-
měru FaF VFU č.1637 0003.*

LITERATURA

1. Palmer R. M. J, Ferrige A. G., Moncada S.: Nature 327, 524 (1987).
2. Müllner M.: Br. Med. J. 317, 1031 (1998).

3. Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A.: *Pharmacol. Rev.* 43, 109 (1991).
4. Sedláček J.: *Čs. Fyziol.* 42, 11 (1993).
5. Butler A. R., Williams D. L. H.: *Chem. Soc. Rev.* 22, 233 (1993).
6. Patel R. P., McAndrew J., Sellak H., White R., Jo H., Freeman B. A., Darley-Usmar V. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 385 (1999).
7. Kelm M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 273 (1999).
8. Thomas G.: *Medicinal Chemistry. An Introduction*, kap. 11. Wiley, Chichester 2001.
9. Last J. A.: *Environ. Health Perspect.* 102, 179 (1994).
10. Nedospasov A., Rafikov R., Beda N., Nudler E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13543 (2000).
11. Liu X., Miller M. J., Joshi M. S., Thomas D. D., Lancaster J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2175 (1998).
12. Vinten-Johansen J.: *Circ. Res.* 87, 170 (2000).
13. Butler A. R.: *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 18 (1995).
14. Štípek S., v knize: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci* (Štípek S. ed.), str. 29. Grada, Praha 2000.
15. Keshive M., Singh S., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R., Deen W. M.: *Chem. Res. Toxicol.* 9, 988 (1996).
16. Bergendi L., Ferenčík M., v knize: *Volné radikály a antioxidanty v medicíně (II)* (Ďuračková Z. ed.). SAP, Bratislava 1999.
17. Billiar T. R.: *Nitric Oxide. Ann. Surg.* 221, 339 (1995).
18. Vetrovský P., Entlicher G.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 62, 1355 (1997).
19. Schmidt H. H. W., Lohmann S. M., Walter U.: *Biochim. Biophys. Acta* 1178, 153 (1993).
20. Ferenčík M., Štvrtinová V., Kačáni L.: *Fórum Imunol.* 2, 128 (1994).
21. Moncada S.: *J. Hypertens.* 12, S35 (1994).
22. Němečková V.: *Psychiat.* 3, 174 (1999).
23. Stefanelli C., Pignatti C., Tantini B., Stanić I., Bonavita F., Muscari C., Guarnieri C., Clo C., Calderera C. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1450, 406 (1999).
24. Sato Y., Tsukamoto T.: *Drugs Today* 36, 83 (2000).
25. Tesař V., v knize: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci* (Štípek S. ed.), str. 175. Grada, Praha 2000.
26. Kulkarni K. S., Jain N. K., Singh A.: *Drugs Fut.* 26, 485 (2001).
27. Hampl V.: *Habilitační práce*. Univerzita Karlova, Praha 1997.
28. Parratt J. R.: *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 31 (1998).
29. Kim Y-K., Kim R-G., Park S-J., Ha J-H., Choi J-W., Park H-J., Lee K-T.: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 472 (2002).
30. Kharitonov S. A., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 727 (2001).
31. Dawson V. L.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22, 305 (1995).
32. Chiou G. C. Y.: *J. Ocul. Pharmacol. Th.* 2, 189 (2001).
33. Caulfield J. L., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R.: *J. Biol. Chem.* 273, 12689 (1998).
34. Zeman M., v knize: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci* (Štípek S. ed.), str. 167. Grada, Praha 2000.
35. Muscará M. N., Wallace J. L.: *Am. J. Physiol.* 276, G1313 (1999).
36. Janča J., Kapička V., Trka Z., Štěrba F.: *Obecná fyzika IV*, str. 114. SPN, Praha 1989.
37. Hampl V., Walters C. L., Archer S. L., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 21. Wiley, London 1996.
38. Wildhader J. H., Hall G. L., Stick S. M.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 74 (1999).
39. Malinski T., Czuchajowski L., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), part. VI, kap. 22. Wiley, London 1996.
40. Pariente F., Alonso J. L., Abruña H. D.: *J. Electroanal. Chem.* 379, 191 (1994).
41. <http://www.wpi-europe.com>, *AmperometricDetection.pdf*, staženo 6.2.2002.
42. Barker S. L. R., Kopelman R., Meyer T. E., Cusanovich M. A.: *Anal. Chem.* 70, 971 (1998).
43. Kitamura Y., Uzawa T., Oka K., Komai K., Ogawa H., Takizawa N., Kobayashi H., Tanishita K.: *Anal. Chem.* 72, 2957 (2000).
44. Wada K., Kamisaki Y., Ohkura T., Kanda G., Nakamoto K., Kishimoto Y., Ashida K., Itoh T.: *Am. J. Physiol.* 274, G465 (1998).
45. Waisser K., Pour M.: *Organická Chemie II*, str. 91. Karolinum, Praha 2000.
46. Venkatamaran S.: *Free Radical Biol. Med.* 29, 580 (2000).
47. Singel D. J., Lancaster Jr. J. R., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 23. Wiley, London 1996.
48. Henry Y. A., Singel D. J., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 24. Wiley, London 1996.
49. Green L. C., Wagner A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R.: *Anal. Biochem.* 126, 131 (1982).
50. Crkovská J., Štípek S.: *Klin. Biochem. Metab.* 6, 82 (1998).
51. Ricart-Jané D., Llobera M., López-Tejero M. D.: *Nitric Oxide* 6, 178 (2002).
52. Feelisch M., Kubitzek D., Werringloer J., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 31. Wiley, London 1996.
53. Archer S.: *FASEB J.* 7, 349, (1993).
54. Herencia F., López-García M. P., Ubeda A., Ferrándiz M. L.: *Nitric Oxide* 6, 242 (2002).
55. Wada M., Morinaka Ch., Ikenaga T., Kuroda N., Nakashima K.: *Anal. Sci.* 18, 631 (2002).
56. Jourdain D.: *Free Radical Biol. Med.* 33, 676 (2002).
57. Broillet M-Ch., Randin O., Chatton J.-Y.: *FEBS Lett.* 491, 227 (2001).
58. Zhang X., Wang H., Liang S., Zhang H.: *Talanta* 56, 499 (2002).
59. Kikuchi K., Nagano T., Hayakawa H., Hirata Y., Hirobe M.: *J. Biol. Chem.* 268, 23106 (1993).
60. Yao D., Vlessidis A. G., Evmiridis N. P., Evangelou A., Karkabounas S., Tsampalás S.: *Anal. Chim. Acta* 458, 281 (2002).

61. Yao D., Prodromidis M. I., Vlessidis A. G., Karayannis M. I., Evmiridis N. P.: *Anal. Chim. Acta* 450, 63 (2001).
62. Dai K., Vlessidis A. G., Evmiridis N. P.: *Talanta* 59, 55 (2003).
63. Tarpey M. M., Fridovich I.: *Circ. Res.* 89, 224 (2001).
64. Evmiridis N. P., Yao D.: *Anal. Chim. Acta* 410, 167 (2000).
65. El Menyawi I., Looareesuwan S., Knapp S., Thalhammer F., Stoiser B., Burgmann H.: *J. Chromatogr., B* 706, 347 (1998).
66. Di Matteo V., Esposito E.: *J. Chromatogr., A* 789, 213 (1997).
67. Jedličková V., Paluch Z., Alušík Š.: *J. Chromatogr., B* 780 193 (2002).
68. Li H., Meininger C. J., Wu G.: *J. Chromatogr., B* 746, 199 (2000).
69. Tsikas D., Rossa S., Sandmann J., Frölich J. C.: *J. Chromatogr., B* 724, 199 (1999).
70. Stratford M. R. L., Dennis M. F., Cochrane R., Parkins Ch. S., Everett S. A.: *J. Chromatogr., A* 770, 151 (1997).
71. Everett S. A., Dennis M. F., Tozer G. M., Prise V. E., Wardman P., Stratford M. R. L.: *J. Chromatogr., A* 706, 437 (1995).
72. Payne W. J., Gall J. L., Berlier Y., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 27. Wiley, London 1996.
73. Johnson A. A., Burleson D. G.: *Anal. Biochem.* 236, 331 (1996).
74. Tsikas D., Sandmann J., Frölich J. C.: *J. Chromatogr., B* 772, 335 (2002).
75. Sampath V., Rousseau D. L., Caughey W. S., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VI, kap. 29. Wiley, London 1996.
76. Leone A. M., Kelm M., v knize: *Methods in nitric oxide research* (Feelisch M., Stamler J. S., ed.), díl VII, kap. 34. Wiley, London 1996.
77. Jensen B. O., Skeidsvoll J., Holmsen H.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 35, 185 (1997).
78. Ximenes M. I. N., Rath S., Reyes F. G. R.: *Talanta* 51, 49 (2000).

Z. Kupková and L. Beneš (*Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Chemical Properties, Biological Effects and Methods of Detection of Nitric Oxide**

Nitric oxide (NO) produced by the action of NO synthase on arginine plays many important roles in physiological and pathophysiological processes as well as in the maintenance of neurotransmission, vascular regulation and immunity systems. NO is formed in small amounts in vivo and is rapidly decomposed by interaction with oxygen, making its measurement difficult. NO is usually determined by chemiluminescence, EPR, electrochemically and by the Griess assay.

VISITING SCIENTISTS OR SECONDED NATIONAL EXPERTS

The European Commission's Joint Research Centre has published a call for Expression of Interest for temporary job opportunities (Visiting Scientists or Seconded National Experts), to work at the JRC for a period of 3–12 months in a variety of scientific fields, including the field of QSAR. The call is open to candidatures of experts from acceding/candidate countries associated to the EU RTD Framework Programme, namely: Bulgaria, Czech Republic, Cyprus, Estonia, Hungary, Latvia, Lithuania, Malta, Poland, Romania, Slovak Republic, Slovenia and Turkey. The deadline for applications is 28 May 2004 (12.00h CET). Further information can be obtained from the following website: <http://www.jrc.cec.eu.int/enlargement>

Dr Andrew Worth Coordinator of the JRC Activity on QSARs ECVAM, TP 582 Institute for Health & Consumer Protection Joint Research Centre European Commission 21020 Ispra (VA) Italy.
Tel: +39 0332 789566, fax: +39 0332 789963, e-mail: andrew.worth@jrc.it.

pad
