

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Oxid dusnatý a jeho role při regulaci fyziologických
procesů**

Bakalářská práce

Autor práce: Andrea Čermáková

Obor studia: Živočišná produkce

Vedoucí práce: prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Oxid dusnatý a jeho role při regulaci fyziologických procesů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Mgr. Ing. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za vedení mé práce a dále doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za cenné rady. Mnohokrát děkuji své rodině především za trpělivost a také za podporu během mého studia.

Oxid dusnatý a jeho role při regulaci fyziologických procesů

Souhrn

Oxid dusnatý (NO) je anorganická sloučenina, radikál, skládající se z jednoho atomu dusíku a jednoho atomu kyslíku. Je řazen mezi deset nejnestabilnějších molekul v přírodě. Je velmi reaktivní, reaguje s kyslíkem za vzniku oxidu dusičitého, což je rovněž radikál. Za objevitele je považován Joseph Priestley (1733 – 1804).

Oxid dusnatý je řazen mezi gasotransmitery, což jsou plynné látky, které v organismu plní roli intracelulárních přenašečů. Vznik oxidu dusnatého je v organismu katalyzován enzymem NO – syntázou (NOS) z L-argininu. NOS se v organismu savců vyskytuje ve třech základních izoformách – nervové (nNOS), endoteliální (eNOS) a indukovatelné (iNOS).

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

Oxid dusnatý relaxuje střevní hladkou svalovinu včetně svěračů, prostřednictvím vazodilatace způsobuje erekci. Snížená koncentrace NO je jedním z faktorů hypertenze a erektilní dysfunkce. Významnou roli má NO i v reprodukční soustavě. Podílí se na regulaci meiotického zrání oocytů a motility spermií. Během těhotenství fyziologická produkce NO tlumí stahy hladké svaloviny děložní stěny.

NO se podílí na funkci imunitního systému, byly mu prokázány i protinádorové účinky. K průkazu oxidu dusnatého ve tkáních jsou využívány přímé metody jako je chemiluminiscence, elektrochemická detekce, elektronová spinová rezonance a nepřímé metody jako fluorescenční detekce, Griessova metoda, oxidace hemoglobinu a metoda HPLC (vysokotlaká kapalinová chromatografie).

Výzkum oxidu dusnatého je cílený zejména na terapeutické využití při léčbě chronických onemocnění respiračního a kardiovaskulárního systému. Dále k vývoji léků, které budou zesilovat schopnost NO omezit vznik například mozkové mrtvice, vředů, vysokého krevního tlaku, Alzheimerovy choroby nebo močové inkontinence.

Klíčová slova: Oxid dusnatý, gasotransmitter, syntáza oxidu dusnatého

Role of nitric oxide in the regulation of physiological processes

Summary

Nitric oxide is an inorganic chemical compound, radical, consisted of one nitrogen atom and oxygen atom. It is among the ten most unstable molecules in the nature. It is very reactive compound reacting also with oxygen to produce nitrogen dioxide, which is also radical. Joseph Priestley (1733 – 1804) is considered as a founder of NO.

Nitric oxide is classified as gasotransmitter (gaseous signaling molecules), which is gaseous substance playing the key role in intracellular communication (intracellular carrier). The formation of nitric oxide is catalyzed by the enzyme NO synthase (NOS) from L-arginine. NOS occurs in the mammalian organism in three basic isoforms - nerve (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS).

In the cardiovascular system, nitric oxide plays a role in maintaining blood vessel and blood pressure, inhibiting platelet adhesion and aggregation, inhibiting leukocyte activation, and having and antiproliferative effect.

Nitric oxide relaxes the intestinal smooth muscle, including sphincters, through vasodilation causing erection. Decreased NO is one of the factors of hypertension and erectile dysfunction. NO plays a significant role in the reproductive system as well. It participates in the regulation of meiotic maturation of oocytes and sperm motility. Physiological production of NO dampens the contractions of the smooth muscles of the uterine wall during the pregnancy.

NO participates in the function of the immune system and has been shown to have antitumor effects. Direct methods such as chemiluminescence, electrochemical detection, electron spin resonance and indirect methods such as fluorescence detection, Griess method, hemoglobin oxidation, and HPLC (high pressure liquid chromatography) are used to detect nitric oxide in tissues.

Nitric oxide research is primarily focused on therapeutic use in the treatment of chronic respiratory and cardiovascular diseases. Furthermore, NO research also focuses on development of drugs that increase the ability of NO to reduce the incidence of stroke, ulcers, high blood pressure, Alzheimer's disease or urinary incontinence.

Keywords: nitric oxide, gasotransmitter, nitric oxide synthase

1 Obsah

| | |
|--|-----------|
| 2 Úvod..... | 7 |
| 3 Cíl práce | 8 |
| 4 Literární řešerše | 9 |
| 4.1 Obecné vlastnosti oxidu dusnatého..... | 9 |
| 4.2 Biosyntéza oxidu dusnatého | 10 |
| 4.3 Izoformy oxidu dusnatého | 11 |
| Endoteliální NO - syntáza | 11 |
| Indukovatelná NO - syntáza | 12 |
| Nervová NO - syntáza | 13 |
| Mitochondriální NO - syntáza | 14 |
| 4.4 Historie oxidu dusnatého | 15 |
| 4.5 Role oxidu dusnatého ve fyziologii..... | 16 |
| Dýchací soustava | 16 |
| Vylučovací soustava | 17 |
| Pohlavní soustava | 17 |
| Kardiovaskulární systém | 19 |
| Trávicí soustava | 20 |
| 4.6 L-arginin | 22 |
| 4.7 Odbourání NO | 24 |
| 4.8 Detekce NO | 25 |
| Přímá stanovení | 25 |
| Nepřímá stanovení | 27 |
| 5 Závěr..... | 32 |
| 6 Seznam použité literatury..... | 33 |

2 Úvod

Oxid dusnatý (NO) byl do jisté doby znám pouze jako nežádoucí, toxický a zdraví škodlivý plyn. NO je ale uplatňován při regulaci řady fyziologických procesů. Má roli neurotransmiteru, účastní se například nespecifické obrany organismu, podílí se k udržení tonu cév a krevního tlaku, k regulaci erekce penisu, k relaxaci hladkého svalstva atd.

V roce 1992 byl oxid dusnatý označen časopisem Science „Molekulou roku“. Po šesti letech, v roce 1998, dostali vědci R. F. Furchgott, L. J. Ignarro a F. Murad Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství za práci „Oxid dusnatý jako signální molekula v kardiovaskulárním systému“.

V této bakalářské práci jsem se zaměřila na vlastnosti NO, funkci v lidském těle a na možnosti jeho detekce. Oxid dusnatý má v lidském těle velmi důležitou funkci a proto je mu věnována setrvalá pozornost.

„Objev nitridu dusnatého Louisem Ignarrem a role, kterou hraje při snižování výskytu kardiovaskulárního onemocnění, je stejně důležitý, jako byl objev penicilinu a inzulinu.“

**David Heber, M.D. Ph.D.
ředitel UCLA – Centra pro lidskou výživu**

3 Cíl práce

Cílem práce je shrnout současné informace o oxidu dusnatém formou literární rešerše. Dále přiblížit fyziologické procesy oxidu dusnatého v lidském těle, historii a možnosti detekce.

4 Literární řešerše

4.1 Obecné vlastnosti oxidu dusnatého

Oxid dusnatý (NO) je dvouatomová molekula tvořena 15 elektrony. Jeden elektron je nepárový – radikál (označován také -NO). V závislosti na koncentraci, je v atmosférických podmínkách oxid dusnatý dráždivým plynem, který přispívá k znečišťování ovzduší. Při normální teplotě a za přítomnosti molekul vody se jedná o bezbarvý, leptající plyn. Čím je koncentrace NO vyšší, tím rychleji probíhá reakce s kyslíkem (Blaire *et al.*, 2005). S kyslíkem reaguje NO podle rovnice (1) za vzniku oxidu dusičitého NO₂, což je hnědý jedovatý plyn, rovněž radikál.

V hydrofobním prostředí membrán reaguje NO s kyslíkem mnohem rychleji než ve vodě (až 300x). Ve vodném roztoku (2) jsou hlavním produktem oxidace NO dobře rozpustné dusitany (nitrity; NO₂-), které se v přítomnosti hemoproteinů (např. oxyhemoglobinu) oxidují až na dusičnany (nitráty; NO₃-) (Kupková, 2004).

1. $2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2$
2. $\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NO}_2 + 2\text{H}^+$

Reakcí oxidu dusičitého s oxidem dusnatým vzniká oxid dusitý (3), který vzniká za teploty nižší než -21°C. Používá se k výrobě kyseliny dusité (HNO₂).

3. $\text{NO} + \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$

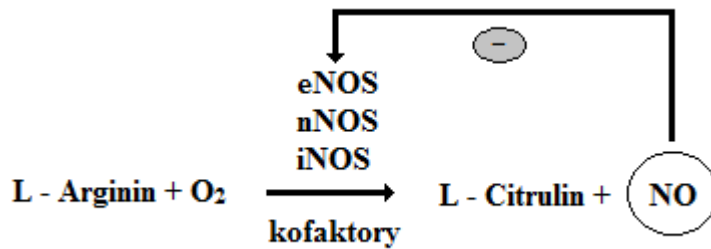
Rychlost autooxidace závisí na koncentraci NO a kyslíku. Oxid dusnatý nereaguje v anaerobních podmínkách. Patologicky významná je reakce (4) NO se superoxidem (O₂-), při níž vzniká toxický peroxodusitan (OONO-) (Kupková, 2004).

4. $\text{NO}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{OONO}^-$

Toxicita peroxodusitanu pramení z oxidace SH skupin bílkovin, atomů železa a síry v biologických molekulách a z peroxidace lipidů. Může indukovat poškození DNA a apoptózu (regulovanou buněčnou smrt) (Kupková, 2004).

4.2 Biosyntéza oxidu dusnatého

Ke vzniku NO v organismu je potřeba tří izoenzymů – syntáz oxidu dusnatého (NOS), které katalyzují přeměnu L-argininu (obr.1) na L-citrulin a oxid dusnatý prostřednictvím dvou po sobě jdoucích monooxygenasových reakcí (Blair *et al.*, 2005).



Obr.1. Regulace produkce oxidu dusnatého (Palmer, 1987)

NO-syntázy jsou homodimery obsahující vazebná místa pro NADPH (nikotinamidadenindinukleotid fosfát), FMN (flavinmononukleotid), FAD (flavinadenindinukleotid) a kalmodulin (CaM) (Hemmens a Mayer, 1998; Boggs *et al.*, 2000). Kalmodulin aktivuje funkce NOS a ovlivňuje průtok elektronů enzymem (Stuehr *et al.*, 1999).

4.3 Izoformy oxidu dusnatého

Enzym NO-syntáza se v buňkách vyskytuje ve třech základních izoformách – nervová NOS (nNOS), endotelová NOS (eNOS) a indukovatelná NOS (iNOS). V roce 1996 byla popsána i čtvrtá izoforma – mitochondriální NOS (mtNOS). Jednotlivé izoformy jsou produkty různých genů s různou lokalizací, regulací, katalytickými účinky a různou citlivostí k inhibitorům (Murad, 1999; Furchgott, 1999; Ignarro, 1999).

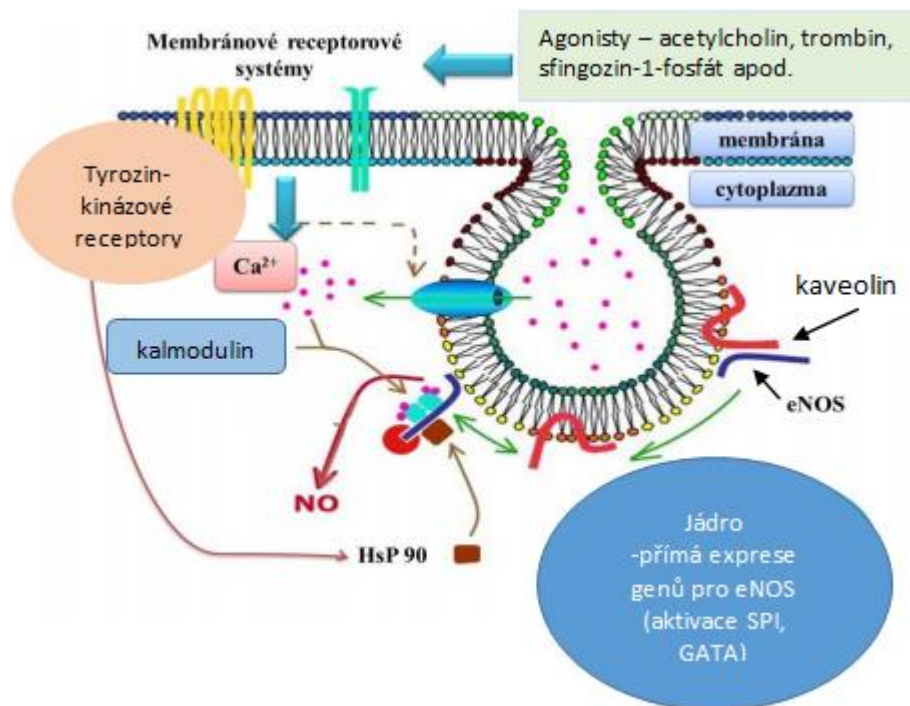
| Izoforma NOS | neuronální (mozková) | Indukovatelná nezávislá na zvýš. Ca ²⁺ | endoteliální konstitutivní |
|--------------|---|---|---|
| Označení | nNOS , ncNOS, bNOS, NOS-I | iNOS , mNOS, macNOS, NOS-II | eNOS , ecNOS, NOS-III |
| Distribuce | Rozpustná frakce buněčných nebo tkáňových homogenátů | Rozpustná frakce buněčných nebo tkáňových homogenátů | Většinou asociována s endoteliálními buněč. membránami |
| Lokalizace | V neuronech CNS, ale i v periférii, svalech, ... | Zřejmě každá jaderná buňka je schopna exprese iNOS | Výhradně ve vaskulárním endoteliu |

(upraveno podle Griffith, 1995)

Endoteliální NO - syntáza

Endoteliální NO – syntáza (obr. č. 2) syntetizuje jen malé množství oxidu dusnatého po krátkou dobu. Tato isoforma je u člověka kódována genem umístěným na 7. chromozomu. Protein má velikost 133 kDa (Janssens *et al.*, 1992). eNOS se exprimuje ve vaskulárních endoteliálních buňkách a hraje důležitou roli v angiogenezi a regulaci vaskulárního tonu. eNOS je také exprimována v celé řadě jiných typů buněk, jako jsou například průdušinky, epitelové buňky, kardiomyocyty, a neutrofilny (Su *et al.*, 2005).

U samců savců byla nalezena v Sertoliho, Leydigových, endoteliálních buňkách a také ve spermatidách (Ambrosino *et al.*, 2003). eNOS byla zjištěna také ve folikulech vaječnicků savců (Jablonka - Shariff a Olson, 1997).



Obr. 2 Endotelová syntáza a mechanismy její regulace

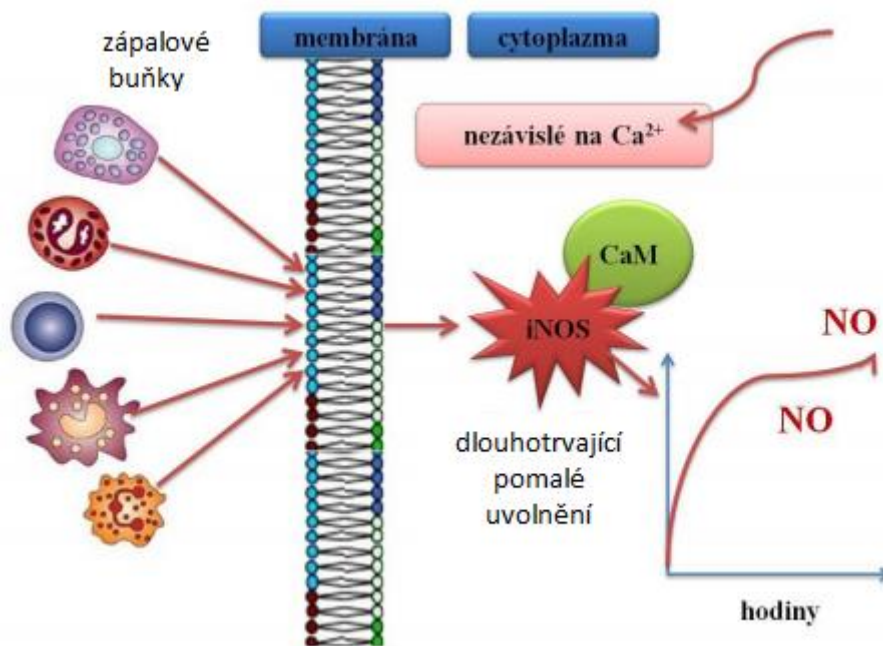
(SPI, GATA=faktory nevyhnutelného pro bazální transkripci v buňkách endotelu, H_sP 90=heat shock protein 90)

(zdroj: <https://portal.jfmed.uniba.sk/download.php?fid=455>)

Indukovatelná NO - syntáza

Indukovatelná izoforma NOS (iNOS) (obr. č. 3) produkuje stálé množství NO po dlouhou dobu (Moncada et al., 1991; Nathan, 1992) a tato produkce není závislá na vápníku a kalmodulinu (Murad, 2003), proto je aktivita iNOS označována jako Ca²⁺ independentní (Suschek *et al.*, 1993).

U člověka je iNOS produkována genem lokalizovaném na chromozomu 17. Protein má molekulovou hmotnost 133 kDa (Dixit a Parvizi, 2001). Aktivací indukované NOS (iNOS) cytokiny nebo bakteriálními produkty se hladina NO výrazně zvyšuje. iNOS je produkována v závislosti na stimulu, jež představují nejčastěji endotoxiny a proinflamační cytokiny. iNOS produkuje na rozdíl od konstitutivních izoform větší množství oxidu dusnatého (Ignarro, 1999; Hattori *et al.*, 2000).



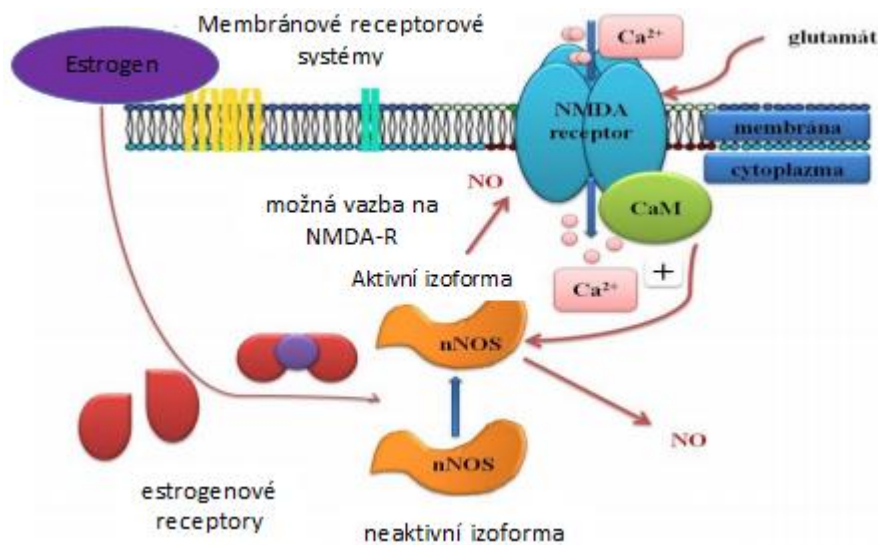
Obr.3 Princip uvolnění NO pomocí indukovatelné NO syntázy
 (CaM=komplex kalcium/kalmodulin)
 (zdroj: <https://portal.jfmed.uniba.sk/download.php?fid=455>)

Nervová NO - syntáza

Nervová NO-syntáza (obr. č. 4) byla poprvé nalezena v nervové tkáni (Bredt *et al.*, 1991). Je přítomná v nervových buňkách periferního i centrálního nervového systému a v některých epitelových buňkách. Gen pro nNOS je u člověka uložen na 12. chromozomu. Monomer proteinu má hmotnost 131 kDa. Tato isoforma syntetizuje pouze malé množství oxidu dusnatého. nNOS aktivuje komplex kalmodulin/ Ca^{2+} , ten vzniká pomocí Ca^{2+} , který se váže na kalmodulin (Janssens *et al.*, 1992).

Funkce nNOS zahrnuje regulaci synaptického přenosu v centrálním nervovém systému, centrální regulaci krevního tlaku, relaxaci hladké svaloviny a vazodilataci prostřednictvím periferních nervů. Také je zapojena do neuronální smrti při mozkově-cévním infarktu (Viario, *et al.*, 2000). Předpokládá se, že stimulace nervu přímo aktivuje uvolnění NO z nitrergních nervů a ve skutečnosti se NO jeví jako dominantní neurotransmitter zodpovědný za nervem-zprostředkovanou, od endotelu nezávislou vazodilataci (Donald, 2005). Později byl její výskyt

prokázán také v kosterní svalovině, beta buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, hypofýze, dřeni nadledvin a ledvinových nefronech, samčích pohlavních orgánech a dalších tkáních (Dixit a Parvizi, 2001).



Obr. 4 Nervová NO syntéza, mechanismy její regulace
(NMDA= N-methyl-D-asparagová kyselina, CaM=kalmodulin)
(zdroj: <https://portal.jfmed.uniba.sk/download.php?fid=455>)

Mitochondriální NO - syntáza

Experimenty potvrdili existenci izoformy, která je v úzkém kontaktu s mitochondriální matrix, je umístěná na vnitřní straně mitochondriální membrány a je závislá na intracelulární hladině Ca²⁺. Existuje názor, že mtNOS je jednou z forem nervové NO syntázy, která vznikala jako její posttranslační modifikace v různých buňkových typech různých orgánů. Mitochondriální NO syntáza byla identifikovaná v mitochondriálních buňkách mozku, ledvin, jater a kosterního svalstva (Bates et al., 1996).

4.4 Historie oxidu dusnatého

Za objevitele oxidu dusnatého je považovaný Joseph Priestley (1733 -1804), který v roce 1772 dokázal tuto molekulu identifikovat.

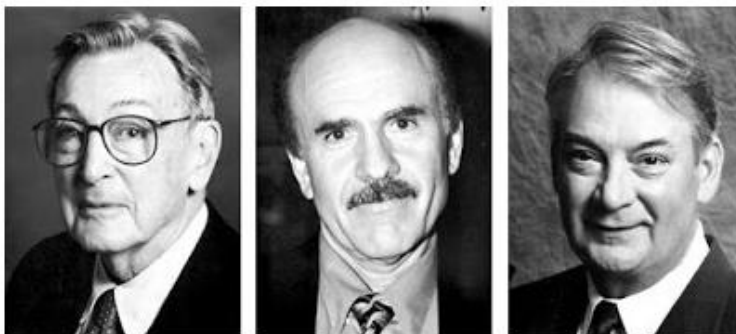
V roce 1980 Furchgott a Zawadzki označili tuto molekulu jako relaxační faktor uvolňovaný endotelem.

Ferid Murad se zabýval prvními výzkumy oxidu dusnatého. Murad a jeho kolegové napsali přednášku, která prokazovala, že oxid dusnatý nejen aktivuje enzym, který produkuje cyklický guanosin-monofosfát (cGMP), ale může také až 100krát zvýšit koncentraci cGMP v lidských tkáních.

Ignarrovi se kolem roku 1986 opakovaně podařilo prokázat, že tělo je schopné vyrobit si svůj vlastní oxid dusnatý. Jeho hypotéza se ukázala jako pravdivá – endoteliální buňky cév mohou produkovat oxid dusnatý za účelem řízení krevního tlaku.

Kolem roku 1990 Ignarrovi pokusy naznačily, že NO je také chemický nositel informací, zodpovědný za erekci penisu. Tento objev brzy vedl k vývoji a marketingu léku Viagra.

Přelom v historii oxidu dusnatého nastal v 90. letech dvacátého století. V roce 1992 byl časopisem Science označen za "molekulu roku". Dne 10. prosince 1998 byla udělena Robertovi Furchgottovi (State University of New York, Brooklyn, USA), Louisovi Ignarrovi (University of California, Los Angeles, USA) a Feridovi Muradovi (University of Texas, Huston, USA), (obr. číslo 5), Nobelova cena za fyziologii a lékařství za práci „Oxid dusnatý jako signální molekula v kardiovaskulárním systému“(Ignarro, 1999).



Robert F. Furchgott

Louis J. Ignarro

Ferid Murad

Obr.5 Nositelé Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství roku 1998 (<http://sandwalk.blogspot.cz/2007/01/nobel-laureates-furchgott-ignarro-and.html>)

4.5 Role oxidu dusnatého ve fyziologii

Dýchací soustava

Oxid dusnatý je molekula s vazodilatačními účinky, která je v těle tvořena řadou buněk včetně cévního endotelu. Na rozdíl od cév velkého oběhu, kde stálá syntéza oxidu dusnatého významně přispívá k nastavení bazálního tonu, klidová tvorba oxidu dusnatého je ve zdravé plicní cirkulaci minimální (Himashree, 2003).

Je známo, že oxid dusnatý produkovaný zejména konstitutivními izoformami má svou roli i při vývinu plic. Zvýšená aktivita těchto izoform byla pomocí detekována v bronchiálním epitelu plodu. Předpokládá se, že vzestup exprese především eNOS může přispívat k angiogenezi a tím k růstu plic. Někteří autoři také podporují názor, že zvýšení aktivity obou konstitutivních izoform bezprostředně po porodu může zlepšit funkci respiračního systému (Ricciardolo, 2004). Endogenní NO stimuluje aktivitu submukózních žláz dýchacího systému s následným zvýšením tvorby hlenu. Tato zjištění byla potvrzena aplikací donorů NO, po kterých se sekrece hlenu výrazně zvýšila a také použitím inhibitorů NO syntáz, které sekreci hlenu potlačili. Tím se potvrdil názor, že sekrece hlenu v dýchacích cestách je zprostředkována mechanismem zahrnujícím intracelulární produkci NO. Tvorba a vlastnosti hlenu výrazně ovlivňují mukociliární transport, na kontrole kterého se v dýchacích cestách účastní i NO (Král, 1998).

V patogenezi onemocnění respiračního systému (včetně alergických) je důležité působení oxidu dusnatého na úrovni imunitního systému, konkrétně signálních procesů mezi T-lymfocyty a makrofágy spolu s modulací produkce a funkce jimi produkovaných cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (Ricciardolo, 2004). Konečný efekt jeho působení (protektivní nebo toxický) i v tomto případě závisí na typu aktivované izoformy NOS, jeho koncentraci, místě produkce, případně reakci s dalšími substráty. Při vdechnutí extrémně vysoké dávky (5000 – 20000 ppm) může mít oxid dusnatý přímý toxický vliv na plíce. Jeho schopnost vytvářet volné radikály se následně projeví v poškození proteinů surfaktantu a snížení povrchového napětí v alveolách. Jedním z vedlejších toxických produktů NO je oxid dusičitý (NO₂) (Král, 1998). Vyšší koncentrace NO₂ nebo jeho dimeru způsobují poškození epitelálních buněk dýchacích cest (Kupková a Beneš, 2004).

Vylučovací soustava

Lékaři potvrdili, že nedostatečná produkce NO je nepochybně jedním z faktorů inkontinence. Inkontinence, nebo-li nekontrolovatelné a mimovolní unikání moči. Za normálních okolností NO skvěle uvolňuje hladký sval močového měchýře a umožňuje jeho normální rozšíření a naplnění močí. Při nedostatečné hladině NO se močový měchýř nemůže dostatečně uvolnit a moč uniká (Ignarro, 1999). Protektivní účinek v ledvinách se projevuje v ovlivnění glomerulární perfúze a sekrece reninu. Na regulaci homeostázy tekutin a elektrolytů v ledvinách se NO podílí ovlivněním vazokonstrikce renálních cév. NO, ale i další produkty metabolismu L-argininu mají důležitou roli při zajišťování fyziologické funkce ledvin. V imunohistochemických studiích bylo prokázáno, že v urogenitálním systému se nacházejí všechny tři izoformy NO-syntáz (Kone, 1999).

Zdrojem eNOS jsou hlavně glomerulární endotelové buňky, buňky proximálního tubulu a sběrných kanálků. nNOS se nachází v hlavních buňkách sběrných kanálků a pánevních nervech. Funkční studie potvrdily přítomnost iNOS např. v proximálním tubulu ačkoli přesná lokalizace iNOS v podmínkách in vivo je stále neznámá (Sharma, 2004).

Pohlavní soustava

Samičí pohlavní soustava

Ve vaječnicích reguluje NO zrání folikulů a ovulaci. Hladina NO koreluje s hladinou estrogenů. Uvažuje se, že oxid dusnatý má důležitou funkční roli při podpoře oplodnění ve vejcovodech. Bazální uvolňování NO stimuluje pohyb spermií. Reguluje kontrakce vejcovodu a může do určité míry ovlivnit i kinetiku řasinek vejcovodu. Oxid dusnatý může také zvyšovat vylučování vaginálního sekretu (Jaing, 1996).

Významnou rolí NO je nástup kontrakcí dělohy. Během těhotenství fyziologická produkce NO tlumí stahy hladké svaloviny děložní stěny. Koncentrace se snižuje až okolo porodu, což vede k vyvolání děložních kontrakcí (Buhimschi et al., 1996).

Všechny izoformy NO syntáz byly také detekovány v žlázách epitelu dělohy, endometriálních stromálních buňkách a buňkách myometria. U prasat byly zjištěny tři izoformy ve vaječniku během vývoje folikulů. eNOS byla zjištěna v endoteliálních, kumulárních buňkách, oocytech a granulóznicích buňkách během utváření folikulu s jednou vrstvou kumulárních buněk (Kim, 2005). U skotu byla iNOS nalezena rozptýleně v cytoplazmě nezralých oocytů, naproti tomu u zralých oocytů se vyskytovala více ve shlucích (Tesfaye, 2006). Studiemi bylo dokázáno, že je NO nezbytný pro meiotické zrání oocytů savců (Jablonka Shariff, 2000).

Děloha je orgánem, který překonává důležité strukturální změny během menstruačního cyklu i během těhotenství. Vzhledem k tomu, že NO reguluje kontraktilitu hladkého svalstva a tedy i spontánní kontrakce a dilataci dělohy během těhotenství, otázka úlohy NO v této oblasti si postupně získává pozornost odborníků v dané oblasti (Rosselli et al., 1998).

Samčí pohlavní soustava

Účinkem oxidu dusnatého v mužském pohlavním systému je regulace erekce. Oxid dusnatý tak můžeme považovat za fyziologický mediátor erekce, která je regulována převážně prostřednictvím cGMP. Také varlata obsahují L-arginin a NO. Konstitutivní NO syntázy byly detekovány v Leidigových buňkách, Sertoliho buňkách a endotelových buňkách varlat (Zini, 1996). Tato zjištění ukazují na zapojení cGMP signální dráhy do regulační funkce varlat a hlavně do spermatogeneze ve všech jejích fázích. Kromě spermatogeneze moduluje ve varlatech průtok krve, buněčnou permeabilitu a kontraktilitu myofibroblastů. Oxid dusnatý ovlivňuje i pohyb spermií. Nízká koncentrace NO zrychluje jejich pohyb, střední nebo vysoká koncentrace oxidu dusnatého jejich pohyblivost snižuje, případně zcela inhibuje (Rosselli et al., 1995). Oxid dusnatý a superoxidový anion také podporují kapacitaci spermií a akrosomovou reakci (Saleh a kol. 2002).

Kardiovaskulární systém

Jedním ze základních fyziologických vlastností oxidu dusnatého je vasodilatační efekt. Oxid dusnatý je v kardiovaskulárním systému tvořený převážně endotelovou izoformou NOS. Bazální uvolňování oxidu dusnatého z L-argininu má velký význam v regulaci krevního průtoku a krevního tlaku. Oxid dusnatý je kontinuálně uvolňovaný v arteriální části vaskulárního systému člověka a reguluje tonus v mikrocirkulaci. Stimuly pro výrobu a uvolnění oxidu dusnatého jsou proudění krve a tlak v cévách (Strijdom, 2009). Úloha oxidu dusnatého v udržení cévní homeostázy je dobře definovaná. Vychází z původní teorie, která hovoří o tom, že po vytvoření NO v endotelu cév se tento mediátor jednoduchou difúzí nebo pomocí zatím neznámého transportního systému šíří do buněk hladkého svalu cévy. Tam se naváže na guanlyl cyklázu, zvýší hladinu cGMP v buňkách hladkého svalu, sníží intracelulární koncentraci Ca^{2+} a výsledkem je relaxace cévy. Kromě toho má NO i účinek antitrombotický a protizánětlivý, přičemž kombinace těchto účinků brání poškození endotelu. Zvýšená produkce reaktivních forem dusíku, zejména peroxidusitanu, má vliv na rozvoj arteriosklerózy (Ignarro, 2005).

Odborníci se shodují, že oxid dusnatý je velmi silný a účinný marker a proto má tato molekula velkou budoucnost v prevenci i v terapii různých onemocnění např. ischemická nemoc srdeční. U ischemie myokardu je patofyziologickým principem nedostatečné zásobení srdečního svalu kyslíkem, což je spojeno s nedostatečným odstraňováním metabolitů, v důsledku snížené perfuze (Vácha, 2002).

K dalším klíčovými rolím NO patří jeho působení na zpomalování tvorby aterosklerotických plátů v cévách. Ignarro (1999) tvrdí, že pláty se tvoří usazováním cholesterolu v koronárních tepnách a mohou zúžit nebo dokonce zablokovat tepny a tím omezit zásobování srdce krví. Vysoký krevní tlak znamená, že jsou cévy zúžené nebo zablokované. Jestliže krev nemůže volně proudit, dříve nebo později dojde ke značnému poškození endoteliálních buněk. Jakmile je produkce NO jednou omezena, riziko srdečního infarktu nebo mozkové mrtvice se výrazně zvýší. Tím, že NO udržuje pravidelně čerpání krve do cévního systému, zajišťuje dokonalou průchodnost cév a tepen.

Ateroskleróza

Ateroskleróza je kardiovaskulární onemocnění – kornatění tepen. Jde o postupný, dynamický zánětlivý proces. Během něj se zmenšuje průměr tepen, což brání normálnímu průtoku krve. Ateroskleróza je také rizikovým faktorem onemocnění periferních tepen. Na stěnách tepen se hromadí tukové usazeniny – pláty. Aterosklerotické pláty se tvoří několik let. NO je schopen do tohoto procesu včas zasáhnout a zabránit ztlušťování tepenných stěn a ukládání tuků. Chronický zánětlivý proces, který postihne tepny, může přispět k rozvoji aterosklerózy. V tomto případě je dostatečná hladina NO velmi důležitá jako prevence (Ignarro, 2005).

Trávicí soustava

Oxid dusnatý působí v trávicí soustavě jako neurotransmitter. Ve fyziologických podmínkách je odpovědný za dilataci žaludku, regulaci peristaltiky a stimulaci sekrece hlenu ve střevech. Do určité míry ovlivňuje tvorbu inzulinu, ale při nadměrné produkci NO se tyto účinky mohou změnit na poškození sliznice a slinivky břišní (Dijkstra, 2004).

NO je zapojen do regulace průběhu onemocnění diabetes mellitus. Diabetes mellitus je metabolické onemocnění, jehož dlouhodobé trvání vede k postižení jednotlivých tkání a orgánů, k čemuž dochází v důsledku metabolických změn při nedostatku inzulinu (Broulíková, 2011).

Byla zjištěna tvorba značného množství NO v trávicím traktu a jeho následná difuze do krevního oběhu. Oxid dusnatý vzniká i v ischemické tkáni bez přístupu kyslíku (NOS kyslík potřebuje, nemůže být tedy zdrojem NO). V obou případech vzniká NO z nitrátů, resp. nitritů. Zdrojem nitrátů v trávicím traktu je především zelenina. Bakterie ústní dutiny je redukuje na nitrity (pomocí nitrátoreduktázy). V ischemické tkáni jsou nitrity a nitráty produktem oxidace NO. Mohou se však znovu stát zdrojem NO (Murad, 2009).

Kyselina listová

Kyselina listová je vitamín B a je to nesmírně důležitá složka exogenních antioxidantů. Kyselina listová je důležitá pro silné antioxidační vlastnosti, ale také je kofaktor, který musí být přítomen, aby určité enzymy byly schopné vykonávat životně důležité funkce včetně těch, které

snížují aktivitu volných radikálů. Naruší-li se oxidační stres, stabilizuje se NO v těle (Ignarro, 2005).

Kyselina L-askorbová

Kyselina L-askorbová, vitamín C, je součástí citrusových plodů, šípků, špenátu, rybízu, jahod či brokolice nebo papriky. Je považován za nejdůležitější antioxidant, rozpustný ve vodě a v extracelulární tekutině. Je schopen neutralizovat ROS (reaktivní formy kyslíku) ve vodné fázi ještě před peroxidací lipidů. Nadměrné užívání (více než 2g / den) může zvýšit riziko vzniku ledvinových oxalátových kamenů (Mason, 2006).

| PŘEHLED POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ NA PODPORU TVORBY NO | |
|--|----------------------|
| L-arginin | 4000 - 6000 mg denně |
| L-citrulin | 200 - 1000 mg denně |
| Vitamín C | 500 mg denně |
| Vitamín E (alfa-tokoferol) | 400 m.j. denně |
| Kyselina listová (Vitamín B9) | 400 - 800 mcg denně |
| Kyselina alfa-lipoidová | 10 mg denně |

(podle Ignarro, 2005)

4.6 L-arginin

L-arginin je základním substrátem pro vznik oxidu dusnatého. Je to semiesenciální aminokyselina, které přirozeným zdrojem jsou například mléčné výrobky, hovězí maso, pšeničné klíčky, sója nebo ořechy.

Normální plazmatické koncentrace L-argininu jsou 80-120 μM a intracelulární koncentrace je do 1 mM. Při absenci příjmu z potravy by tak měla intracelulární zásoba L-argininu stačit na zachování homeostázy NO (Weitzberg, 2005).

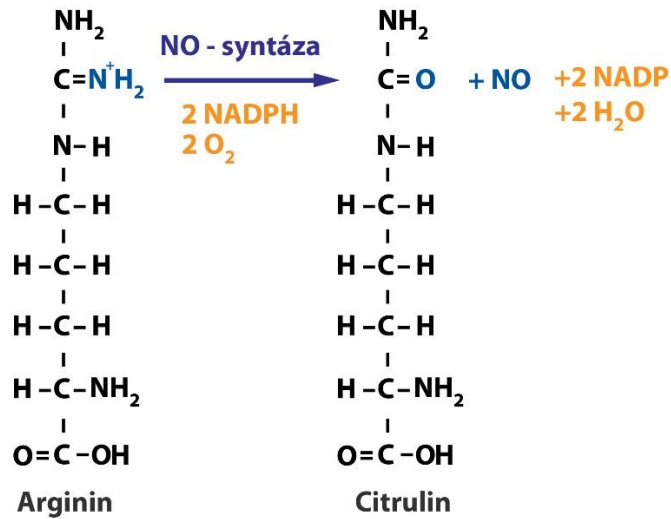
V roce 1988 britský vědec Salvador Moncada identifikoval látku, která se mění v endotelu na NO – aminokyselinu L-arginin. Následně provedli vědci, spolu s kardiologem Johnem P. Cookem, klinické testy na lidech s pozitivními výsledky, které potvrdily příznivý účinek L-argininu na srdce a cévy.

L-arginin a L-citrullin hrají zásadní roli v produkci oxidu dusnatého v těle (obr. 5). Oxid dusnatý je nepostradatelný pro zdravý kardiovaskulární systém a L-arginin, na jehož tvorbě se podílí L-citrullin, je důležitou složkou při stimulaci produkce oxidu dusnatého v těle. L-citrullin je aminokyselina, kterou využívají endoteliální buňky a přeměňují ji na L-arginin (Ignarro, 1999).

V roce 1999 byl na klinice Mayo prováděn šestiměsíční výzkum, který měl zjistit, zda potravinové doplňky s L-argininem mohou odstranit endoteliální dysfunkci u lidí s onemocněním koronárních tepen. Výzkum byl prováděn u pacientů, kterým byl podáván orálně potravinový doplněk s L-argininem, nebo placebo. Na konci výzkumu se u pacientů užívajících doplněk zlepšila jak endoteliální funkce a krevní průtok, tak i onemocnění koronárních tepen (Ignarro, 2005).

V současnosti se L-arginin hlavně v zahraničí využívá jako doplňková terapie u pacientů s městnavým srdečním selháváním, s ischemickou chorobou srdeční, s erektilní dysfunkcí, neplodností, sexuálními problémy, po transplantaci ledviny, po chirurgických zákrocích, se zánětem močového měchýře, s HIV/AIDS, předčasně narozených dětí, s neurodegenerativními chorobami, s nádorovými onemocněními prsu, hlavy a krku, s chronickými ranami (Wu, 1998). L-arginin je využíván i u zdravých jedinců na zlepšení sportovního výkonu (podpora tvorby

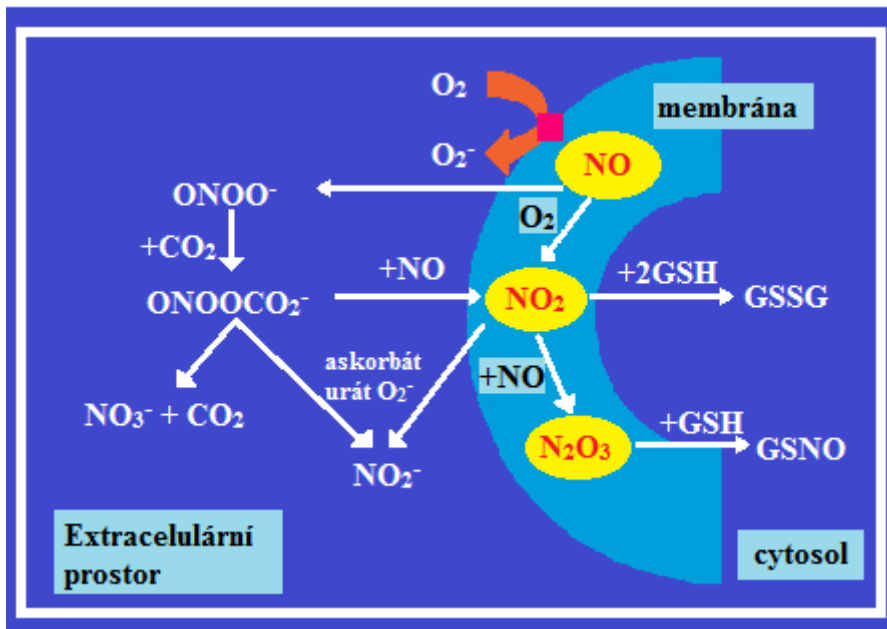
svalové hmoty), na zlepšení sexuálního výkonu u mužů a zvýšení sexuální vzrušivosti u žen, jako pomoc s hubnutím (Ignarro, 2005).



Obr. 5 Tvorba NO z L-argininu NO – syntázou (<http://fblt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/12-metabolismus-aminokyselin/>)

4.7 Odbourání NO

Je řada způsobů, jak NO zaniká (obr. 6). Při některých vznikají netoxické produkty (NO_2^-), jindy silně oxidující a nitrosylující látky (ONOO^- , N_2O_3). Pro zánik NO je rozhodující vazba na hemoglobin a myoglobin, méně na jiné hem obsahující proteiny. Dále významnou roli hraje reakce NO se superoxidem na ONOO^- . Mezi hlavní producenty superoxidu patří NADPH oxidáza (NOX), xantinoxidáza (XO) a proces NOS uncoupling. Hlavním likvidátorem superoxidu je enzym superoxidodismutáza (SOD) (Racek, 2012).



Obr.6 Přeměny NO v organismu (ONOOCO_2^- = nitrosoperoxokarbonát, GSSG = gama-glutamylcysteinylglycin, N_2O_3 = oxid dusitý, NO = oxid dusnatý, NO_2^- = oxid dusičitý) (http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2012/LA0312/Oxiddusnaty_profRacek.pdf)

4.8 Detekce NO

Přesná detekce a kvantifikace oxidu dusnatého je rozhodující pro pochopení některých souvislostí a regulačních posloupností ve fyziologických a patologických procesech, na kterých se NO podílí (Bryan, 2007).

Diagnostické metody shrnuli v review Kupková a Beneš (2004). Oxid dusnatý je *in vivo* tvořen v malém množství a rychle reaguje s kyslíkem, thioley, hemoglobinem a jinými látkami. Proto je jeho existence velice krátká (3 – 5 s). Stanovit ho lze přímo nebo nepřímo z jeho produktů.

Přímá stanovení

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

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. Pro vysokou rychlost reakce NO s O₃ a citlivost detekce emitovaného světla je možné měřit hladinu NO v reálném čase, a to v plynné i v kapalně fázi. Lze stanovovat i oxidační produkty NO, ale až po převedení dusičnanů na dusitany (např. bakteriálními reduktasami nebo kadmiiem) a jejich redukci zpět na NO (v kyselém prostředí vzniká z dusitanu nitrosionový ion, který je možné

redukovat např. jodidem nebo dvojmocným vanadem na NO). Tato metoda je použitelná např. k měření NO ve vydechovaném vzduchu během konstantního výdechového proudu.

Elektrochemická (ampérometrická) detekce

Referenční elektroda je nejčastěji Ag/AgCl ponořená do 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 platinová elektroda je dnes nahrazována uhlíkovou elektrodou modifikovanou porfyrinem, která je potažená vrstvou Nafionu. Nafion je kationový iontoměnič odpuzující negativně nabitě ionty, např. NO_2^-). Využívána je i elektroda z polykrystalické platiny. Nejnovější přístroje jsou založeny na mikročipovém senzoru. Kalibrace NO senzoru je založena na vzniku oxidu dusnatého z dusitanu nebo na rozkladu donoru NO, či na užití standardního NO roztoku připraveného z plynného NO. Elektroda citlivá na NO byla např. použita k přímému měření NO in vivo v žaludeční mukózní vrstvě během ischemické reperfúze.

Elektronová spinová (paramagnetická) rezonance ESR (EPR)

Tato metoda je schopná identifikovat komplexy volných radikálů (nepárových elektronů) jako je například NO nebo superoxid. Po vložení látky s radikálem 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. 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 záchytu spinu, kdy reakcí radikálu s diamagnetickou látkou náchylnou k tvorbě komplexu vzniká radikál, který má delší biologický poločas, a tím i lepší detekovatelnost. NO tvoří komplex nejčastěji s přechodnými kovy (Fe_2^+), thioly nebo s reaktivními kyslíkovými centry. Pro zachycení NO se nejčastěji používá Fe_2^+ nebo hemoglobin.

EPR se využívá například na detekci NO v plynné fázi (například při měření NO v znečištěném ovzduší), v kapalně fázi je už detekce problematická. Při rovnovážném stavu (při

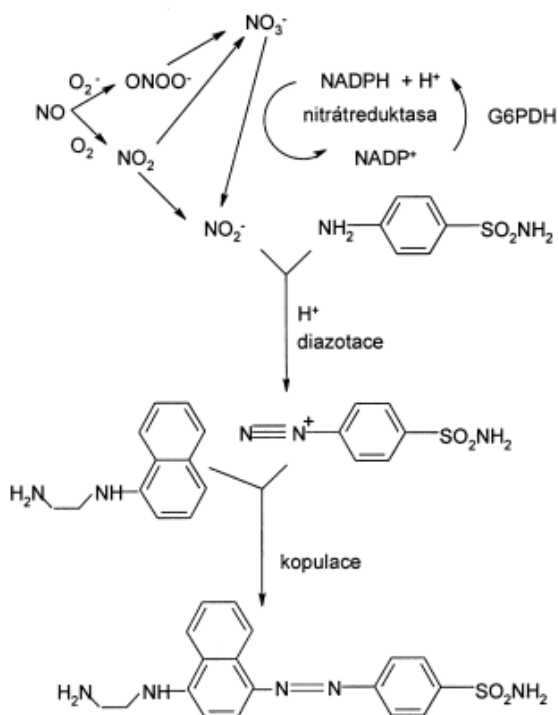
fyziologických podmínkách) je totiž množství NO v biologických systémech pod měřitelnou hranicí EPR (Bryan, 2007).

Nepřímá stanovení

Griessova metoda

Griessova metoda má hlavní princip v spektrofotometrickém stanovení dusitanů pomocí nitrátreduktázy a Griessova činidla. Hlavní reakcí je diazotace sulfanilamidu a kopulace s N-(1-naftyl)ethylendiaminem, kdy se dusičnany zredukuje na dusitany. V biologických vzorcích musí být dusičnany (vzniklé reakcí NO s hemoglobinem) zpět zredukovány na dusitany, které podléhají reakci, kterou je zajištěno stanovení celkové hladiny oxidačních produktů NO. Detekce probíhá při 540 nm.

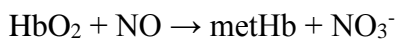
Při analýze séra musí být před stanovením provedena deproteinizace (např. ultrafiltrací). K redukci nitrátů se nejčastěji používá NADPH-dependentní nitrátreduktáza. Vyšší koncentrace NADP⁺ inhibuje Griessovu reakci. Proto se do reakční směsi přidává glukosa-6-fosfátdehydrogenáza a glukosa-6-fosfát, které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



Obr. 7 NO při Griessově reakci (http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_03_01.pdf)

Oxidace hemoglobinu

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



Výhodou reakce je její vysoká rychlost (až 26x rychlejší reakce než u autooxidace NO), nenáročnost provedení, možnost měření *in vivo* i *in vitro* a vysoká citlivost a specifčnost pro NO (Feelish et al., 1996).

NO je detegován díky charakteristické změně absorpčního maxima hemoglobinu z 415 nm na 406 nm. Měřit lze i konverzi oxhemoglobinu na redukovaný methemoglobin jako rozdíl absorbance při 401 nm a 411 nm (Kupková, Beneš, 2004).

Při měření chalkonů (prekurzory flavonoidů, u nichž ještě nedošlo k úplné cyklizaci na flavonoidní skelet) jako inhibitorů NO byla sledována tvorba methemoglobinu pomocí poklesu

absorbance oxyhemoglobinu při 576 nm. Detekční limit metody pro měření NO *in vivo* je 1-10 nm (Feelish et al., 1996).

Fluorescenční detekce

Pro fluorescenční detekci NO se užívají různé aromatické diaminy, např. naftalen-2,3-diamin (DAN) nebo 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), které v přítomnosti kyslíku 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 osvětlení.

Protože DAN je málo rozpustný ve vodě, není příliš vhodný pro měření biologických vzorků. Měření se provádí na fluorescenčním spektrometru nebo metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Detekční limit je 0,6 nm.

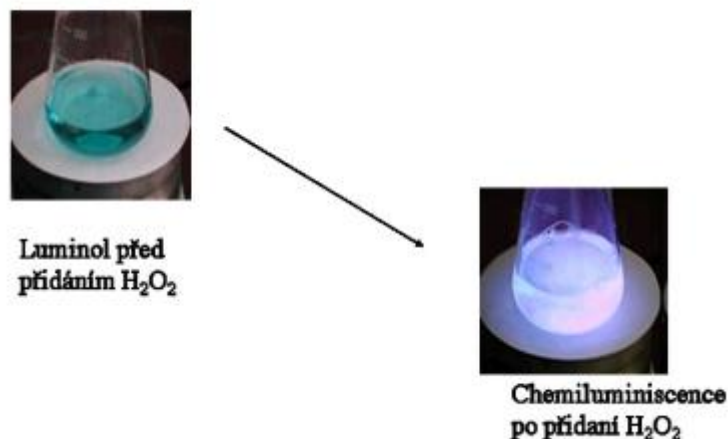
Chemiluminiscenční reakce NO s luminolem

Luminol 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.

Používá se metoda pro měření NO *in vivo*, kde je vzorek odebírán mikrodialýzou a detekce NO probíhá chemiluminiscenčně pomocí luminolu. Speciální mikrodialyzační 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.

Je užívána i metoda založená na spojení chemiluminiscenční detekce NO (peroxodusitanu) luminolem a průtokové injekční analýzy (FIA). 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.

Peroxodusitan může být k chemiluminiscenčnímu detektoru přiváděn dialyzační, vysoce selektivní membránou z acetátu celulosy. Metoda má vysokou citlivost.



Obr. 8 Chemiluminiscenční reakce luminolu a H₂O₂

<https://www.slideshare.net/kapildev0034/chemiluminescence-46544772>

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 iontoměnič, zatímco citrulin je eluován a měřen scintilačním počítačem.

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

Analýza dusitanů a dusičnanů metodou HPLC

Pro současné měření dusitanů i dusičnanů v plazmě byla vypracována metoda HPLC (vysokotlaká kapalinová chromatografie) s detekcí spektrofotometrickou nebo elektrochemickou. Chromatografie je separační a zároveň analytická metoda, která dává

kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Jsou 2 typy HPLC metod. Jedna normální HPLC, která je charakteristická tím, že stacionární fáze je pomalejší než fáze mobilní. Druhá reverzní HPLC, u které je pomalejší naopak fáze mobilní. Jsou využívány 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.

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.

Další metoda HPLC je založena na nitrosaci dusitanu a N-acetyl-L-cysteinu na N-acetyl-S-nitroso-L-cystein.

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

Ostatní metody

Pro detekci plynného NO se používá hmotnostní spektrometrie, pro detekci dusitanů plynová chromatografie, případně kombinace plynové a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Pro analýzu a detekci vazeb NO se užívá infračervená spektrometrie. Dusitany a dusičnany se dají stanovit také kapilární elektroforézou, případně polarograficky (Kupková, Beneš, 2004).

5 Závěr

Oxid dusnatý je signální molekula, která je důležitá ve fyziologických procesech lidského organismu. NO má funkci neurotransmiteru, účastní se obrany organismu při ateroskleróze, vysokém krevním tlaku, diabetu, septickém šoku, reguluje průtok krve v těle, má protinádorové účinky a účastní se téměř ve všech orgánových systémech.

Ovšem oxid dusnatý musí být vždy ve správné koncentraci a dávce, jelikož vysoká koncentrace může působit toxicky. Tyto procesy jsou velmi složitě regulovány. Existuje spousta faktorů, jejichž úloha není dostatečně objasněna.

Výzkum oxidu dusnatého je důležité dále využívat v léčbě, například chronických onemocnění respiračního systému a kardiovaskulárního systému. Dále k vývoji léků, které budou zesilovat schopnost NO omezit nebezpečí například vzniku mozkové mrtvice, Alzheimerovy choroby, vředů, močové inkontinence. To vše naznačuje budoucnost ve výzkumu této velmi zajímavé molekuly.

6 Seznam použité literatury

- Ambrosino, A., Russo, D., Lamanna, C., Assisi, L., Rizzo, M., Vittoria, A., Cecio, A. 2003. Isoforms of nitric oxide synthase in the pig testis. *Acta Veterinaria Brno*. p. 72. ISBN: 493–498.
- Bates TE, Loesch A, Burnstock G and Clark JB, 1996, Mitochondrial nitric oxide synthase: A ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 40-44
- Bian K., Murad F. 2003. Nitric oxide (NO) – Biogenesis, regulation and relevance to human diseases. *Frontiers in Bioscience*. 8. 264 - 278.
- Boggs DR, Hyde F, Srodes C, 2000, An unusual pattern of neutrophil kinetics in sickle cell anemia, *Blood* 41, 59-65
- Bredt D. S., Hwang P. M., Glatt C. E., Lowenstein C., Reed R. R., Snyder S. H. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resemble cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 351. 714 – 718
- Bredt DS, Snyder SH, 1990 Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 682-685
- Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M., Snyder, S. H. 1991. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal 35 populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*. 7. p. 615–624.
- Broulíková, A. 2011. Diabetes mellitus a cévní onemocnění. *Interní Medicína*. 13(5). 199 –201.
- Bryan NS, Grisham MB. 2007. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. *Free Radic Biol Med*; 43(5): 645–657.
- Bryan, N. S., Calvert, J. W., Elrod, J. W., Gundewar, S., Ji, S. Y., Lefler, D. J. 2007. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. p. 104. ISBN: 19144–19149
- Buhimschi, I., Ali, M., Jain, V., Chwalisz, K., Garfield, R. E. 1996. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction*. 11. p.1755–1766.
- Dijkstra G, van Goor H, Jansen PL, Moshage H. 2004. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Investig Drugs*;5(5):529-36.
- Dixit V. D., Parvizi N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science*. 65. 1 – 16
- Donald JA, Broughton BRS, 2005, Nitric oxide control of lower vertebrate blood vessels by vasomotor nerves, *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 137, 21-31

- Feelish M, Schmidt H, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham D, 1996, No NO from NO synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14, 492-14,497
- Furchgott, R. F., Zawadski, J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)*. p. 228. ISBN: 373– 376.
- Ganong, W., & Naňka, O. 2005. *Přehled lékařské fyziologie*. (20. vyd., xx, 890 s.) Praha: Galén
- Griffith O. W., Stuehr D. J., 1995, Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 707-736
- Hattori Y, Xie L, Gross SS, Tume N, 2000, The preferred source of arginine for high-output nitric oxide synthesis in blood vessels, *Semin Perinatol*, 24:42-45
- Hemmens B, Mayer B, Woschitz S, Pitters E, Klosch B, Volker C, Schmidt K, 1998, The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase: characterization of its action on pure nitric oxide synthase 430:397-400
- Himashree G, Dass D, Banerjee PK, Selvamurthy W. 2003. Nitric oxide and the respiratory system. *Curr Sci*; 85(5): 607-614.
- Ignarro, L. J. Furchgott R. F, Murad F., 1999. Nitric oxide: A unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Bioscience Reports*. p. 19. ISBN: 51–71. *Brazilian Journal of Medical and Biological Res.* 32 (11). 1367-79.
- Ignarro, L. J. 2005 *Program Ano – NO, skutečný zachránce života*. Práh. Praha. 198str. ISBN: 80–7252–113–6.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, M. L. 1997. Hormonal regulativ of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. p. 137. ISBN: 460–468.
- Jablonka-Shariff, A. and M. Olson. 2000. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 55:412-421.
- Jaing Y, Singh AK, Kannan MS, Johnson DE, Shew RL. 1996. Isolation of nitric oxide synthase in the rat uterus. *Life Sci*; 58: 1009–1014.
- Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD, 1992, Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium derived relaxing factor nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 267, 15274-15276
- Kim H., Moon C., Ahn M., Lee Y., Kim H., Kim S., Ha T., Jee Y., Shin T. 2005. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *Journal of Veterinar Sciences.* 6(2). 97-101.
- Kone BC. 1999. Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol*; 19(3): 230-241.

- Král, B. 1998. Inhalace oxidu dusnatého v terapii plicní hypertenze. Lékařská Zpráva LF UK Hradec Králové. 43. č.7-8, 141-144.
- Kupková Z., Beneš L. 2004. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. Chemické Listy. 98. 116 - 122.
- Loukotová J, Kunes J, Zicha J, 2002, Gender-dependent difference in cell calcium handling in VSMC isolated from SHR: the effect of angiotensin II. J Hypertens 20:2213-2219
- Mason RP, Cockcroft JR. 2006. Targeting Nitric Oxide With Drug Therapy. J Clin Hypertens;4(8/12):40–52.
- Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. 1991. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacology Review. p. 43. ISBN: 109–142.
- Murad F., Barber R., 2009, A hypothesis about cellular signaling with nitric oxide in the earliest life forms in evolution, Free Radic Biol Med. 47, 1325-1327
- Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB Journal. p. 6. ISBN: 3051–3064.
- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxation factor. Nature. p. 327. ISBN: 524– 526.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S., Moncada, S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 333. 664-666.
- Racek, J. 2012. Oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sirovodík - jedovaté plyny či potřebné regulátory metabolismu? Labor aktuell. 3. s. 14-17. ISSN: 1214-7672.
- Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. 2004. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. Physiol Res; 84: 731-765.
- Rosselli M., Keller P. J., Dubey R. K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, fysiologie and pathophysiology of reproduction. Molecular Human Reproduction. 4 (1). 3 – 24.
- Rosselli, M., Dubey, R. K., Imthurn, B., Macas, E., Keller, P. J. 1995. Effect of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. Human Reproduction. 10. 1786–1970.
- Saleh A. R., Agarwal A. 2002: Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. Journal of Andrology6, 737-752.
- Sharma SP. 2004.Nitric oxide and the kidney, Indian J Nephrol;14: 77-84.
- Strijdom H, Chamane N, Lochner A. 2009. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. Cardiovasc; 20(5):303-10.
- Stuehr D. J. 1999. Mammalian nitric oxide synthase. Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics. 1411. 217 – 230.

- Su Y, Kondrikov D, Block ER, 2005, Cytoskeletal regulation of nitric oxide synthase. *Cell Biochem. Biophys.* 43, 439-449
- Suschek C, Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Enezmann J, Rothe H, 1993, Induction of a macrophage like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells, *J. Immunol*, 151, 3283
- Tesfaye D., Kadanga A., Rings F., Bauch K., Jennen D., Nganvongpanit K., Holker M., Tholen E., Ponsuksili S., Wimmers K., Montag M., Gilles M., Kirfel G., Herzog V., Schellander K. 2006. The Effect of Nitric Oxide Inhibition and Temporal Expression Patterns of the mRNA and Protein Products of Nitric Oxide Synthase Genes During In Vitro Development of Bovine Pre-implantation Embryos. *Reproduction in Domestic Animals.* 41. 501–509.
- Vácha, J. 2002. *Patologická fyziologie.* (1. vydání., 271 s., Editor Hassan Farghali). Brno: Masarykova univerzita.
- Viaro F, Dalio MB, Evora PR, 2000, Catastrophic cardiovascular adverse reactions to protamine are nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate dependent and endothelium mediated: Should methylene blue be the treatment of choice? *Chest.* 122, 1061-1066
- Weitzberg E. 2005. L-arginine transport and sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand*; 49: 434- 436.
- Wu G, Morris SM. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem*; 336: 1–17.
- Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. 1996. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod*; 55: 935–941