

Oxid dusnatý a jeho význam pri poškodení tkaniva a v reparácii

Ľubica Bernátová¹, Pavol Janega^{1,2}

¹Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

²MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Nitra

Oxid dusnatý je molekula s významným pleotropným účinkom v organizme, schopná pôsobiť ako voľný radikál a súčasne aj ako biologická signálna molekula. Zaradujeme ju medzi dôležitých mediátorov fyziologických, ale i patologických dejov. Aj keď má kľúčový význam pri poškodení tkaniva a rozvoji zápalu, významný je jej efekt na aktiváciu reparačných procesov v tkanive. Regulačný účinok NO má svoju úlohu pri obnovení integrity poškodeného tkaniva. Súčasný výskum naznačuje budúcnosť terapeutických postupov ovplyvňujúcich regulácie sprostredkované NO pri liečbe mnohých chorôb vrátane ischemicko-reperfúzneho poškodenia tkaniva, ako aj diabetickej nohy.

Kľúčové slová: oxid dusnatý, poškodenie tkaniva, reparácia, NO syntázy

Nitric oxide and its importance in tissue damage and repair

Nitric oxide is a molecule with a significant pleiotropic effect in the body, capable of acting as a free radical and at the same time as a biological signalling molecule. It is one of the critical mediators of both physiological and pathological processes. Although it is crucial in tissue damage and the development of inflammation, its effect on the activation of tissue repair processes is significant. The regulatory effect of NO has a role in restoring the integrity of damaged tissue. Current research suggests a future for therapeutic approaches affecting NO-mediated regulation in treating many diseases, including ischemia-reperfusion tissue injury and diabetic foot.

Keywords: nitric oxide, tissue damage, repair, NO synthase

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 92 – 95

Úvod

Z historického hľadiska je za objaviteľa oxidu dusnatého (NO) považovaný anglický filozof a chemik Joseph Priestley, ktorý už v roku 1772 identifikoval túto molekulu a opísal jej vlastnosti. Avšak historický prelom v ére NO nastal až v 20. storočí v súvislosti s výskumom úlohy NO v živých organizmoch. V roku 1992 označil časopis Science túto molekulu za „molekulu roka“. Dňa 10. decembra 1998 sa Robert Francis Furchgott, Louis Ignarro a Ferid Murad stali nositeľmi Nobelovej ceny za objav NO ako signálnej molekuly v kardiovaskulárnom systéme. Toto ocenenie vzbudilo veľký záujem o výskum tejto molekuly, a tak sa NO, dovtedy známy len ako plyn s negatívnym vplyvom na životné prostredie dostal do popredia odborných periodík a významných časopisov⁽¹⁾.

V súčasnosti je úloha NO v mnohých systémoch vrátane kardiovaskulárneho, endokrinného aj centrálného nervového systému. Molekula má význam v terapii infarktu myokardu a pri liečbe mnohých ischemických cievnych chorôb vrátane diabetickej nohy. Štúdie potvrdzujú jeho pozitívny účinok v liečbe chronických rán a pri ovplyvnení ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu^(2,3).

Všeobecná charakteristika oxidu dusnatého

NO je molekula, ktorá má duálny charakter, schopná v organizme vystupovať ako voľný radikál a súčasne aj ako biologická signálna molekula. Najvýznamnejšou odlišnosťou NO od iných biologických mediátorov je jeho schopnosť ľahko difundovať cez membrány. Je schopná priamo ovplyvňovať

bunky v bezprostrednej blízkosti svojej syntézy bez ohľadu na anatomické prepojenie⁽⁴⁾.

Syntéza NO je komplexná chemická reakcia, ktorá je katalyzovaná prostredníctvom bunkových NO syntáz (NOS)⁽⁵⁾. V súčasnosti je opísaných 5 izoformiem, avšak pre ľudský organizmus sú najvýznamnejšie tri: neuronálna NOS1, indukčná NOS2 a endotelová NOS3⁽⁶⁾.

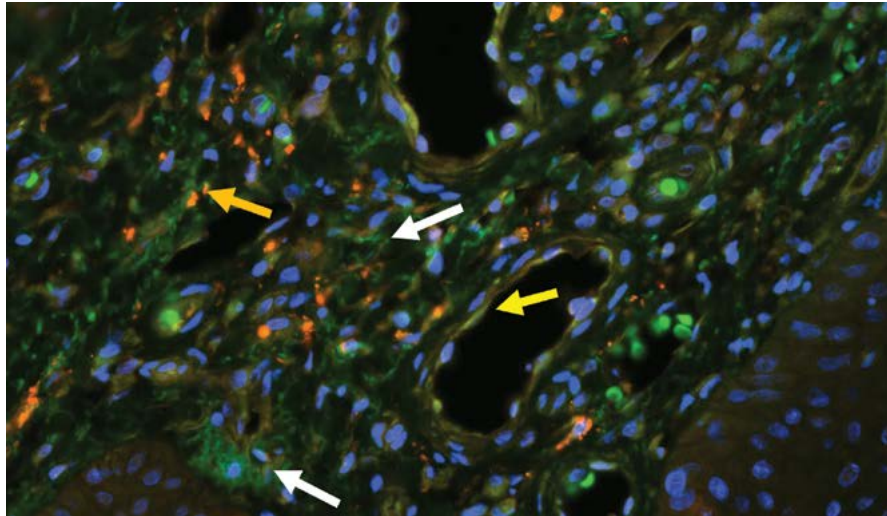
NOS1 bola identifikovaná v bunkách centrálného a periférneho nervového systému, v bunkách sietnice, myokardu a kostrového svalstva⁽⁵⁾. Zodpovedá za väčšinu celkovej produkcie NO v nervovom systéme, ktorá je nevyhnutná pre synaptický prenos a neuroplasticitu. Dnes už existujú dôkazy, ktoré naznačujú, že NOS1 sa podieľa na rozvoji niektorých patologických procesov v centrálnom nervovom systéme. Závislosť medzi expresiou NOS1 a ochoreniami však ostáva dodnes do veľkej miery neznáma a predmetom ďalšieho skúmania⁽⁷⁾.

NOS3 je veľmi dôležitá pre produkciu NO v bunkách endotelu, a preto má rozhodujúcu úlohu v kardiovaskulárnom systéme⁽⁶⁾.

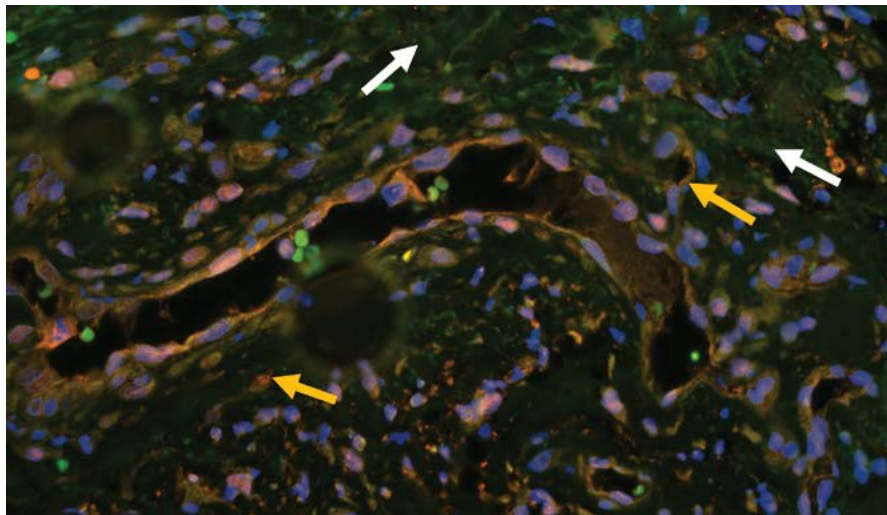
Veľké množstvo chorôb má zápalovú zložku, jedným z mediátorov aktivácie imunitného systému a zápalu je **NOS2**. Dysregulácia alebo jej nadmerná aktivácia spôsobí rozvoj patologických procesov v organizme. Podieľa sa na vzniku a progresii nádorových chorôb, neurodegeneratívnych zmien, aterosklerózy, má význam v sepe a pociťovaní bolesti. Snaha ovplyvniť syntézu NO je predmetom výskumu. Bolo objavených mnoho inhibítorov, ktoré sú účinné v štúdiách na zvieratách, avšak nie vždy preukázali svoju účinnosť v humánnej

Obrázok 1. Aktivácia NO syntáz v granulačnom tkanive počas reparácie. Počas reparácie dochádza k aktivácii expresie NOS2 tak v bunkách sprievodného zápalu (biela šípka), ako aj vo fibroblastoch a endotelových bunkách (žltá šípka) novotvorených ciev. V neskorších štádiách reparácie produkcia NOS2 klesá a je sprevádzaná vzostupom pravidelnej pozitivity NOS3.

A Skoré štádium reparácie



B Neskoré štádium reparácie



medicíne. Pochopenie regulácií tvorby a pôsobenia NO je nevyhnutné pre potenciálne využitie v liečbe⁽⁸⁾.

Mechanizmy pôsobenia NO

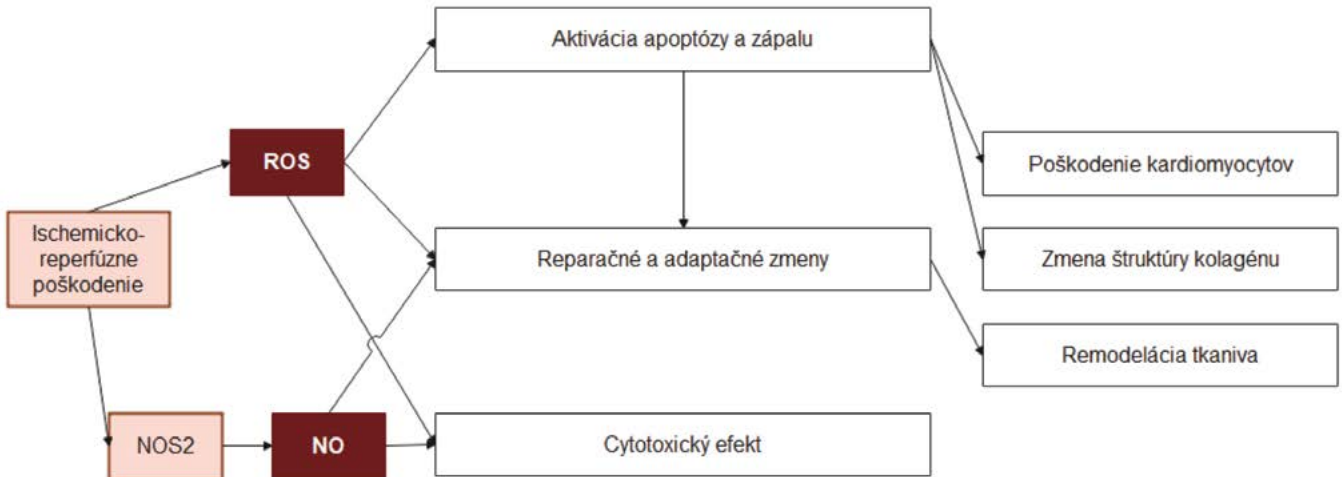
NO zaraďujeme medzi dôležité mediátory fyziologických, ale i patologických procesov. Ide o lipofilnú, chemicky reaktívnu molekulu s krátkou životnosťou. NO je molekula, ktorá môže pôsobiť priamymi a nepriamymi účinkami. Priame účinky sa vyskytujú najmä medzi NO a špecifickými biologickými molekulami, zatiaľ čo nepriame sú zabezpečené prítomnosťou reaktívnych foriem oxidov dusíka. Štúdie, ktoré podrobne opísali mechanizmus priamych a nepriamych účinkov na molekulovej úrovni, predstavovali neskôr podklad pre lepšie pochopenie zapojenia NO vo fyziologických a patologických procesoch⁽⁹⁾.

Priamy účinok môže byť zabezpečený dvomi mechanizmami, a to priamou interakciou na bunkovej úrovni alebo cestou aktivácie rozpustnej guanylátcyklázy a následne prostredníctvom druhého posla – cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP)⁽¹⁾. Priamy účinok NO vyplýva z jeho syntézy

v bunkách a následného uvoľňovania do okolia difúziou. Tento pasívny transport môže byť ovplyvnený viacerými faktormi, ako je napr. pôsobenie rôznych mediátorov alebo depolarizácia membrány⁽¹⁰⁾. NO prechádza hlavne cez membrány buniek, kde pôsobí ako signálna molekula, a vedie k zmene funkcie cieľových proteínov a taktiež biologických procesov⁽¹⁾.

Nepriamy účinok mnohí autori označujú aj ako účinok sprostredkovaný voľnými radikálmi, resp. tzv. cytotoxický účinok. V súčasnosti je možné nepriame účinky NO rozdeliť do dvoch kategórií, a to na účinky vyvolané nitrozačným stresom a na účinky spôsobené oxidačným stresom⁽¹¹⁾. Kým nitrozačný stres môže za splnenia určitých podmienok vyvolať tvorbu karcinogénnych nitrozamínov, oxidačný stres je, naopak, opísaný v patogenéze rôznych chorôb, pre ktoré je charakteristická prítomnosť chronického zápalu⁽¹⁾. V ľudskom organizme má molekula NO kľúčovú úlohu pri regulácii fyziologických funkcií, akými sú najmä prenos nervových vzruchov, udržiavanie homeostázy a vazodilatácia. Za patologických podmienok môžu jeho vyššie koncentrácie pôsobiť

Obrázok 2. Schematický náčrt úlohy NO v procesoch poškodenia tkaniva a v reparačno-adaptačných zmenách.



antibakteriálne, antivírusovo a antiparazitárne. Tieto koncentrácie však môžu pôsobiť aj škodlivo v dôsledku prozápalového účinku NO⁽¹⁾, čo môže mať priamy vplyv na rozvoj mnohých chorôb⁽¹²⁾. Aby bolo možné ovplyvňovať negatívne a škodlivé účinky tohto mediátora, je potrebné dôkladne poznať mechanizmus syntézy a pôsobenia NO na jednotlivé orgánové systémy, venovať mu dostatočnú pozornosť a tak poznať jeho zapojenie vo fyziologických a patologických procesoch⁽¹⁾.

Ischemicko-reperfúzne poškodenie tkaniva

Ischémia a následná reperfúzia poškodeného tkaniva predstavujú procesy, ktoré prispievajú k chorobnosti a zvyšovaniu mortality v širokej škále akútnych stavov. Medzi takéto akútne stavy patrí najmä ischemická cievna mozgová príhoda, akútny infarkt myokardu, rôzne traumy, akútne poškodenie obličiek a ďalších tkanív⁽¹³⁾.

Je známy súvis s rizikovými faktormi ischemického poškodenia a endotelialnej dysfunkcie spojenej s nedostatkom NO. Fyziologické koncentrácie NO syntetizované NOS3 regulujú cievny tonus a majú v srdci kardioprotektívny účinok. Avšak počas ischemicko-reperfúzneho poškodenia sa v myokarde spúšťa kaskáda procesov, ktorých výsledkom je znížená biologická dostupnosť NO syntetizovaného NOS3. Cytotoxický účinok produkovaného NO a s N súvisiacich voľných radikálov je jednou z príčin poškodenia tkaniva⁽¹⁴⁾. Práve vyčerpanie tetrahydrobiopterínu (BH4), ktorý je dôležitým kofaktorom NO-syntáz, vedie k dysfunkcii NOS3 a k zvýšenej tvorbe voľných kyslíkových radikálov počas ischemicko-reperfúzneho poškodenia. Nekontrolovaná tvorba NO pomocou NOS2 poškodzuje kardiomyocyty priamou cytotoxicitou alebo prostredníctvom peroxynitritu, ktorý vzniká reakciou NO a superoxidového radikálu⁽¹⁵⁾.

NO má aj priamy vplyv na funkciu myokardu, ovplyvňuje koronárny obeh, vedie k vazodilatácii a zníženiu agregability trombocytov. NO priamo pôsobí na kardiomyocyty, ovplyvňuje apoptózu, zlepšuje prežívanie buniek⁽¹⁶⁾. Kardioprotektívny účinok na myokard zabezpečuje NO svojím antihypertroficným účinkom a zvyšovaním ischemickej tolerancie, znižuje kontraktilnú frekvenciu kardiomyocytov, mierne znižuje intenzitu kontrakcie a urýchľuje relaxáciu⁽¹⁾.

Predpokladá sa, že signalizácia NO proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu je zameraná na mitochondrie a práve mitochondrie sú cieľom jeho kardioprotektívneho účinku. Ak je signálna dráha NO inhibovaná alebo nejakým iným mechanizmom narušená, tak mechanizmus preconditioningu prostredníctvom NO zmizne⁽¹⁷⁾.

Úloha NO v procesoch reparácie

Aj keď má NO kľúčový význam pri poškodení tkaniva a rozvoji zápalu, je dobre opísaný aj jeho efekt na aktiváciu reparačných procesov v tkanive. Regulačný účinok NO má význam pri obnovení integrity tkaniva. NO uvoľňovaný v reparovanom tkanive prostredníctvom NOS2 a NOS3 reguluje tvorbu kolagénu a proliferáciu buniek na zvieracích modeloch hojenia rán. Delécia génu pre NOS2 spomaľuje hojenie a, naopak, experimentálne podávanie arginínu so zvýšenou produkciou NO zlepšuje procesy hojenia⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Podávanie arginínu v potrave zvyšuje pevnosť rany a ukladanie kolagénu, čo však neplatí v prípade zvierat s deléciou NOS2 génu. Strata funkčného génu NOS2 ruší priaznivý účinok arginínu pri hojení rán⁽²¹⁾.

Aj z týchto dôvodov sa považujú donory NO za potenciálne terapeutické látky v procesoch hojenia rán. Synergicky môže pôsobiť aj schopnosť oxidu dusnatého regulovať zápal a eradikovať bakteriálne infekcie. NO v experimente inhibuje rast *Stafylococcus aureus* (MRSA) a *Pseudomonas aeruginosa* rezistentných proti metilínu bez toho, aby pôsobil cytotoxicky na ľudské bunky⁽²²⁾. Začlenenie NO do polymérov pri výrobe polymérových gélov, obväzov a chirurgických materiálov má potenciálne výhody pri hojení rán. Štúdie ukazujú, že aplikácia NO zlepšuje aj vaskularizáciu rán, pričom toto zistenie by mohlo mať výrazný potenciál aj pri liečbe mnohých ďalších chronických chorôb⁽²³⁾. V tejto súvislosti je zaujímavá aj možnosť liečby rán spojených s cukrovkou vrátane diabetickej nohy⁽²⁴⁾. NO môže byť na diabeticke rany aplikovaný buď ako plyný NO, alebo môžu byť aplikované donory NO v obväzoch alebo polymérových géloch s postupným uvoľňovaním NO⁽³⁾. Cieľom výroby krycích materiálov s obsahom NO je využiť jeho potenciál pri hojení rán reparáciou.

Záver

Oxid dusnatý je molekula s významným pleotropným účinkom v organizme. Aj keď sa podieľa na progresii poškodenia tkanív, a to najmä v prípadoch jeho nekontrolovanej tvorby a aktivácie voľnoradikálového poškodenia prostredníctvom voľných radikálov odvodených od dusíka organizmu, predstavuje na druhej strane kľúčovú molekulu regulujúcu procesy obnovy poškodeného tkaniva a reparácie. Mnohé vedecké štúdie sú preto zamerané na využitie NO ako účinnej terapeutickú látku v liečbe ochorení a potvrdzujú pozitívny účinok donorov NO v terapii chronických rán a ischemicko-reperfúzneho poškodenia.

Podakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-17-0526 a vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Antosova M. Farmakológia oxidu dusnatého. 2013; Martin: Univerzita Komenského v Bratislave Jesseniova lekárska fakulta v Martine.
2. Gawrys J, Gajeci D, Szahidewicz-Krupska E, et al. Intraplatelet L-Arginine-Nitric Oxide Metabolic Pathway: From Discovery to Clinical Implications in Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 1015908.
3. Malone-Povolny MJ, Maloney SE, Schoenfisch MH. Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. *Adv Healthc Mater* 2019; 8(12): e1801210.
4. Kupkova Z, Benes L. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metódy detekcie biologického oxidu dusnatého. *Chem. Listy* 2004; 98: 116-122.
5. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide* 2010; 23(1): 1-11.
6. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* 2016; 575(2 Pt 3): 584-599.
7. Poon CH, Tsui KC, Chau SC, et al. Functional Roles of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Neurodegenerative Diseases and Mood Disorders. *Curr Alzheimer Res* 2021; 18(10): 831-840.
8. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 2020; 40(1): 158-189.
9. Kowalczyk E, Kopff A, Kopff M, et al. [Nitric oxide metabolism]. *Wiad Lek* 2006; 59(11-12): 889-893.
10. Klinger JR, Kadowitz PJ. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Vascular Disease. *Am J Cardiol* 2017; 120(8S): S71-S79.
11. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(1): 18-31.
12. Hirst DG, Robson T. Nitric oxide physiology and pathology. *Methods Mol Biol* 2011; 704: 1-13.
13. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17(11): 1391-1401.
14. Jugdutt BI. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Fail Rev* 2002; 7(4): 391-405.
15. Xiang M, Lu Y, Xin L, et al. Role of Oxidative Stress in Reperfusion following Myocardial Ischemia and Its Treatments. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 6614009.
16. Yue ZJ, Yu ZB. [Cardioprotection by the inhibitory effect of nitric oxide]. *Sheng Li Xue Bao* 2011; 63(3): 191-197.
17. Weerateerangkul P, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Roles of the nitric oxide signaling pathway in cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Monit* 2011; 17(2): RA44-52.
18. Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg* 2002; 183(4): 406-412.
19. Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, et al. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 1998; 101(5): 967-971.
20. Stechmiller JK, Childress B, Cowan L. Arginine supplementation and wound healing. *Nutr Clin Pract* 2005; 20(1): 52-61.
21. Shi HP, Efron DT, Most D, et al. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery* 2000; 128(2): 374-378.
22. Wang DC, Clark JR, Lee R, et al. Development of Antimicrobial Nitric Oxide-Releasing Fibers. *Pharmaceutics* 2021; 13(9).
23. Lowe A, Bills J, Verma R, et al. Electrospun nitric oxide releasing bandage with enhanced wound healing. *Acta Biomater* 2015; 13: 121-130.
24. Janegova A, Janega P. Impaired tissue repair is a concomitant feature of diabetes mellitus (pathophysiological study and case report). *Newslab* 2022; 13(1): 14-18.

Lubica Bernátová

Ústav patologickej anatómie LF UK
Sasinkova 17, 811 08 Bratislava
e-mail: bernatova31@uniba.sk