

OTKA zárójelentés Ny.szám: T 042704

A zárójelentés első részében cikkek formájában megjelent eredményeinket foglalom röviden össze. A második részben részletesebben ismertetem a nitroglicerinnél és más NO-származékokból történő NO felszabadítást igazoló kísérleti eredményeinket. Mivel intézetünk várhatóan 2008 nyarától költözködik új épületébe időmet és a feleségem betegsége majd halála után az OTKA-tól nagyvonalúan kapott 1 év hosszabbítást inkább kísérleti munkára és nem az eredmények prezentálására fordítottam. Szeretnék élni azzal a lehetőséggel, hogy a végső véleményt a munkáról 2 éves moratórium után, a várható további cikkek és leadott kéziratok ismeretében mondják ki.

A BH<sub>4</sub> autooxidációjának néhány jellemzője, az aszkorbát (ASC) és tiolok védő hatása

1. Az autooxidáció során azonos moláris arányban képződik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és kinoidális BH<sub>2</sub> (qBH<sub>2</sub>). A qBH<sub>2</sub> gyorsan tautomerizál BH<sub>2</sub>-vé, amit az ASC és GSH már nem képes BH<sub>4</sub>-é redukálni.
2. A BH<sub>4</sub> autooxidációját szuperoxid dizmutázzal (SOD) gátolni lehet. A gátlás még nagy SOD koncentrációk mellett sem teljes, így valószínű, hogy a szuperoxid képződésével induló autooxidációs út csak egy a lehetséges egyéb utak között.
3. Az ASC 22 C°-on viszonylag kis koncentrációban (100 μM) mintegy 50 %-os gátlást okoz a BH<sub>4</sub> autooxidációjában. A gátolt és nem gátolt reakciók Arrhenius féle aktiválási energiája azonos, az ASC 37 C°-on is ugyanolyan mértékben gátol mint 22 C°-on. Ez megerősíti azt az elképzelést, miszerint az O<sub>2</sub> és BH<sub>4</sub> viszonylag lassú reakcióját gyors ASC-dependens visszaredukció követi, a reakció-ciklus sebességmeghatározó lépése az oxidáció. Egy lehetséges út, amit irodalmi adatok is támogatnak, a •BH<sub>3</sub> gyök gyors reakciója ASC-al, ami BH<sub>4</sub>-et és aszkorbil gyököt, majd diszproporcionálódás eredményeképpen dehidroASC-ot és ASC-ot eredményez.
4. A GSH az ASC-nál 1 nagyságrenddel nagyobb koncentrációban (1 mM) gátolja 50 %-osan a BH<sub>4</sub> autooxidációját, 37 C°-on még így is sokkal kevésbé effektív mint 22 C°-on és jelenlétében az Arrhenius aktiválási energia nagyobb (kb. 90 kJ/mól) mint a BH<sub>4</sub> autooxidációjáé (kb. 60 kJ/mól). GSH jelenlétében a visszaredukció lassúbb mint az autooxidáció, ezért kell a tiolból nagyobb koncentráció a BH<sub>4</sub> stabilizálásához mint ASC-ból, ezért nagyobb GSH jelenlétében a sebességi konstans 37 C°-on mint 22 C°-on és nagyobb a GSH jelenlétében mért aktiválási energia. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a GSH fő támadáspontja a kinoidális BH<sub>2</sub>, a qBH<sub>2</sub> redukciója BH<sub>4</sub>-é lehet.
5. Eredményeink arra engedtek következtetni, hogy az ASC és a GSH fő támadáspontja nem esik egybe, előbbi elsősorban •BH<sub>3</sub> gyök, utóbbi a qBH<sub>2</sub> redukcióját végzi. Emellett szólnak annak a kísérletsorozatnak az eredményei, amelyben kimutattuk az 0.1-0.2-0.5-1.00 mM GSH és 100 μM ASC BH<sub>4</sub> stabilizáló hatásainak additív jellegét mind kataláz jelenlétében mind pedig anélkül.

Összefoglalva, ezek az eredmények az irodalomban párhuzamosan megjelent eredményekkel együtt arra mutatnak, hogy az ASC elsősorban a BH<sub>4</sub> autooxidációja során képződő •BH<sub>3</sub> gyököt redukálja vissza BH<sub>4</sub>-gyé és 100 μM ASC-al lehet a maximálisan ASC-al elérhető 50 %-os BH<sub>4</sub> védelmet elérni. Glutathion és egyéb tiolok elsősorban a qBH<sub>2</sub> → BH<sub>4</sub> redukciót teszik lehetővé, növekvő koncentrációban jóval 50 % feletti BH<sub>4</sub> védelmet biztosítanak de csak alacsonyabb hőmérsékleten. ASC mind test mind szobahőmérsékleten egyformán hatékony, a tiolok alacsony hőmérsékleten védenek kiváló hatásfokkal a BH<sub>4</sub> autooxidatív átalakulása ellen, testhőmérsékleten viszont veszítenek hatásosságukból.

Nitrozótiolok vizsgálata

Tanulmányoztuk a nitrozótiolok bomlását (feltehetőleg NO-ra és diszulfid vegyületre) ASC illetve tiol vegyületek hatására. Nitrozóglutationt (GS-NO) szintetizáltunk, a GS-NO pH 7.4-nél stabilnak bizonyult de ASC vagy egyes tiol vegyületek hatására bomlásnak indult, amit spektrálisan jól nyomon lehetett követni. ASC, 0.49 - 4.76 mM koncentráció tartományban fokozódó sebességgel bontja a GS-NO-t, a hatás kifejezett pH függést mutat, pH 6.2 és 8.6 között bázikus irányban haladva fokozatosan és jelentősen nő. Hasonló pH függést mutat a cisztein hatása (C-SH) is. Ditionitrol (DTT) igen hatékony a bomlás elősegítésében, GS-NO feleslegéhez adva 10-15 perc alatt teljesen felhasználódik a reakcióban. A DTT-NO spontán és gyorsan bomló nitrozótiol, erről bizonyítottuk, hogy belőle NO szabadul fel, ami ditionit jelenlétében pillanatok alatt megy végbe. Stabil nitrozótiolokból C-SH és/vagy ASC hatására NO szabadul fel, ami farmakológiai szempontból figyelmet érdemel.

Normális és kóros terhességekből nyert humán placenták aszkorbát és tiol tartalmának vizsgálata.

Vizsgálatainkban 60 normális terhességből, 11 preeclampsziás terhességből, 6 terhesség indukálta hipertóniás terhességből és 7 első trimeszteren belüli terhességből nyert placenta tiol (ami főleg glutation) és aszkorbát tartalmát hasonlítottuk össze. Az eredményeket  $\mu\text{mol} / \text{mg}$  DNS (tiol) illetve  $\text{nmol} / \text{mg}$  DNS értékekben (ASC) számítottuk és az átlagot  $\pm$  SE mennyiségeket adjuk meg.

A tiol tartalmak rendre:  $0.216 \pm 0.017$  ;  $0.231 \pm 0.026$  ;  $0.165 \pm 0.014$  ;  $0.276 \pm 0.038$

Az ASC tartalmak rendre:  $47.1 \pm 3.37$  ;  $85.1 \pm 24.2$  ;  $32.3 \pm 3.50$  ;  $88.8 \pm 17.0$

Ami figyelemreméltó ezekben az előzetes eredményekben az a terhesség indukálta hipertóniában mért alacsony tiol és ASC értékek. Amennyiben ez további mérésekkel alátámasztható, úgy az értágító NO szintézisét elősegítő  $\text{BH}_4$  stabilizáló vegyületek valamint az NO felszabadításra képes prodrogok utáni kutatás kórtani értelemben alátámasztást nyerhet.

Kataláz aktivitás mérésének ballítása perifériás vér, umbilikális vér és placentahomogenátum katalázaktivitásának mérésére

Mintát vettünk 20, 22-42 hetes terhes anya vénás vérből és 20 normál szülés utáni köldökvénás vérből. A kataláz aktivitás az umbilikális vérben átlagosan 29 %-al magasabb volt mint a perifériás vénás vérben, a különbség statisztikailag erősen szignifikáns. Ezekben a mérésekben az enzimaktivást  $\text{nmol}$  hemre vonatkoztattuk, így az esetleg eltérő vvt számot korrigáltuk. Az enzimaktivitást 1 ml vére vonatkoztatva, 19 %-os szignifikáns csökkenést kaptunk. Normális terhesség 8-ik (N =13), 17-ik (n =16), 25-ik (n = 11), 39-ik (n = 9) hetében nyer vérminták kataláz aktivitása nem különbözött egymástól. Kóros terhességekből nyert vérminták szerzése kis betegszám miatt még most is tart. Érdekesnek látszik hogy ezekben majd mind az anyai mind a fetális vér kataláz aktivitását tanulmányozzuk.

Megállapítottuk, hogy a hemoglobin csekély hidrogénperoxid-bontó aktivitással bír, ez nem zavarja a kataláz aktivitásának mérését hígított vérmintákban.

Mind koraterhes (első trimeszter) mind érett terhességekből származó placenták homogenátumának 1000 g felülszójában kimutattunk homogenátum- koncentrációtól arányosan függő kataláz aktivitást. A placenta-homogenátumhoz hozzákeveredett vért alapos pufferes mosással sem tudtuk teljesen eltávolítani, ezért az enzimaktivitás pontos meghatározásához megállapítottuk a „szennyező” vér koncentrációját a homogenátumban valamint a perifériás vér kataláz aktivitását, így a „szennyező” vér kataláz aktivitását ki tudtuk

számítani és a homogenátumok aktivitását erre korrigálni lehetett. Módszerünkkel készen állunk kóros terhességekből nyert placenták katalázaktivitásának vizsgálatára. Megállapítottuk, hogy mind a terhesek teljes véreinek mind a koraterhes placenták homogenátumának kataláz aktivitása 3-amino,1,2,4-triazollal koncentráció-függően gátolható, a gátlószerrel szemben a placenta homogenátumok kataláz aktivitása lényegesen érzékenyebb mint a perifériás vér aktivitása. Glicerilnitrát (0.48 mM), ditioneitol (1 mM), és N-etilmaleimid (5 mM) az enzimaktivitást nem befolyásolták

Nitrogén monoxid (NO) felszabadítása glicerilnitrátból (GTN) ditionittal illetve aszkorbáttal, NO képződés nitritből és nitrozótiolból

A GTN-ből a szervezetben felszabaduló hatóanyag az értágító hatású nitrogén monoxid (NO). Az NO szervezetben történő felszabadulását nem az észter hidrolízisével hanem redukáló vegyületekkel lehet elérni. Kémiaiilag ezek két lépésben hatnak, először nitrit ion szabadul fel majd a nitrit ionból az NO. A két lépés nem egyforma redukciós hatást igényel, a nitrit felszabadítás enyhébb redukcióra is végbemegy, a nitritből történő NO képzés erősebb redukciót igényel ( $\text{NO}_2 + \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{NO} + \text{OH}^-$ ). Ezért a GTN-ből történő NO képzés függ a redukálószer minőségétől és jellegzetesen a koncentrációjától. Az NO élettani hatásai is jelentős koncentrációfüggést mutatnak, nagyobb koncentrációi az értágító hatáson kívül immunológiai, idegrendszeri és apoptotízist indukáló hatásokat is kiválthatnak. A GTN-ből történő NO képzés kvantitatív és kinetikai vizsgálata különböző körülmények között, nem megoldott, mert megbízható, viszonylag egyszerűen kezelhető módszer nem áll rendelkezésre. Jól ismert viszont az NO komplexképzési hajlama deoxihemoglobinnal (deHb) és ugyancsak ismertek a hemoglobin és élettanilag fontos származékainak (oxihemoglobin:  $\text{HbO}_2$ , deoxihemoglobin: deHb, methemoglobin: metHb, nitrozil-hemoglobin: NOHb) spektrális tulajdonságai, a hemoglobin ún. Soret sávjainak ezen származékokban bekövetkező változásai. A hemoglobin spektrális viselkedésének tanulmányozása alapján alkalmasnak látszott a GTN  $\rightarrow$  NO átalakulás vizsgálatára. Korábbi OTKA-támogatott kutatásaink eredményeit felhasználva, az OTKA műszervásárlási támogatás keretében már biztosított Hitachi U-2001, sorozatos spektrumfelvételre alkalmas spektrofotométer segítségével, az 5.-ik évre maradt OTKA keretből finanszírozható eszköz és vegyszervásárlásokkal sikerült a korábbról fennmaradt kérdések többségét megválaszolni, és egy jelentősebb, OTKA kutatási ciklusokon átnyúló kutatási programot végigvinni.

Kísérleteinkben 2 hullámhossz-tartományban (400-450nm és 450-720nm) mértük a spektrális változásokat, a metHb (csúcs: 405 illetve 630nm), a  $\text{HbO}_2$  (csúcs: 415 illetve 540 és 575 nm), a deHb (csúcs: 430 illetve 555 nm) valamint a NOHb (csúcs: 417 illetve 545 és 570nm) mindkét tartományban jellemző spektrumot ad. Különösen fontos volt az NOHb biztos identifikálása, ezt az tette lehetővé, hogy az első tartományban a spektrumfelvétel 1 nm -énti abszorbancia (OD) mérésekkel történt, a második tartományban pedig az NOHb spektruma alakjánál fogva biztosan elkülöníthető a  $\text{HbO}_2$  spektrumától, a csúcsabszorpciókban megjelenő kis eltérés csak megerősítésként szolgált.

Hemoglobin készítményként hemolizált és erősen hígított, oxigenizált humán vénás vért (gyakorlatilag  $\text{HbO}_2$ -t tartalmaz) és kereskedelemben beszerezhető tisztított bovin hemoglobint használtunk (a kereskedelmi tisztított humán hemoglobint tökéletlen oldódása miatt nem tudtuk használni) 4, esetenként 12  $\mu\text{mol/l}$  végkoncentrációban.. A bovin hemoglobin 0.2 M pH 7.4 HEPES-sel pufferelt oldatainkban kiválóan oldódott és gyakorlatilag 100 %-ban metHb-nak bizonyult. Kísérleteinket mindkét preparátummal elvégeztük, a hemoglobin származékok viselkedését tekintve nem találtunk különbségeket.

A bovin metHb a kísérleteinkben használt redukálószer hatására deHb-á alakult át, ami a médiumban oldott O<sub>2</sub> -vel HbO<sub>2</sub> -t képzett. Másrészt a közeg oldott O<sub>2</sub> koncentrációjának csökkentésével a HbO<sub>2</sub> deHb-á alakítható, így mind a humán mind a bovin deHb in situ létrehozható. Mindez lehetővé tette analóg kísérletek végzését akár híg humán hemolizált vérből, akár bovin metHb-ből indultunk ki.

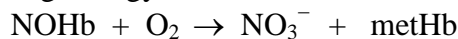
Kísérleteinkben spektrum sorozatokat vettünk fel 1-6 órán át, méréseinket szobahőn (23-24 C°) végeztük, egyes esetekben 37 C° -on is megismételtük a kísérletet. Hatóanyagokat a mérés 0.-ik percében illetve a mérés során adtuk a rendszerhez, 1 %- nál jelentősebb térfogatváltozás esetén az OD értékeket a higulásra korrigáltuk. A spektrális változások alapján az egyes hemoglobin származékokra jellemző abszorpciós maximumok és egyes arányok valamint relatív és százalékos értékek változását folyamat-ábrán ábrázoltuk, ami a kiértékelést, a reakciók kinetikájának megértését megkönnyítette. Számításainkat, spektrális és folyamatábráinkat általunk beállított komputer-programmokkal végeztük illetve készítettük. Méréseinket nitrit, tiol és aszkorbinsav meghatározásokkal egészítettük ki.

Modelkísérletek ditionittal.

A ditionit viszonylag erős redukálószer, a molekuláris oxigénnel is gyorsan reagál, az O<sub>2</sub> oldatból való eltávolítására használható. Másrészt, talán éppen az O<sub>2</sub>-vel végbemenő gyors reakciója miatt és ha az oldott oxigén pótlására lehetőség van az oldatban koncentrációjától függően gyorsan bomlik. GTN-el inkubálva a ditionit, koncentrációtól függő és időarányos mértékben nitritet tesz szabaddá, a nitrit további redukciója gyorsan NO-t eredményez, ezért mérési rendszerünk beállítására megfelelő modelvegységnek kínálkozott. Fontos körülmény hogy a ditionit a hemoglobin és származékai Soret sávjaiban nem mutat abszorpciót, ezért a spektrumanalíziseket nem zavarja

A.) Inkubálás glicerilnitráttal (GTN, nitroglicerin)

GTN-el (0.48 mM) inkubálva a ditionit 20-100 mM végkoncentrációban 20-40 perc alatt elvezetett az NO spektrum megjelenéséhez miközben a kontrollban a deHb spektruma jelent meg. Amennyiben külön külön lefedett küvetákban inkubáltunk ez az állapot 2 órán át is tartósan bizonyult. Amennyiben kémcsőben inkubáltunk és 5-10 percenként a reakcióelegyet küvetába öntve vettük fel a spektrumot, azaz lehetővé tettük a kémiai eltávolított oxigén pótlását (szobahőmérsékleten, légköri körülmények között, pufferezt vízes oldatban mintegy 0.25 mM O<sub>2</sub> van fizikálisan oldva), a ditionit fogytával és az O<sub>2</sub> újraoldódásával párhuzamosan az NOHb spektruma fokozatosan metHb spektrumává alakult át, ugyanakkor a kontroll elegyben a deHb spektruma helyett a HbO<sub>2</sub> spektruma jelent meg. Ugyanezeket a változásokat gyors oxigenizációval, azaz az elegyek 2 perces O<sub>2</sub> perfuziójával azonnal elő lehetett idézni. Jólehet az NOHb stabilabb komplex mint a HbO<sub>2</sub>, oxigén jelenlétében végbemegy a



reakció, ami a fent leírt jelenséget magyarázza, a GTN adagolás tehát szükségszerűen metHb képződéssel is jár.

A metHb kialakulása során adott második ditionit adag hozzáadásának hatására a metHb redukálódott deHb-á ami a GTN-t tartalmazó elegyben ismét NO-t kötött, megjelent az NOHb spektruma. A kontroll, GTN-t nem tartalmazó elegyben egyidejűleg a HbO<sub>2</sub> spektruma (a ditionit O<sub>2</sub> -t eltávolító hatása eredményeként) deHb spektrumává alakult. Méréseink szerint a GTN-ből már 2-4 mM ditionit hatására nitrit szabadul fel ami (magasabb ditionit koncentrációk mellett) spektrálisan mérhető NO-vá redukálódhat tovább. Megvizsgáltuk ezért a ditionit hatását a nitritből történő NO képződésre is.

## B.) Inkubálás nitrittel

GTN helyett 0.1-1.0 mM nitrittel inkubálva az NOHb hamarabb, 20-25 perc alatt jelent meg az elegyben, egyébként a GTN –el történt inkubáláskor tapasztalt jelenségeket figyelhettük meg: az oxigenizációt lehetővé téve a nitrites elegyben az NOHb fokozatosan, jó követhető kinetikával metHb-á alakult, míg a kontroll elegyben deHb majd HbO<sub>2</sub> spektruma jelent meg. Második adag ditionit ezeket a folyamatokat visszafordította, ismét NOHb illetve deHb (kontroll) jelentek meg. Az oxigenizációt a reakcióelegy 2 perces oxigénperfúziójával végezve a jellegzetes változások azonnal bekövetkeztek. Érdekes módon a metHb képződés, különösen a magasabb nitrit koncentrációknál, általában megelőzte a HbO<sub>2</sub> képződését, ami arra utal, hogy a nitrit vagy érzékenyebben reagál az NOHb-al mint az O<sub>2</sub> a deHb-al, vagy más úton is képes elősegíteni a metHb képződést nemcsak NOHb-n keresztül. Levegőtől elzárt (fedett) küvetákban inkubálva mind az NOHb mind a deHb tartósan, átalakulás nélkül megmaradtak a reakcióelegyekben.

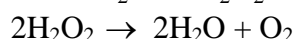
## C.) Inkubálás nitrozil-ditionitrel (DTT-NO)

Nitroziláló vegyület alkalmazása céljából különböző nitrozótiolokat szintetizáltunk és tanulmányoztuk NOHb képző képességüket bovin metHb és ditionit jelenlétében. A DTT-NO kitűnt gyors bomlásával az általunk használt pufferelt pH 7.4 oldatban, ugyanakkor az NO-glutation stabilnak bizonyult. NO-DTT, bovin metHb és 20-50 mM ditionit HEPES pufferrel pH 7.4-en tartott oldatában az NO-DTT hozzáadása után 1-2 perccel már megjelent az NOHb jellegzetes spektruma, ugyanakkor a kontroll, NO-DTT nélküli elegyben deHb spektrumának megjelenését figyelhettük meg. További inkubálás során, ha kizártuk az oxigenizációt (fedett küvetta) az NOHb spektruma legalább 2 órán át megmaradt (tovább nem mértünk), amennyiben viszont az oxigenizációt lehetővé tettük (inkubálás kémcsőben, spektrumfelvétel előtt az elegy átöntése küvetába) egy idő után az NOHb metHb-á alakult, míg a kontroll, NO-DTT-t nem kapott elegyben a HbO<sub>2</sub> spektruma jelent meg.

Összefoglalva, a ditionitos kísérletek bebizonyították, hogy pH 7.4 vizes oldatban megfelelő redukáló hatás eredményeként a GTN-ből nitrit, a nitritből pedig NO válik szabaddá. Az NO NOHb spektrumának megjelenésével detektálható, az NOHb kialakulásához NO és deHb, vagyis oxigénmentes vagy oxigénszegény közeg szükséges. Az NOHb oxigén jelenlétében bomlik, metHb képződik. Az NOHb kialakulásának és bomlásának, valamint egyéb Hb származékok megjelenésének kinetikája egyes karakterisztikus hullámhosszaknál mért abszorpciók időgörbéjével jól nyomonkövethető.

## Kísérletek aszkorbáttal

A híg humán hemolizált vér (HHHV) fő Hb-komponensként HbO<sub>2</sub>-t tartalmazott. Amikor a vérmintát 5, 10, 25, 50, 100, 150 illetve 200 mM neutralizált és EDTA-val stabilizált aszkorbáttal, fedett küvetában 0.2 M HEPES, pH 7.4 pufferben kataláz jelenlétében inkubáltuk, akkor az aszkorbát koncentrációjától függő ideig tartó lappangási periodus után minden esetben a deHb spektruma jelent meg és maradt is meg a további inkubálás során. Az aszkorbát autooxidációja során az oldott O<sub>2</sub>-vel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t képezett, amit a kataláz a



reakció gyorsításával lebontott, ily módon az aszkorbát és kataláz együttes jelenléte az oldott O<sub>2</sub> depléciójához vezetett. Az O<sub>2</sub> depléció adott fokán a HbO<sub>2</sub>-ről disszociált az O<sub>2</sub> és megjelent a deHb spektruma, jeléül annak, hogy az aszkorbát az O<sub>2</sub>-t a HbO<sub>2</sub>-ből is elvonta. Az elegy 1 perces oxigén perfúziója visszaállította a HbO<sub>2</sub> spektrumot, majd egy idő után ismét megjelent a deHb spektruma mivel az aszkorbát az újonnan oldott O<sub>2</sub>-t is depletálta. A deHb spektrum az oxigénre érzékenyen reagált, 100 µl friss vizes oldat hozzáadása után átmenetileg megjelent a HbO<sub>2</sub> spektruma ami néhány perc múltával ismét a deHb

spektrumának adott helyet. Az aszkorbát koncentráció az inkubálás során lassan csökkent, óránként mintegy 0,5-1,0 mM-lal.

Fenti rendszerhez, akár a 0. percben, akár a deHb megjelenése után közvetlenül 0.48 mM vagy 0.96 mM végkoncentrációjú GTN oldatot adva az oldat koncentrációjától függően, a deHb megjelenésétől számított 2-3 óra alatt megjelenik az NOHb spektruma ami 6 órás inkubálás során végig megmarad. Nitritből kiindulva is megkaptuk az NOHb spektrumát, 1 mM nitrit mellett ez már a deHb megjelenésétől számított 40-50 perc után jelentkezett. Ez a rendszer igen alkalmas a GTN → NO átalakulás mechanizmusának feltárására, az átalakulás kinetikájának tanulmányozására különböző körülmények között. Kísérleteinkből kiderült, hogy mind a GTN → nitrit mind a nitrit → NO átalakulás időben a deHb megjelenésétől függ. A deHb elősegíti az NO képződését és egyben NOHb képzésével spektrálisan kimutathatóvá teszi az NO-t. . Az ASC jelenlétében kialakuló deHb alkalmas különösen az ASC hatására felszabaduló NO kimutatására, így kísérleteinkben GS-NO hozzáadására azonnal megjelent az NOHb spektrumának képe.

Az aszkorbát szerepe többféle: 1. tartós oxigén depléciót okoz, ily módon lehetővé teszi a deHb kialakulását és fennmaradását. A deHb valószínűleg redukálószerként részt vesz a GTN nitráttá, majd a nitrát NO-vá történő alakulásában. 2. A deHb eközben metHb-á alakul, ami azonban az aszkorbát hatására azonnal visszaredukálódik deHb-á. 3. Ily módon az aszkorbát a deHb –on keresztül folyamatosan biztosíthatja az elektronokat a GTN-ből NO képződéshez vezető két redukciós lépésben. Ennek a folyamatnak jelentősége lehet a vénás vérben áramló vvt-ek deHb-jának részvételében az NO felszabadításban GTN-ből és hasonló nitrát észterekből valamint szervesen nitritből.