

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: BMOBIBO



Libor Uttl

Role oxidu dusnatého při patologii CNS

The role of nitric oxide in CNS pathologies

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:

MUDr. Jakub Otáhal Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce MUDr. Jakubu Otahalovi, Ph.D za trpělivost, ochotu a cenné rady, bez kterých by tato bakalářská práce nevznikla.

Abstrakt:

Oxid dusnatý (NO) je významný mezibuněčný posel, široce využívaný v nervové soustavě. Moduluje velké množství fyziologických funkcí, účastní se imunitních odpovědí, ale zároveň při patologickém stavu může být odpovědný za široké množství škodlivých účinků. Cílem této práce je přiblížit formou literární rešerše široké téma oxidu dusnatého při patologii CNS. První část této práce přibližuje tvorbu NO, fyziologické funkce modulované NO, popisuje významnou signální dráhu NO-cGMP a zabývá se osudem produkovaného NO. Druhá část této práce je stručně zaměřena na metody výzkumu: použití a rozdělení inhibitorů NOS, geneticky modifikované myši, detekce NO a jeho produktů. Poslední část je věnována vybraným konkrétním patologickým stavům v CNS.

Klíčová slova: oxid dusnatý, syntáza oxidu dusnatého, ischemie, epilepsie, neurodegenerace

Abstract:

Nitric oxide (NO) is significant intercellular messenger, widely used in nervous system. It is used to modulate large number of physiological functions and participates in immunity responses; however in pathological state it can be responsible for wide variety of harmful effects. The goal of my bachelor thesis is to illustrate the topic of nitric oxide in CNS pathology in the form of literature research. First part of this thesis shows the formation of NO, physiological functions influenced by NO, describes the main signaling pathway NO-cGMP and deals with the use of produced NO. Second part of this thesis briefly shows the research methods: the use and distribution of NOS inhibitors, genetically modified mice and detection of NO and its products. The last part is dedicated to selected pathological states in CNS.

Keywords: nitric oxide, nitric oxide synthase, ischemia, epilepsy, neurodegeneration

Obsah

Obsah	1
Seznam zkratk:.....	2
Úvod.....	4
1 Vznik, vlastnosti a funkce NO v organismu.....	5
1.1 Buněčná syntéza NO	5
1.2 Výskyt a izomerie NOS v organismu	6
1.3 Chemické a fyziologické vlastnosti NO	7
1.4 Celulární model NO-cGMP signalizace.....	9
1.5 Degradace a tvorba NO reaktivních sloučenin	10
2 Metody zkoumání NO	11
2.1 Inhibice NOS	11
2.2 Geneticky modifikované myši	12
2.2.1 KO-NO myši	12
2.2.2 KO-NO-GC.....	13
2.3 Detekce NO	14
3 Role NO při patologii CNS	16
3.1 Cévní mozková příhoda.....	16
3.2 Epilepsie.....	21
3.3 Vybraná neurodegenerativní onemocnění (Parkinsonova choroba, roztroušená skleróza)	24
3.3.1 Parkinsonova choroba.....	25
3.3.2 Roztroušená skleróza	25
4 Závěr:.....	27
5 Zdroje:	28
Internetové zdroje	34

Seznam zkratek:

ADP	adenosin difosfát (adenosine diphosphate)
AMP	adenosin monofosfát (adenosine monophosphate)
AMPA	2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid
CAM	kalmodulin
cAMP	cyklický adenosin monofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
cGMP	cyklický guanosin monofosfát (cyclic guanosine monophosphate)
CMP	cévní mozková příhoda
CNS	centrální nervový systém
DAF-FM	2,3-Diaminonaphthalene
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EDRF	endothel derived relaxing factor
eNOS	endotelová oxid dusnatý syntáza (Endothelial Nitric Oxide Synthase)
FAD	flavin adenine dinucleotide
FeTMPyP	$C_{44}H_{36}Cl_5N_8Fe$
FeTPPS	$C_{44}H_{28}ClFeN_4O_{12}S_4$
FMN	Flavin mononucleotide
FSH	folitropin (follicle-stimulating hormone)
GC	guanylát cykláza
GLAST	glutamát-aspartátový transportér (glutamate-aspartate transporter)
GLT-1	glutamate transporters
GTP	guanosin trifosfát
iNOS	inducibilni oxid dusnatý syntáza (Inducible Nitric Oxide Synthase)
IP₃	inositol trifosfát
KA	kainic acid
LH	luteinizační hormon
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginine methyl ester (hydrochloride)
L-NMA	NG-methyl-L-arginine
L-NMMA	L-N ^G -monomethyl Arginine citrate
LTD	Long-term depression
LTP	long-term potentiation
MCA	media cerebri arteria
MPTP	(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger)

	ribonucleic acid)
NA	N ^w -nitro-L-arginine
NAD+	Nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukována forma)
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartate
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého (neuronal nitric oxide synthase)
NO	oxid dusnatý (nitric oxide)
NOS	syntáza oxidu dusnatého (nitric oxide synthase)
P10	mláďata potkana 10 dní stará
P21	mláďata potkana 21 dní stará
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PDZ	PSD95/Dlg1/ZO-1
PGC-1	PPAR gamma coactivator-1
PKG	protein kináza typu G
rCBF	místní průtok krve mozkem
SE	status epilepticus
sGC	solubilní guanylát cykláza
SOD	superoxiddismutáza

Úvod

Oxid dusnatý je jednou z nejmenších biologicky aktivních molekul. NO je schopný procházet buněčnými membránami. Je tvořený pomocí oxid dusnaté syntázy, která se vyskytuje ve třech hlavních izoformách a to epiteliální NOS, indukibilní NOS a neuronální NOS. K tvorbě NO dochází pomocí konverze L-argininu na citrulin a NO. Poločas NO *in vivo* je velmi krátký z důvodu vychytávání NO oxyhemoglobinem. NO funguje jako parakrinní hormon, neurotransmitter, neuroprotektivní molekula i cytotoxická molekula. Mezi nejdůležitější signální kaskády patří na NO závislá sGC/cGMP kaskáda, kde tvorba cGMP funguje jako druhý posel. Nadměrná aktivita NOS, může mít za následek poškození buněk NO a jeho reaktivními dusíkatými odvozeninami. Tím má oxid dusnatý značný vliv i na patologii různých neurodegenerativních onemocnění. Oxid dusnatý velmi ochotně reaguje se superoxidem a tvoří s ním peroxinitrit. Reaktivní dusíkaté sloučeniny poškozují proteiny, lipidy a DNA. Mezi primární reakce poškozující proteiny patří S-nitrosylace a tvorba nitrotyrosinových skupin.

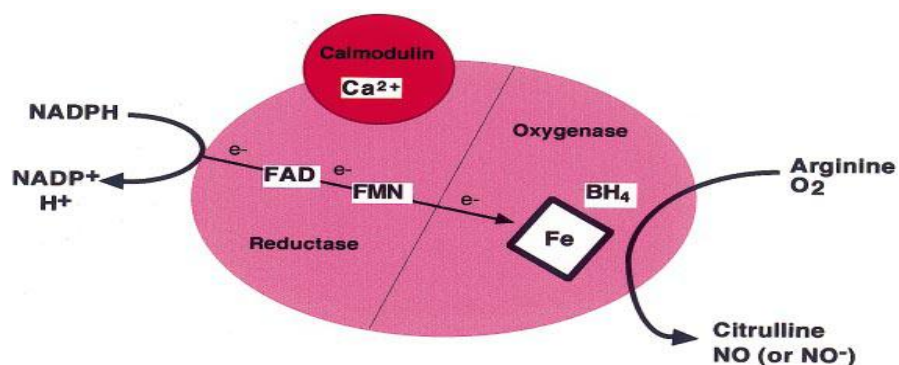
Cílem mé bakalářské práce je shrnout základní poznatky o významu NO při patologiích CNS. V úvodní části bakalářské práce je shrnutí základních informací o tvorbě NO pomocí oxid dusnatý syntázy, fyziologických vlastnostech NO v CNS a o odstraňování NO a jeho produktů z CNS. Ve druhé části jsem se pokusil přiblížit některé metody výzkumu fyziologického a patofyziologického vlivu NO. Poslední část je zaměřena na roli NO ve vybraných onemocnění CNS.

1 Vznik, vlastnosti a funkce NO v organismu

1.1 Buněčná syntéza NO

Při popisu tvorby oxidu dusnatého se zaměřím na vznik NO (oxid dusnatý) pomocí NOS (syntáza oxidu dusnatého) z L- argininu. V organismu může NO vznikat také pomocí dalších enzymatických reakcí, které vedou k tvorbě NO z jiných NO donorů, jakými jsou například nitroglycerin, nitroprusid sodný, isosorbid dinitrát či dusitan amylnatý.

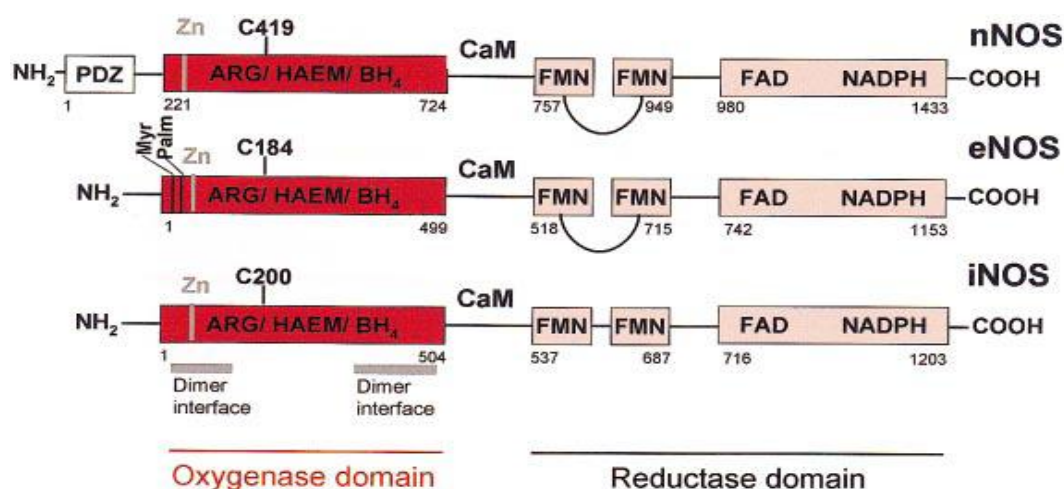
Pro tvorbu oxidu dusnatého pomocí NOS katalyzované reakce je potřeba, mimo již zmiňovaného L- argininu, také molekulární kyslík a NADPH (nikotinamid dinukleotid difosfát). Oxid dusnatý je generován pomocí NOS enzymatickou konverzí L-argininu přes NG-hydroxy-L-arginin na citrulin a NO. K vytvoření 1 molu NO se spotřebuje navíc 1,5 molu NADPH a 2 moly O₂. Citrulin může být buď odstraňován, nebo u některých neuronů zpětně převeden na L-arginin. K přeměně citrulinu dochází pomocí enzymu argininsuccinát syntázy na argininosuccinát. Ten je dále pomocí argininosuccinátlyázy přeměněn na L-arginin. NO syntáza je tvořena homodimerem, jehož každý monomer má N-koncovou oxidační doménu obsahující hemovou skupinu a 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin jako kofaktor a vazebné místo pro L-arginin. Tato N-koncová oxidační doména je spojená s C-koncovou reduktázovou doménou pomocí kalmodulin vazebné sekvence. C-koncová reduktázová doména obsahuje FAD (flavin adenin dinukleotid) a FMN (flavin mononukleotid) jako kofaktory a vazebné místo pro NADPH. Dodávání substrátu L-argininu je zajišťováno pomocí usnadněné difuze pro (kationaktivní) aminokyseliny (přehledně shrnuto v (Alderton et al., 2001)).



Obr.1.: schéma tvorby NO katalyzovaná NOS (Alderton et al., 2001)

1.2 Výskyt a izomerie NOS v organismu

V organismu rozlišujeme tři základní typy NOS s rozdílnou lokalizací v tkáních, tzv. neuronální, epiteliální a indukibilní NOS. Epiteliální NOS a neuronální NOS jsou aktivované pomocí Ca^{2+} /kalmodulin vazebné domény a označují se jako Ca^{2+} senzitivní. Navázáním Ca^{2+} na kalmodulin se pozmění u eNOS a nNOS vazba kalmodulinu a tím je umožněn pohyb elektronů z flavinu na hemovou skupinu (Abusoud et al., 1994). U indukibilní NOS je kalmodulin pevně navázán i za nízké fyziologické koncentrace Ca^{2+} . Dalším rozdílem mezi NO syntázami je na N-koncové části kotranslační myristoylace a post-traslační palmitoylace eNOS a díky této modifikaci je N-koncovou částí zanořena do lipidové dvojvrstvy, na rozdíl od iNOS a nNOS, které jsou cytosolické. Neuronální NOS se od ostatních NOS liší také připojenou N-koncovou PDZ doménou (viz. Obr2.) (Alderton et al., 2001; Brenman et al., 1996), eNOS a nNOS generují nanomolární koncentrace NO a vyskytují se v buňkách nepřetržitě. Jejich regulace v buňce probíhá pomocí koncentrací substrátu, fosforylací, vazbou různých kofaktorů a u eNOS také negativní zpětnou vazbou. Vyprodukovaný NO reversibilně inhibuje eNOS pomocí S-nitrosylace. Regulace iNOS je řízena na úrovni transkripce a k její funkci není závislá na změnách koncentrace Ca^{2+} . Produkuje mikromolární koncentrace NO při odpovědi na zánětlivé cytokiny. Tyto rozdílné způsoby řízení tvorby NO se projeví v dynamice kontroly. Izofomy eNOS a nNOS poskytují velmi dynamickou odpověď, zatímco iNOS, která je řízená na úrovni transkripce je pomalejší, ale po její aktivaci má mnohem delší dobu trvání.



Obr.2: doménová struktura lidského nNOS, eNOS a iNOS (Alderton et al., 2001)

V centrálním nervovém systému se vyskytují všechny tři izomerie NOS. Výskyt iNOS v CNS je způsoben v nejvyšší míře gliovými buňkami (astrocyty, mikroglie), dále se také může iNOS v CNS objevit při porušení hematoencefalitické bariery jako infiltrace makrofágy (Bachschmid et al., 2003). Další NOS vyskytující se v mozku je eNOS exprimující se v endoteliálních buňkách cév, mají největší vliv na řízení průtoku krve, pomocí vazodilatace cév řízené pomocí NO-sGC kaskády (Endres et al., 2004). Při cévní mozkové příhodě zajišťují vyšší prokrvení zasaženého místa a mají neuroprotektivní účinek. Nejvíce rozšířenou izomerii NOS v CNS je nNOS, vázána v neuronech. Expres nNOS v CNS je rozložena nerovnoměrně. Jejich lokalizace v CNS se provádí imunohistochemicky nebo pomocí NADPH-diaphorázy, kde exprese nNOS odpovídají NADPH-diaphorázy pozitivní neurony, nejvíce nNOS se vyskytuje v mozečku, o něco méně pak v hypothalamu, striatu a hipokampu a nejnižší množství nNOS v CNS se vyskytuje v prodloužené míše. nNOS se vyskytuje v subpopulaci GABAergních interneuronů mozkové kůry a striata, aminergních neuronech nucleus dorsalis raphe, cholinergních neuronech septa, mesopontinního tegmenta a pregangliových sympatických neuronech, v neurosekrečních neuronech hypothalamu (nucleus supraopticus a paraventricularis) a v glutamatergních neuronech mozečku (Vincent, 1994).

1.3 Chemické a fyziologické vlastnosti NO

Oxid dusnatý je velmi malá molekula s rozměrem 0,115 nm. Proniká membránami stejně snadno jako kyslík. NO je velmi reaktivní a velmi ochotně reaguje s molekulárním kyslíkem a jeho dalšími reaktivními formami. NO se také velmi ochotně váže na hemovou skupinu. Jeho afinita k hemu je vyšší než afinita kyslíku k hemu. Jeho fyziologické funkce nejsou závislé přímo na druhu NOS, ale na koncentraci NO a jeho lokalizaci v tkáních, která ovšem odpovídá rozšíření jednotlivých izoform.

První velmi často zmiňovanou vlastností NO je jeho schopnost vazodilatace cév. Furchgott a Zawadski objevili zajímavý úkaz při izolaci pásu králičí aorty a jeho vystavení acetylcholinu dochází k relaxaci svalů, ale pouze pokud obsahuje mimo hladký sval i vrstvu endotelu. Z toho důvodu začali hledat EDRF – na endotelu závislý

relaxační faktor. Pokud se pokus zopakuje v jedné nádobě s oběma pásy, z nichž jeden má endotel a druhý má endotel odstraněný kolagenázou nebo mechanickým třením, tak se efekt relaxace projeví i na pásku bez endotelu. Z těchto výsledků odvodili Furchgott s Zawadskim solubilitu EDRF (Furchgott and Zawadzki, 1980). Určení EDRF jako NO bylo zpočátku dáno nepřímými důkazy, jako společnou vazbou na hemoglobin a tím inaktivací EDRF. NO působí při vazodilataci cév pomocí solubilní guanylát cyklázy, tvořící cGMP aktivující protein kinázu 1, označovanou jako PKG. Konstrikce a vazodilatace hladkého svalu je dána fosforylačním stavem lehkého řetězce myozinu. Fosforylovaný stav lehkého řetězce myozinu je závislý na regulačním poměru kinázy a fosfatázy lehkého myozinového řetězce. Další efektrvou dráhou po cGMP/ PKG je IP₃ kanál endoplazmatického retikula uvolňující Ca²⁺.

Tvorba velkého množství mikromolárního NO pomocí iNOS má u makrofágů velký baktericidní účinek. NO může velmi dobře procházet buněčnými membránami do bakterií, kde mimo jiné vazbou na hemovou skupinu cytochrom c oxidázy inhibuje kompetitivně bakteriální dýchací řetězec (Bolanos et al., 1994). Hlavní baktericidní význam je v oxidativním vzplanutí makrofágů. Při vzplanutí dochází k velké tvorbě kyslíkových radikálů a současně k produkci většího množství NO. Jejich společnou reakcí se velmi ochotně tvoří peroxinitrit, procházející membránami a poškozující proteiny S-nitrosylací, čímž ovlivňuje enzymatické vlastnosti proteinů a inaktivuje je.

V CNS má, mimo již zmiňované vazodilatační aktivity a NO zprostředkované imunitní reakce, funkce ovlivňující morfogenezi během vývoje CNS, kde může ovlivnit tvorbu synapsí, vratně inhibovat růst neuronálních výběžků (Hess et al., 1993). NO také u ovlivňuje elektrickou aktivitu v neuronech. Samotná produkce cGMP pomocí NO řízenou sGC, neumožňuje predikci aktivačního nebo inhibičního vlivu (Pehl and Schmid, 1997). NO dále ovlivňuje schopnosti učení a paměti synaptickou modulací LTP v hipokampu a LTD v mozečku. Může bránit zpětnému vstřebávání dopaminu a tím prodlužovat jeho účinek. NO má také funkci neuroprotektivní, kdy snižuje výdej neurotransmiterů (acetylcholinu, glutamátu a dopaminu) ve striatu desenzibilací NMDA receptorů (Kendrick et al., 1996). NO ve spolupráci s glutamátem řídí nastavení biologických hodin v nukleus suprachiasmaticus (Ding et al., 1997). NO hraje pravděpodobně roli také při závislosti na alkoholu, kde se zvyšuje aktivita nNOS ve

frontální kůře a striatu, ale i na tvorbě závislosti na morfinu. Podávání inhibitorů NOS společně s morfinem výrazně zpomaluje tvorbu závislosti. Podobný jev byl pozorován u potkanů závislých na kokainu, kde podávání NOS inhibitorů snižuje spotřebu kokainu (Kolesnikov et al., 1993; Pulvirenti et al., 1996). Mezi další vlastnosti NO patří řízení výdeje hypotalamo-hypofyzárních hormonů a zvýšení permeability hematoencefalické bariery (Maneen et al., 2006). nNOS se podílí na signalizaci bolesti tvorbou NO a tím i následně peroxinitritu, který moduluje vývoj střední přecitlivělosti (hyperalgezie) nitrosylováním důležitých gliových proteinů, které mají za úkol odstraňovat glutamát ze synaptické štěrbin. Až 90% glutamátu je odstraňováno gliovými transportery GLAST, GLT-1. Nitrosylací je aktivita těchto přenašečů snížena a koncentrace glutamátu v synapsi stoupá (Chen et al., 2010). Nitrosylací je také poškozena a inaktivována mitochondriální superoxiddismutáza, čímž dále stoupá koncentrace peroxinitritu a zvětšuje se počáteční poškození (Chen et al., 2010). NO ve vysokých dávkách může také aktivovat neurotoxickou kaskádu, kdy nadměrnou aktivací NMDA receptorů dochází k aktivaci NOS a nadměrné tvorbě NO, který inhibuje mitochondriální dýchací řetězec vazbou na cytochrom c oxidázu (Bolanos et al., 1994), čímž způsobuje další tvorbu volných radikálů, které poškozují DNA. Následná oprava DNA spotřebovává velké množství buněčné energie, což vede k buněčné smrti.

1.4 Celulární model NO-cGMP signalizace

NO se tvoří pomocí NOS enzymatickou konverzí L-argininu na L-citrulin v cytosolu. Díky jeho schopnosti prostupovat membránami prochází NO i do okolních buněk. Mezi hlavní cíle NO patří sGC, která po navázání NO na svojí hemovou skupinu katalyzuje přeměnu GTP na cyklický guanosin 3'5' monofosfát a difosfát. cGMP funguje v buňkách jako druhý posel s širokou škálou účinku.

In vivo byly ve formě bílkovin prokázány dva druhy GC, které jsou si funkčně velmi podobné. Jedná se o dva heterodimery, které se označují $\alpha 1\beta 1$ a $\alpha 2\beta 1$, který obsahuje PDZ doménu. Heterodimer GC $\alpha 1\beta 1$ je v organismu široce rozšířen oproti heterodimeru $\alpha 2\beta 1$, který obsahuje PDZ doménu a byl prokázán na lidské placentě a později také v mozku potkana (Russwurm et al., 2001). Nejvyšší koncentrace sGC se objevuje v mozku v oblasti striata, nucleus accumbens, a substantia nigra. Na úrovni

exprese mRNA byla $\alpha 2$ podjednotka exprimována v mozku, nejvíce v oblasti mozečku a hippocampu.

Signál aktivující tvorbu cGMP začíná navázáním NO na hemovou skupinu, která je spojená s β podjednotkou přes histidin 105 s sGC. Vazba NO na hemovou skupinu přeruší vazbu trojmocného železa k histidinu a tím způsobí změnu konformace, která aktivuje sGC a dojde k syntéze cyklického guanosin monofosfátu (Russwurm et al., 1998). Vytvořený cGMP může aktivovat protein kinázy, fosfodiesterázy a pomocí cGMP jsou také řízeny ligandem ovládané iontové kanály a v neposlední řadě cGMP funguje jako antagonist cAMP tím, že aktivuje fosfodiesterázu, která odstraňuje cAMP štěpením na AMP (Garthwaite, 2010).

1.5 Degradace a tvorba NO reaktivních sloučenin

Ve většině fyziologických případů je tvořený NO velmi rychle vychytáván červenými krvinkami a reakcí s oxyhemoglobinem, případně oxymyoglobinem a touto reakcí vznikne NO_3 a metmyoglobin nebo methemoglobin. Tato reakce snižuje *in vivo* poločas života NO na dobu kratší než jedna sekunda. S NO nemusí reagovat jen oxyhemoglobin nebo oxymyoglobin, ale také může NO reagovat s metmyoglobinem nebo methemoglobinem, kdy NO redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+} a vzniká NO_2 a deoxyhemoglobin nebo deoxymyoglobin (Ignarra, 2000a). K tvorbě reaktivních sloučenin NO a to konkrétně peroxinitritu dochází při současné výrobě NO a superoxidu. Za fyziologických podmínek se dá tvorba peroxinitritu považovat za inaktivaci NO. Při produkci velkého množství superoxidu je tvorba peroxinitritu patogenní a dochází k poškození proteinů, lipidů, DNA, k S-nitrosylaci thiolových skupin proteinů a nitraci tyrosinu. Superoxid za fyziologických podmínek je velmi rychle odstraňován pomocí superoxid-dismutázy (SOD), jejíž vysoké koncentrace se nachází v mitochondriích, ale i v cytoplasmě a extracelulárním prostoru. K tvorbě peroxinitritu může docházet i při reakci NO s kyslíkem, ale tato reakce má mnohem menší výtěžnost oproti reakci se superoxidem, který tvoří peroxinitrit prakticky při každé srážce s NO. Peroxinitrit vznikající za fyziologického pH je z velké části protonován a tvoří kyselinu peroxinitritovou (HOONO). Kyselina peroxynitritová se rozkládá homolytickým štěpením na hydroxylový radikál a dusitanový ion. Při jejich vzájemné reakci dochází

k tvorbě NO_3 a H . Peroxinitrit může být odstraňován také reakcí s CO_2 . Peroxinitrit s CO_2 tvoří nitroperoxykarbonát a díky vysoké koncentraci CO_2 v krevní plazmě je to velmi častý způsob odstraňování peroxinitritu. Nitroperoxykarbonát je podobně jako peroxynitrit nestabilní rozkládá se na NO_3 a HCO_3 (Ignarro, 2000 b).

2 Metody zkoumání NO

2.1 *Inhibice NOS*

Existuje velké množství inhibitorů NOS, které mají farmakologický význam a slouží jako nástroje k dalšímu studiu NOS. Mezi nejvíce používané inhibitory NOS patří 7-nitroindazol, L-NMMA, L-NMA, L-NAME a aminoguanidin. Pro lepší farmakologické využití inhibitorů je důležitá jejich selektivita k NOS. V řadě případů jsou v literatuře zmíněny inhibitory, které mají být selektivní pro nějakou izoformu NOS, ale není u nich popsáno, kolikrát mají vyšší selektivitu pro danou izoformu. Pokud je například selektivita inhibitoru pro danou izoformu pouze 10 krát vyšší, pak je jeho selektivita slabá a považujeme ho za neselektivní inhibitor NOS. Při selektivitě inhibitoru 10-50 krát vyšší pro danou izoformu NOS je označujeme jako částečně selektivní a inhibitory s více než 50 krát vyšší selektivitou již můžeme považovat za selektivní, mající terapeutický význam s potenciálem nízkých vedlejších účinků. U selektivity inhibitorů je také důležité porovnávat selektivitu u všech tří izoform, příkladem může být označování aminoguanidinu jako částečně selektivního inhibitoru iNOS oproti eNOS, ale neselektivnímu k nNOS (Handy and Moore, 1998).

Kromě selektivity můžeme rozdělit inhibitory také podle místa, se kterým interagují. Na inhibitory interagující: s L-argininovým místem, biopterinovým místem, hemovou skupinou, flavoproteinové inhibitory a CAM inhibitory. Mezi inhibitory interagující s L-argininovým místem patří například aminoguanidin, S-ethylisothiurea, thiocitrullin nebo acetamidové inhibitory. Tyto inhibitory soutěží s L-argininem o aktivní místo a interagují s glutamátem, který obvykle interaguje s guanidinovou skupinou L-argininu (Crane et al., 1997). Při navázání inhibitoru do vazebného místa se nejprve vytvoří relativně slabá vazba a konformační změnou dochází ke změně vazby inhibitor-enzym z nekovalentní na kovalentní. To je příklad aminoguanidinu. U

acetamidinových inhibitorů dochází k navázání inhibitoru na vazebné místo, vytvoření nekovalentní vazby, dojde k destabilizaci hemové skupiny, vytvoření biliverdinu z hemové skupiny a uvolnění původního acetamidu, který je dále aktivní, a neaktivního enzymu s porušenou hemovou skupinou. Mezi acetamidinové inhibitory patří například N6-(1-iminoethyl)-L-lysin a N5-(1-iminoethyl)-L-ornithin (McCall et al., 1991; Misko et al., 1993). Další typ inhibitorů interaguje s biopterinovým místem, které je v blízkosti vazebného místa pro L-arginin a hemové skupiny. K tomuto typu inhibitorů se řadí například pterinové analogy jako 4-amino-BH₄, nebo 7-nitroindazol a 2,4-diamino-5-(3,4-dichlorophenyl)pyrimidin (Werner et al., 1996). Mezi hemové inhibitory patří imidazol, jehož dvě molekuly se váží na NOS monomer. Jedna molekula imidazolu na železo v hemu a druhá molekula na argininové vazebné místo na glutamátu (Crane et al., 1997). Navázání na hemovou skupinu imidazolu nejenže blokuje syntézu NO, ale také soupeří s CAM, které zajišťuje dimerizaci NOS. Tímto způsobem fungují pyrimidinové imidazoly, které přímo neblokují syntézu NO, ale velmi silně blokují dimerizaci NOS a tímto způsobem inhibují tvorbu NO (McMillan et al., 2000). Mezi flavoproteinové inhibitory patří diphenyleneiodonium, mezi CAM inhibitory patří například trifluoperazin. Jejich pomocí lze inhibovat NOS, ale jsou neselektivní (Alderton et al., 2001).

2.2 Geneticky modifikované myši

Pro lepší možnost zkoumání rolí NOS se mimo používání inhibitorů, u kterých často dochází k ovlivnění ostatních sestřihových variant a s tím souvisejících fyziologických funkcí, začali vytvářet geneticky modifikované kmeny myši s knockouty jednotlivých izomerů NOS. Mezi další geneticky upravené myši modely, které lze použít ke studiu NO, ale také GC a zastupitelnosti jednotlivých izoform, patří knockouty NO dependentní guanylát cyklázy. Kromě výhod, je zde i mnoho nevýhod, uvádím přehled:

2.2.1 KO-NO myši

První knockout nNOS byl vytvořen delecí na exonu 2, který zahrnuje PDZ doménu. Po tomto knockoutu klesla exprese nNOS na 5% oproti expresi nNOS u divokého typu. Tato 5% exprese zbylých sestřihových variant nNOS je důvodem mírného fenotypu homozygotních myši. Homozygotní jedinci s knockoutem nNOS

pomocí odstranění exonu 2 jsou životaschopní, plodní a není vidět výrazný vliv na pohybovou aktivitu. Výraznými projevy tohoto mutantního fenotypu je rozšíření žaludku se zmohtnělým pylorickým svěračem (Huang et al., 1993). U samců se navíc ještě objevuje zvýšená sexuální aktivita a agresivita (Kriegsfeld et al., 1997).

Pro další snížení exprese nNOS byl vyvinut nový typ mutantních myší s delecí na exonu 6, který kóduje hem vazebnou doménu nNOS. Tímto způsobem byla snížená exprese nNOS z 5% u knockoutu na exonu 2 na 0,3% oproti divokému typu. Také homozygoti s delecí na exonu 6 jsou životaschopní, ale na rozdíl od předchozí mutace jsou neplodní. Mají nižší hmotnost pohlavních žláz. Počty spermií jsou normální, ale samci nejsou sexuálně aktivní a je u nich snižená hladina FSH v plazmě. Oproti tomu je u samic v plazmě 3x zvýšená hladina LH ve srovnání s divokým typem a snížení počtu žlutých tělísek. Z toho vyplývá důležitost nNOS pro normální fungování centrální hormonální regulace reprodukce (Gyurko et al., 2002).

Knockout eNOS byl u myší vytvořen delecí exonu kódujícího NADPH vazebné místo a FAD vazebné místo. Fenotyp tohoto typu myší je mírný, myši jsou životaschopné, plodné a bez anatomických abnormalit. Při malé expresi eNOS dochází k vymizení EDRF – endotel-závislého relaxačního faktoru, a z tohoto důvodu je krevní tlak o 20%-30% vyšší než u divokého typu. Kvůli zvýšenému krevnímu tlaku jsou tyto myši více náchylné k cévním mozkovým příhodám (Huang, 1999). U knockoutu iNOS je fenotyp velmi mírný, a projevuje se výrazným snížením odolnosti k infekcím, vyšší úmrtností oproti divokému typu a snížením náchylnosti k septickému šoku (Flodstrom et al., 2001).

2.2.2 KO-NO-GC

Guanylát-cykláza je heterodimer, který se skládá z podjednotky alfa (α_1 nebo α_2) a z podjednotky beta (β_1). Pokud vytvoříme knockout v podjednotce β_1 , dojde k úplnému knockoutu GC a přerušíme tím NO-cGMP signalizaci. Při tomto knockoutu β_1 podjednotky dojde ke snížení výskytu α_1 i α_2 ve většině tkání. Podjednotky α_1 a β_1 se vyskytují u sebe na společném chromozomu 3 a toto uspořádání umožňuje ko-transkripční regulaci. Podjednotka α_2 se vyskytuje na chromozomu 9. Proto může být koncentrace podjednotek regulována spíše během translace. Při knockoutu α_1 nebo α_2 dochází také ke snížení exprese β_1 podjednotky, ale ne v takové míře jako

v opačném případě. To by mohla vysvětlit malá stabilita samostatných nedimerizovaných podjednotek. Zajímavým zjištěním je, že $\alpha 2\beta 1$ izoforma může zastoupit většinu funkcí více rozšířené $\alpha 1\beta 1$ izoformy (Mergia et al., 2006).

Při úplném knockoutu odstraněním $\beta 1$ podjednotky se projeví důležitost NO-cGMP dráhy pro kardiovaskulární systém a interneuronální komunikaci. U narozených mláďat byla pozorována vysoká letalita, až 80% během dvou dnů, která byla zapříčiněna nedostatkem potravy. Při pitvě uhynulých mláďat byla zjištěna absence potravy v žaludku, přestože mláďata měla stejné projevy chování jako divoký typ při sání, vyhledávání bradavky, čichové signalizaci a plicní ventilaci (Friebe and Koesling, 2009). Příčinou hladovění byla nejspíše snížená velikost mláďat o 15%, a které z tohoto důvodu nemohla soutěžit s ostatními heterozygotními mláďaty. Čemuž odpovídá snížení letality mláďat, po redukcii mláďat 1 den po vrhu (Friebe and Koesling, 2009). Celkové přežívání $\beta 1$ knockout myši ukazuje, že NO-GC signalizace není pro ontogenezi nezbytná, nebo ji může alternativně nahradit jiný signalizační systém. Je zajímavé, že i přes vysokou schopnost zastoupení $\alpha 2\beta 1$ a $\alpha 1\beta 1$ jsou obě izoformy pro LTP ve zrakové kůře nezbytné (Haghikia et al., 2007). Dále se projevuje u $\beta 1$ knockout myši výrazně snížené vnímání bolesti u zánětlivé a neuropatické bolesti, ale reakce na akutní bolest, při které myš nebyla poškozena, např. hot-desk test, nebyla snížena vzhledem k divokému druhu myši (Schmidtke et al., 2008).

2.3 Detekce NO

Detekce NO je složitá kvůli krátkému poločasu života NO a jeho nízkomolární koncentraci ve fyziologických podmínkách. NO se velmi snadno oxiduje na kationt NO^+ , který je málo stabilní ve vodném prostředí, ale velmi ochotně reaguje se zásadami a jinými oxidy dusíku. V aerobních podmínkách mohou být tyto oxidy dusíky zachyceny různými aminovými skupinami, hlavně aromatickými aminy, tvořícími diazoniové soli, nebo aromatickými 1,2-diaminy. Extracelulární DAF-FM diacetát (4-amino-5-methylamino-2', 7'-difluorofluorescein diacetate) nemá fluorescenční aktivitu, prochází plazmatickou membránou a je štěpen esterázami na intracelulární DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2', 7'-difluorofluorescein), který má velmi slabou fluorescenční aktivitu, ale po jeho oxidaci a navázání NO kovalentní vazbou vzroste fluorescenční aktivita

DAF-FM přibližně 160krát. Nevýhodou tohoto značení je kovalentní vazba NO na DAF-FM, což omezuje možnost sledovat výkyvy produkce NO v čase (internetové zdroje [\(1\)](#)).

Další fluorescenční značení NO umožňuje 2,3-aminonaftalen, který reaguje s NO⁺ spontánně tvořeným z NO a vzniká 1H-naftalen triazol, který je fluorescenčně aktivní. Tento rychlý fluorometrický test dokáže detekovat již od 10 nmol koncentrace NO. Mezi další fluorescenční sondy NO patří ještě například 1,2-Diaminoanthraquinon, který je vhodný díky emitačnímu spektru a specifitě, ale jeho nevýhodou je špatná rozpustnost. Fluorescencí je značena také celá řada dalších NO blízkých molekul, například značení dusitanů pomocí NBD methylhydrazine (N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan) nebo značení Dichlorodihydrofluorescein diacetátem a dihydrorhodaminem, kteří značí kromě kyslíkových radikálů také peroxinitrit (internetové zdroje [\(1\)](#)).

Nepřímá detekce je zaměřena na značení produktů NO, příkladem může být nepřímé imunohistochemické značení peroxinitritu pomocí protilátky, vázající se na nitro-tyrozin, jehož tvorba je katalyzována peroxinitritem. Zvýšená hladina nitrotyrozinových skupin se objevuje u některých chorob, jako například roztroušené sklerozy, Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby nebo u poškozené tkáně při ischemii. Další modifikací proteinů pomocí NO je nitrosylace thiolových skupin, dochází k ní na cysteinu nebo na glutationu. Jedná se o post-translační modifikaci, která může ovlivňovat aktivitu enzymu nebo mít za následek přestavby chromatinu či degeneraci bílkovin. Hlavní dusíkatou molekulou, jež je odpovědná za S-nitrosylaci, je oxid dusitý (NO), který vzniká z O₂ a NO. Hlavní nevýhodou značení S-nitrosylovaných bílkovin je jejich reverzibilní povaha a fotolytické štěpení. Nejčastěji využívaná metoda ke značení S-nitrosylovaných bílkovin je tříkroková "biotin switch" metoda, kdy v prvním kroku blokuje volné thiolové skupiny N-ethylmaleimidem nebo jiným alkylačním činidlem, v druhém kroku dojde k redukci nitrosylovaných thiolů askorbátem a ve třetím kroku se značí thiolové skupiny, které jsme v předchozím kroku uvolnili pomocí fluorescenčního činidla nebo biotinylovými, maleimidovými nebo jodoacetamidovými činidly. Metoda je náchylná k falešné signalizaci způsobené neúplným blokováním thiolů v prvním kroku a neúplné redukci všech nitrosylovaných thiolů v druhém kroku. Další využívanou metodou je schopnost štěpit S-nitrosylované skupiny pomocí těžkých

kovů nebo ultrafialového záření. Nitrosylované skupiny pak můžeme zjistit značením uvolněného NO například DAF-FM nebo značením uvolněných thiolových skupin například již zmiňovanými činidly pro krok tři u biotin switch metody (internetové zdroje [\(1\)](#)).

Při dlouhodobějším měření oxidu dusnatého (NO) se díky jeho elektroaktivitě používají elektrody. Aktuální objem NO v okolí elektrody, která pracuje v trvalém napětí 900mV, vyplývá ze změny napětí při oxidaci NO na elektrodě oproti stavu bez NO. Hlavním problémem měření NO je množství rušivých látek, například kyselina askorbová a nízké změny napětí při oxidaci NO. Selektivita elektrody je dosažena například Nafion® nátěrem na platino-iridiové elektrodě, který po vyžhání propouští pouze malé plynné molekuly. Po zavedení elektrody do mozku zvířete se citlivost elektrody sníží během prvních dnů asi na 20-30% původní citlivosti důsledkem navázání různých proteinů a lipidů na povrch elektrody. Po tomto poklesu citlivosti je nutné elektrodu nakalibrovat, a proto musí být elektrody zavedeny do zvířete s větším předstihem před samotným pokusem. Citlivost těchto elektrod je 1,5 nA/μM rozpuštěného NO. Elektrody jsou stabilní ve zvířatech po voperování po dobu nejméně 4 týdnů (internetové zdroje [\(2\)](#)).

3 Role NO při patologii CNS

3.1 Cévní mozková příhoda

Cévní mozková příhoda je stav, při kterém dochází k přerušení nebo velkému omezení zásobování mozku krví. Cévní mozkové příhody se dělí podle způsobu vzniku na hemoragické a ischemické. Hemoragická cévní mozková příhoda nastává po protržení cévy, často následkem vysokého krevního tlaku, a následném krvácení do mozku. Cévní mozkové příhody se podle rozsahu dají dělit na fokální a globální. Při fokální ischemii dochází ke snížení průtoku cévou do určité oblasti mozku. U globální ischemie dochází k přerušení nebo drastickému snížení krve celým mozkem nejčastěji z důvodu selhání krevního oběhu. Výskyt cévních mozkových příhod u nás stoupá výrazně nejen důsledkem stárnutí populace, ale také výskytem tohoto onemocnění v produktivním věku. V roce 2009 u nás bylo ošetřeno 262 000 lidí kvůli cévnímu onemocnění mozku (Zdravotnická ročenka ČR, 2009). Pro studium cévní mozkové

příhody se nejčastěji využívá animálních modelů. Fokální mozková ischemie je vyvolána okluzí střední mozkové tepny (MCA). Globální ischemie lze studovat například po bilaterální okluzi karotid u hlodavců. Při fokální ischemii se rozlišuje ischemické jádro, které bylo zásobeno krví pomocí uzavřené tepny, a ischemický polostín, ve kterém je zachováno cca 50% krevního zásobení pomocí okolních tepen (Dirnagl et al., 1999) (White et al., 2000). Při cévní mozkové příhodě se objeví velké snížení koncentrace ATP v tkáni, a to nejvýrazněji v oblasti ischemického jádra. Snížení koncentrace ATP se projeví plošnou depolarizací neuronů, zapříčiněnou snížením aktivity Na/K ATPáz. Důsledkem depolarizace dojde v synapsích k uvolnění neuropřenašečů a tzv. excitotoxicitě, zapříčiněné hromaděním glutamátu (White et al., 2000). Hromadění glutamátu aktivuje postsynaptické NMDA a AMPA receptory, jejichž vlivem dojde velkému zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} a Na^{2+} . Ca^{2+} působí v buňkách jako druhý posel a aktivuje široké spektrum enzymů (např. NOS, cyklooxygenázy). Aktivací enzymů dochází k tvorbě volných kyslíkových radikálů a dalšímu poškození buňky nitrosylací proteinů a lipidů, poškození DNA a kompetitivní inhibicí mitochondriálního dýchacího řetězce (White et al., 2000).

Zkoumání účinku oxidu dusnatého při cévní mozkové příhodě vedlo v počátcích výzkumu k rozporupným výsledkům. Oxid dusnatý se jevil jako modulátor neuroprotektivní i neurotoxický v závislosti na izoformě NOS, která produkovala NO. Jako neuroprotektivní se projevila eNOS, jí tvořený NO zvyšoval při cévní mozkové příhodě prokrvení periferního ischemického polostínu. Zvýšené prokrvení mediované NO pomocí vazodilatace má vliv na snížení oxidačního poškození, pomáhá tvorbě nových cév a v neposlední řadě redukuje tvorbu sraženin omezením agregace krevních destiček (Endres et al., 2004). Reaktivní produkty NO snižují také aktivitu NMDA receptorů akompetitivní inhibicí na redoxním modulačním místě a dále snižují aktivitu NMDA receptorů také S-nitrosylací thiolových skupin. Neuroprotektivní vliv byl ověřen porovnáním poškození mozku po cévní mozkové příhodě na eNOS-KO fenotypu myši a na divokém fenotypu myši. Fenotyp eNOS-KO myši se projevoval výrazně větším poškozením mozku v místě okluze (Huang et al., 1996).

Neuronální NOS a iNOS narozdíl od eNOS u cévní mozkové příhody nemá neuroprotektivní účinek. Je to dáno tím, že nízká koncentrace NO v úvodní fázi cévní

mozkové příhody vede k vazodilataci cév, lepšímu prokrvení a ke snížení rozsahu poškození. Následkem poškození se produkují chemotaktické molekuly (zánětlivých cytokinů) (Dirnagl et al., 1999). Tvorba těchto zánětlivých cytokinů vede k migraci gliových buněk a průniku fagocytů z krevního řečiště k místu poškození mozku. Migrující gliové buňky tvoří velké množství kyslíkových radikálů a pomocí iNOS produkují mikromolární koncentrace NO. Toto velké zvýšení koncentrace NO se projeví až s jednodenním zpožděním po cévní mozkové příhodě (Bachschnid et al., 2003).

Vyšší koncentrace NO, způsobená aktivitou nNOS a iNOS, spolu se zvýšenou lokální tvorbou superoxidu, například inhibicí mitochondriálního dýchacího řetězce (Bolanos et al., 1994) nebo vysokou aktivitou cyklooxygenázy, velmi ochotně tvoří reaktivní peroxinitrit mající výrazné neurotoxické vlastnosti. Tvorba superoxidu je zvýšena v zasažené oblasti již v první fázi ischemie, ale velmi výrazně se zvyšuje v úvodu následné reperfuze především v ischemickém polostínu (Fabian et al., 1995). Při fyziologickém stavu k odstraňování superoxidu vytvořeného nejčastěji cyklooxygenázami, mitochondriálním dýchacím řetězcem nebo NADPH oxidázou při oxidativním vzplanutí postačují superoxiddismutázy SOD. Při cévní mozkové příhodě je tvorba superoxidu mnohem vyšší, hlavně kvůli inhibici cytochromu c oxidem dusnatým v mitochondriálním dýchacím řetězci a zvýšenou hladinou Ca^{2+} , který zvyšuje činnost cyklooxygenáz. Knockouty SOD se u myší projeví výrazným zvětšením ischemického poškození oproti divokému fenotypu myší (Kim et al., 2002). Mezi neurotoxické vlastnosti způsobené peroxinitritem patří peroxidace lipidů, oxidace a nitrosylace proteinů, nitrace tyrosinu, spotřeba zásobních antioxidantů, poškození DNA a porušování hematoencefalické bariéry způsobené nitrací tyrosinu na F-aktinu a jeho následné depolymerace v cévní svalovině (Maneen et al., 2006). Snížit tvorbu peroxinitritu můžeme při ischemii, mimo již zmiňované odstraňování superoxidu pomocí SOD, snížením tvorby NO pomocí různých inhibitorů NOS nebo použitím NOS-KO myší. Z inhibitorů je velmi často používán 7-NI, který celkem selektivně inhibuje nNOS. Pokud je podán těsně před okluzí, velmi výrazně snižuje tvorbu NO při počáteční fázi ischemie a brání nadměrné produkci peroxinitritu, což se projeví potlačením tvorby nitrotyrosinu (Hirabayashi et al., 1999). Potlačení tvorby nitrotyrosinu se také objevilo v počáteční fázi ischemie u nNOS-KO myší (Eliasson et al., 1999). Tvorba

peroxinitritu je v této počáteční fázi závislá především na aktivitě nNOS v neuronech. Přesto po podání 7-NI inhibujícího nNOS zůstala následkem produkce peroxinitritu zvýšená koncentrace nitrotyrosinu v cévách. Tato tvorba nitrotyrosinu byla omezena v cévách snížená až současnou inhibicí nNOS a eNOS (Gursoy-Ozdemir et al., 2004). Po počáteční fázi vysoké produkce NO aktivitou eNOS a nNOS se stává hlavním zdrojem NO, a tím i peroxinitritu, iNOS v gliových buňkách, astrocytech a makrofázích. Podáním aminoguanidinu, který je selektivním inhibitorem iNOS, výrazně snížíme poškození touto sekundární vlnou NO. Nižší poškození dokládá snížená koncentrace nitrotyrosinových skupin až o 90 % po 48 hodinách oproti kontrole (Takizawa et al., 1999).

Ischemické poškození dusíkatými radikály se dá omezit mimo inhibice tvorby NO, také použitím antioxidantů vychytávajících peroxinitrit nebo katalyzátorů působících rozklad peroxynitritu. Tím snižují tvorbu nitrotyrosinu, S-nitrosylaci proteinů, lipidů a chrání neurony před oxidativním stresem. Mezi katalyzátory patří FeTMPyP a FeTPPS. Jejich podání před reperfuzí snižuje poškození mozku o 70% a má neuroprotektivní vliv i při podání po 6 hodinách od reperfuze (Thiyagarajan et al., 2004). Dalším antioxidantem s velmi výrazně neuroprotektivním účinkem je kyselina močová, jejíž podání snížilo při fokální ischemii rozsah poškození téměř o 70% (Yu et al., 1998).

K výrazné ochraně mozku před ischemickým poškozením může přispět také inhibice opravných aktivit DNA poškozené peroxinitritem. Při jednovláknovém poškození DNA se aktivuje PARP (poly-ADP-ribozová polymeráza), která v místě přerušení začne syntetizovat poly-ADP-ribozový řetězec a ten aktivuje další opravné enzymy. Při nízkém poškození DNA má důležitou opravnou aktivitu, ale při rozsáhlejší poškození DNA může aktivovat apoptotickou smrt přímo, ale častěji dojde při nadměrné aktivaci PARP k vyčerpání zásob NAD⁺ a později ATP, což vede k nekróze neuronů. Pomocí selektivních inhibitorů PARP, např. 3-aminobenzamide, nebo u PARP knockoutovaných myší lze snížit poškození přechodné ischemie až o 80%. K dosažení takového stupně ochrany neuronů je nutné PARP inhibitory podávat několik hodin po okluzi (Eliasson et al., 1997).

Významný vliv na velikost ischemického poškození a na aktivitu nNOS má intracelulární acidóza, vznikající anaerobním metabolismem při ischemii. Optimální aktivita nNOS je udávána při pH mezi 6,7–7. Při snížení pod toto pH dochází k narušení disulfidických můstků mezi dimerními podjednotkami NOS. To má za následek snížení produkce NO a tvorbu H_2O_2 , O_2^- , důsledkem narušení oxidace NADPH. Tímto způsobem se mění nejen výtěžnost reakce, ale také produkty. Tento jev je zvláště důležitý u nNOS, která má vyšší sklon tvořit O_2^- . Díky snižujícímu se pH dochází k omezení neuroprotektivního účinku eNOS, v závislosti na snížení tvorby NO a tím i vazodilatace, a zároveň stoupá díky tvorbě peroxinitritu neurotoxický účinek (Gorren et al., 1998). Při těžké ischemické příhodě, dochází k výraznému acidóze s pH okolo 6,19. Při takhle nízkém pH použití neselektivních inhibitorů NOS (L-NAME) nevede k neuroprotektivním výsledkům, ale snižuje rCBF inhibicí eNOS a tím zvyšuje ischemické poškození. Oproti tomu neselektivní inhibice NOS má velmi výrazné neuroprotektivní účinky při ischemii, u které dochází jen k mírnému nebo střednímu poklesu pH mezi 6,65–6,9 (Anderson and Meyer, 2000), acidózu při ischemii lze ovlivnit změnou koncentrace glukózy v séru. Anderson, Coert, Meyer připravili tři skupiny pokusných zvířat s různým obsahem glukózy v séru, tzn. normoglykemickou, mírně hypoglykemickou a hyperglykemickou skupinu. U normoglykemické skupiny bylo výchozí pH mozku 7,01, po dvou hodinách od okluzí MCA bylo změřeno pH v mozku 6,58 a třicet minut po následné reperfuzi bylo naměřeno pH 6,69. U mírně hypoglykemické skupiny bylo výchozí pH mozku 7,01 a po 2 hodinách ischemie došlo ke snížení pH na 6,79 a třicet minut po reperfuzi pH mírně stoupl na 6,89. Ve skupině hyperglykemických zvířat se snížilo pH z původních 7,01 po 2 hodinách ischemie na 6,12 a třicet minut po následné reperfuzi vzrostlo na pH 6,45.

Podání 100 mg/kg 7-nitroindazolu 30 minut před okluzí MCA snížilo ischemické poškození u normoglykemické skupiny o 93,3% a u hyperglykemické o 27,5% oproti kontrolní skupině. U hypoglykemické skupiny musela být snížena dávka 100 mg/kg 7-nitroindazolu pro vysokou úmrtnost (86%) na 10 mg/kg. Při tomto uspořádání pokusu nebylo snížení ischemického poškození významné, z důvodu omezení ischemického poškození již samotnou hypoglykemií (Coert et al., 2003).

3.2 Epilepsie

Epilepsie patří mezi nejčastější neurologická onemocnění, postihuje přibližně 1 % populace. Epileptické záchvaty dělíme na parciální a generalizované záchvaty. Parciální záchvaty můžeme rozlišovat na jednoduché, u kterých nedochází ke ztrátě vědomí, a komplexní záchvaty provázené vždy ztrátou vědomí. Jednoduché parciální záchvaty se mohou projevovat různě, například svalovými záškuby, částečnou ztrátou hybnosti, senzitivními nebo sensorickými halucinacemi. V některých případech mohou parciální záchvaty přerůst v generalizovaný záchvat, příkladem může být senzitivně-senzorický vjem označovaný jako aura těsně předcházející sekundárnímu tonicko-klonickému generalizovanému záchvatu. U komplexních parciálních záchvatů dochází vždy ke ztrátě vědomí a k pohybovým automatizmům trvajícím v rozmezí několika sekund až minut. Komplexní parciální záchvaty mohou vznikat primárně, nebo případně navazovat na jednoduchý parciální záchvat. Generalizované epileptické záchvaty se dají rozdělit na absence (petit mal), při kterých dochází k útlumu, následkem zvýšené aktivity eferentních inhibičních GABA neuronů v nukleus reticularis thalami. Tato inhibice se projeví výpadkem vědomí, přerušením prováděné činnosti, strnulým pohledem, v některých případech i pádem na zem. Absence odezní během 5-10 sekund a pacient si záchvat nemusí vůbec pamatovat a může dál pokračovat v činnosti. Při delším trvání absence může dojít k pádu. Křečové generalizované záchvaty, tzv. tonicko-klonické záchvaty (grand mal) jsou nejčastější epileptické záchvaty. Samotný křečový záchvat trvá několik minut, dochází při něm ke ztrátě vědomí, pádu, křeč postihuje veškeré svalstvo, záškuby, může dojít k pokousání jazyku, povolení svěračů a následnému pomočení a pokálení. Po skončení záchvatu následuje bradypsychismus, zmatenost, trvajících několik minut až hodin, než dojde k návratu do normálu. Pokud dochází k návaznosti záchvatů na sebe, po dobu delší 30 minut, mezi kterými pacient nepřichází k plnému vědomí, označujeme tento stav jako status epilepticus

Role oxidu dusnatého na průběh a patologii epileptického záchvatu je pořád ve fázi výzkumu. Některé průběžné výsledky ukazují jak neuroprotektivní vliv, tak častěji patologický vliv NO. Toto zdánlivé protiřečení je dáno různými izoformami NOS zapojujícími se do děje, použitím různých animálních modelů, stářím modelových

organismů, způsobem vyvolání záchvatu, odlišností použitých inhibitorů a způsobu podání (Wojtal et al., 2003).

Změna produkce NO při epileptickém záchvatu byla měřena *in vivo* v hipokampu potkana. Pomocí mikrodialýzy koncentrickou sondou byla změřena hladina NO v extracelulární tekutině před podáním kyseliny kainové (KA) a tato bazální hodnota vzrostla po podání KA 5,3krát v čase $t = 100$ min od podání KA. Toto zvýšení koncentrace NO při epilepsii bylo výrazně omezeno podáním N-monomethyl-L-argininu 30 minut před podáním KA (Balcioglu and Maher, 1993). V epileptické tkáni dochází také k výraznému zvýšení exprese nNOS zejména u slabě nNOS aktivních neuronů, které mohou přispívat k epileptické aktivitě *in situ* (Gonzalez-Martinez et al., 2009). Zvýšení synaptické aktivity oxidem dusnatým má v epileptogenních podmínkách za následek zahájení epileptického záchvatu pozitivní zpětnou vazbou. Tento jev byl pozorován na řezech hipokampu po snížení koncentrace Mg^{2+} , které vyvolalo nárůst produkce NO. Zabránění tvorby NO pomocí nNOS částečně selektivního 7-NI nebo neselektivního N-methyl-L-arginin acetátu zabránilo vyvolání záchvatu. Inhibici iNOS pomocí aminoguanidinu záchvatu nezabránila, což poukazuje na rozhodující funkci nNOS při vyvolání záchvatu (Kovacs et al., 2009).

Během epileptického záchvatu dochází ke zvýšení průtoku krve mozkem, kde hlavní roli hraje nejspíše vazodilatační efekt NO. Při fokálním kortikálním záchvatu vyvolaném pomocí bicullinu byl u potkanů v narkóze změřen místní průtok krve 164ml/100g/min, po podání NA došlo ke snížení krevního průtoku na 104ml/100g/min. Efekt NA byl odstraněn podáním nadbytku L-argininu a krevní průtok stoupl na 218ml/100g/min. Podání methylenové modři, která inhibuje GC, snížilo krevní průtok o 25% (Devasconcelos et al., 1995). Podrobněji se vlivem inhibitorů NOS na krevní průtok mozkem zabývali Efrat Barbiro-Michaely, Avivit Mendelman, Avraham Mayevsky ve studii z ledna roku 2011. Testovali význam NO při SE, vyvolaném pentylenetetrazolem pomocí částečně selektivního 7-NI k nNOS a neselektivního L-NAME. Oproti většině ostatních studií nebyl pokus prováděn na uspaných zvířatech a měření mozkové kůry bylo prováděno průběžně 3,5 hodiny po epileptickém záchvatu. Po vyvolání záchvatu pentylenetetrazolem vzrostl krevní průtok mozkem o 68% u skupiny bez inhibice NOS. U skupin, které byly inhibovány, vzrostl krevní průtok jen o 18%. Celkově se ve

výsledku potvrdilo snížení krevního průtoku při použití 7-NI a L-NAME a zabránění hyperémie při epileptickém záchvatu. Mimo to použitím 7-NI se také snížil počet záchvatů ve sledovaném období oproti kontrolní skupině (Barbiro-Michaely et al., 2011).

Stáří modelového organismu a zralost mozku má vliv na projev NO. Příkladem může být studie vlivu NO u 10denních myších mláďat (P10) a 21denních mláďat (P21). Status epilepticus byl u mláďat vyvolán opakovaným podáváním pentylenetetrazolu. Část myších mláďat dostala dávku L-argininu 10 minut před podáním pentylenetetrazolu, další část myší dostala 45 minut před podáním pentylenetetrazolu inhibitor NOS L-NA samostatně nebo v kombinaci s L-argininem. Kontrolní myši dostaly ekvivalentní objem fyziologického roztoku. U P10 myší pouze s pentylenetetrazolem byla potřeba o 15% vyšší dávka pentylenetetrazolu k vyvolání SE než u P21. L-arginin neměl vliv na velikosti dávky pentylenetetrazolu potřebné k vyvolání SE, ale podání L-NA snížilo potřebnou dávku pentylenetetrazolu o 30% u P10 myší. U P21 myší nemělo podávání L-argininu nebo L-NA vliv na spotřebu pentylenetetrazolu. Ovšem úmrtnost po SE byla velmi závislá na věku mláďat. U neléčených mláďat P10 byla úmrtnost 18% oproti 82% u P21. Podání L-argininu zvýšilo u P10 mláďat úmrtnost z 18% na 25%. Podání L-NA inhibitoru NOS mělo ovšem za následek zvýšení úmrtnosti P10 mláďat téměř na 100%. U skupiny P21 po použití L-argininu došlo ke snížení úmrtnosti z 82% na 29%, při kombinaci s podáním L-NA byl vliv L-argininu omezen a úmrtnost se zvýšila na 67%. Samostatně podaný L-NA u P21 skupiny neměl na úmrtnost vliv. Tyto rozdílné výsledky ukazují výrazný vliv NO na regulaci při epileptickém záchvatu v nezralém mozku u skupiny P10. U skupiny P21 se již tak výrazně regulace NO při epilepsii neobjevuje a další ochranné systémy při záchvatu jsou nezralé, což má za následek vyšší citlivost P21 skupiny k epileptickým záchvatům (de Vasconcelos et al., 1998).

Příkladem pozitivního vlivu NO na epileptický záchvat je ochrana před oxidačním stresem v mitochondriích neuronů hippocampu. Při vyvolání SE dochází k tvorbě NO, který aktivuje sGC, spustí tvorbu cGMP, a tím ovlivňuje transkripční faktory řídící expresi PGC-1. Přesná řídící dráha není zatím objasněna. PGC-1 funguje jako transkripční kofaktor mimo jiné odpovědný za regulaci mitochondriálního antioxidantního systému. U myšího modelu s PGC-1 knockoutem dochází ke zvýšené

citlivosti k neurodegenerativnímu oxidativnímu poškození. Ukázkou vlivu NO na expresi PGC-1 je podání nescifického inhibitoru L-NAME, při vyvolaném SE pomocí pilokarpinu. L-NAME před záchvatem neovlivňuje bazální hladinu exprese PGC-1, ale během SE brání výraznému zvýšení exprese PGC-1, což se projeví zvýšeným oxidativním poškozením oproti kontrolní skupině neléčené L-NAME (Han et al., 2011).

3.3 Vybraná neurodegenerativní onemocnění (Parkinsonova choroba, roztroušená skleróza)

U neurodegenerativních onemocnění je vidět výrazný vliv oxidačního poškození, které je jedním z faktorů patogeneze zmíněných onemocnění. Imunochemické značení nitrotyrosinových skupin bylo pozitivní u vzorků tkáně již v rané fázi roztroušené sklerózy. Navíc byla zjištěna výrazná nadprodukce NO₂ a NO₃ v mozkomíšním moku (Calabrese et al., 2002). Tím se potvrzuje tvorba reaktivních dusíkatých produktů, zejména peroxinitritu při neurodegenerativních onemocnění a jejich již zmiňované škodlivé účinky. Příkladem se jedná o vyčerpání zásob buněčných antioxidantů, poškozování DNA, S-nitrosylace a nitrace tyrosinu u proteinů, oxidační poškození lipidů. Produkce peroxinitritu má také za následek poškozování mitochondriálního řetězce a následné zvýšení tvorby superoxidu, čímž ještě vzrůstá produkce peroxinitritu (White et al., 2000). Dalším důsledkem tvorby peroxinitritu je inaktivace Mn-SOD, což má za následek vyšší zranitelnost mitochondrii oxidačním stresem. Mírně zvýšená nitrace Mn-SOD byla in vivo potvrzena v mozkomíšním moku pacientů s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou (Aoyama et al., 2000). Dalším významným cílem peroxinitritu jsou různé strukturální proteiny s vyšším obsahem tyrosinu. Tyrosin je mírně hydrofobní a vyskytuje se často uvnitř proteinu nebo mezi jeho podjednotkami, ale v případě kontaktu s vodným prostředím je schopen tvořit vodíkové vazby. Nitrace tyrosinu má často výrazné strukturální a funkční důsledky (Beckman, 1996). Nitraci tyrosinu lze snižovat pomocí vhodných antioxidantů, při správné funkci glutathionu a glutathion reduktázy, SOD je tvorba nitrotyrosinu za fyziologických podmínek velmi výrazně omezena. Zajímavou skutečností je ochrana organismu před peroxinitritem a s ním související S-nitrosylací a tvorbou nitrotyrosinu pomocí kyseliny močové, která má antioxidační účinky. Této skutečnosti odpovídá

inverzní korelace mezi dnou (hyperuremii) a patologickými vlivy peroxinitritu (Koprowski et al., 2001).

3.3.1 Parkinsonova choroba

Při Parkinsonově chorobě dochází k odumírání dopaminergních neuronů v substantia nigra, což má za následek nedostatek dopaminu v bazálních gangliích a z toho plynoucí potíže s pohybem a koordinací. Pro studium Parkinsonovy choroby je využíván animální model, kde je Parkinsonova choroba vyvolána aplikací MPTP. MPTP je selektivní neurotoxin pro dopaminergní neurony v substantia nigra. Při Parkinsonově chorobě dochází v substantia nigra k výrazně zvýšené produkci NO aktivovanou iNOS gliových buněk a v souladu s patologickou rolí NO jsou iNOS knockoutované myši odolnější vůči MPTP (Liberatore et al., 1999). Mimo vysokou aktivitu gliových buněk bylo také pozorováno až 10 násobné zvýšení exprese nNO mRNA v neutrofilech (Gatto et al., 2000). Zvýšená tvorba NO a následně peroxinitritu má za následek již výše zmíněnou nitraci tyrosinu, která má za následek inhibici enzymové aktivity například tyrosin hydroxylázy, která katalyzuje přeměnu L-tyrosinu na hydroxyfenylalanin – prekurzor dopaminu. Touto inhibicí klesá produkce dopaminu v substantia nigra rychleji než by odpovídalo úbytku dopaminergních neuronů (Ara et al., 1998).

3.3.2 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza je chronické autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k demyelinizaci axonů v četných ložiscích mozku. Projevy onemocnění jsou závislé na lokalizaci ložisek v CNS. Za tvorbu demyelinizovaných ložisek jsou odpovědné iNOS exprimující astrocyty a mikroglie. Zvýšená hladina NO_2 a NO_3 byla prokázána v moči i mozkomíšním moku pacientů (Calabrese et al., 2002). Mimo astrocytů a mikroglie pronikají do demyelinizovaných ložisek také zánětlivé buňky po porušení hematoencefalické bariéry. K narušení hematoencefalické bariéry dochází nitrací tyrosinu na F aktinu, což způsobí jeho depolymeraci ve stěnách cév (Maneen et al., 2006). Výše zmíněnou inverzní korelaci mezi výskytem hyperurie a roztroušené sklerózy. U pacientů s roztroušenou sklerózou je oproti ostatním lidem snižena hladina kyseliny močové. Potvrzeno to bylo i u jednovaječných dvojčat, kdy jeden měl

roztroušenou sklerózu. Snížení hladiny kyseliny močové při roztroušené skleróze je nejspíše dáno reakcí s peroxinitrem. Ve fyziologických podmínkách je hladina kyseliny močové v rozmezí 4-6 mg/dl. Perorální podávání inosinu v dávce 3g/kg/den mělo za následek zvýšení hladiny kyseliny močové z 4mg/dl po 15 týdnech na 9mg/dl. Tato hladina kyseliny močové se dařila udržet téměř rok a neprojevíly se žádné nežádoucí účinky. Určité zlepšení bylo prokázáno u 3 z 10 pacientů a u zbytku pacientů nedošlo k žádným známkám relapsu. Mimo toto zlepšení došlo navíc u jednoho ze dvou pacientů s aktivní lézí k poklesu aktivity léze (Koprowski et al., 2001).

4 Závěr:

V oblasti výzkumu NO a NOS se v posledních 20 letech udělal obrovský pokrok. Význam NO byl oceněn udělením Nobelovy ceny R. Furchgottovi, L. Ignarru a F. Muradovi za objev biologické mediátorové funkce NO (Alderton et al., 2001). I přes existenci velké řady prací a souhrných článků zabývajících se NO, nám k objasnění a upřesnění všech fyziologických funkcí NO chybí ještě spousta práce. Širokému využití získaných znalostí v klinické léčbě brání značné množství neprozkoumaných buněčných a molekulárních mechanismů objasňujících za jakých specifických podmínek dochází k patologickému vlivu NO. Další příčinou zpomalující vývoj léčebných postupů je velké množství prací, prováděných na tkáňových kulturách nebo myších a potkanech. Výsledky z těchto prací pak nemůžeme jednoduše převádět na lidi. Z hlediska vývoje léčebných i výzkumných metod je důležitý vývoj stále selektivnějších inhibitorů k jednotlivým izoformám NOS, které by neovlivňovali fyziologické funkce, vázající se na jiné izoformy. Velký klinický potenciál by mohla mít antioxidantní činidla, chránící před oxidativním stresem a poškozením peroxinitrem. K výsledkům potvrzujícím výrazný neuroprotektivní vliv antioxidantních činidel bezesporu patří výše zmiňovaný experiment, který provedl H. Koprowski u pacientů s roztroušenou sklerózou, kterým podával perorálně inosin jako prekurzor kyseliny močové (Koprowski et al., 2001).

5 Zdroje:

Abusoud, H.M., Yoho, L.L., Stuehr, D.J., 1994. CALMODULIN CONTROLS NEURONAL NITRIC-OXIDE SYNTHASE BY A DUAL MECHANISM - ACTIVATION OF INTRADOMAIN AND INTERDOMAIN ELECTRON-TRANSFER. *Journal of Biological Chemistry* 269, 32047-32050.

Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 357, 593-615.

Anderson, R.E., Meyer, F.B., 2000. Is intracellular brain pH a dependent factor in NOS inhibition during focal cerebral ischemia? *Brain Research* 856, 220-226.

Aoyama, K., Matsubara, K., Fujikawa, Y., Nagahiro, Y., Shimizu, K., Umegae, N., Hayase, N., Shiono, H., Kobayashi, S., 2000. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology* 47, 524-527.

Ara, J., Przedborski, S., Naini, A.B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R.R., Horwitz, J., Ischiropoulos, H., 1998. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7659-7663.

Bachschnid, M., Thurau, S., Zou, M.H., Ullrich, V., 2003. Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation. *Faseb Journal* 17, 914-+.

Balcioglu, A., Maher, T.J., 1993. DETERMINATION OF KAINIC ACID-INDUCED RELEASE OF NITRIC-OXIDE USING A NOVEL HEMOGLOBIN TRAPPING TECHNIQUE WITH MICRODIALYSIS. *Journal of Neurochemistry* 61, 2311-2313.

Barbiro-Michaely, E., Mendelman, A., Mayevsky, A., 2011. The evaluation of nitric oxide involvement in Metrazol induced status epilepticus using multiparametric monitoring. *Brain Research* 1377, 50-59.

Beckman, J.S., 1996. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology* 9, 836-844.

Bolanos, J.P., Peuchen, S., Heales, S.J.R., Land, J.M., Clark, J.B., 1994. NITRIC OXIDE-MEDIATED INHIBITION OF THE MITOCHONDRIAL RESPIRATORY-CHAIN IN CULTURED ASTROCYTES. *Journal of Neurochemistry* 63, 910-916.

Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z.Q., Huang, F., Xia, H.H., Peters, M.F., Froehner, S.C., Bredt, D.S., 1996. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757-767.

Calabrese, V., Scapagnini, G., Ravagna, A., Bella, R., Foresti, R., Bates, T.E., Stella, A.M.G., Pennisi, G., 2002. Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *Journal of Neuroscience Research* 70, 580-587.

Chen, Z.M., Muscoli, C., Doyle, T., Bryant, L., Cuzzocrea, S., Mollace, V., Mastroianni, R., Masini, E., Salvemini, D., 2010. NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamatergic pathway during nociceptive processing. *Pain* 149, 100-106.

Coert, B.A., Anderson, R.E., Meyer, F.B., 2003. Is neuroprotective efficacy of nNOS inhibitor 7-NI dependent on ischemic intracellular pH? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 284, H151-H159.

Crane, B.R., Arvai, A.S., Gachhui, R., Wu, C.Q., Ghosh, D.K., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., Tainer, J.A., 1997. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 278, 425-431.

de Vasconcelos, A.P., Marescaux, C., Nehlig, A., 1998. Age-dependent regulation of seizure activity by nitric oxide in the developing rat. *Developmental Brain Research* 107, 315-319.

Devasconcelos, A.P., Baldwin, R.A., Wasterlain, C.G., 1995. NITRIC-OXIDE MEDIATES THE INCREASE IN LOCAL CEREBRAL BLOOD-FLOW DURING FOCAL SEIZURES. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3175-3179.

Ding, J.M., Faiman, L.E., Hurst, W.J., Kuriashkina, L.R., Gillette, M.U., 1997. Resetting the biological clock: Mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *Journal of Neuroscience* 17, 667-675.

Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 22, 391-397.

Eliasson, M.J.L., Huang, Z.H., Ferrante, R.J., Sasamata, M., Molliver, M.E., Snyder, S.H., Moskowitz, M.A., 1999. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *Journal of Neuroscience* 19, 5910-5918.

Eliasson, M.J.L., Sampei, K., Mandir, A.S., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z.Q., Dawson, T.M., Snyder, S.H., Dawson, V.L., 1997. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Medicine* 3, 1089-1095.

Endres, M., Laufs, U., Liao, J.K., Moskowitz, M.A., 2004. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends in Neurosciences* 27, 283-289.

- Fabian, R.H., Dewitt, D.S., Kent, T.A., 1995. IN-VIVO DETECTION OF SUPEROXIDE ANION PRODUCTION BY THE BRAIN USING A CYTOCHROME-C ELECTRODE. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 15, 242-247.
- Flodstrom, M., Horwitz, M.S., Maday, A., Balakrishna, D., Rodriguez, E., Sarvetnick, N., 2001. Critical role for inducible nitric oxide synthase in host survival following coxsackievirus B4 infection. *Virology* 281, 205-215.
- Friebe, A., Koesling, D., 2009. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: What we can learn from genetic mouse models. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 21, 149-156.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. THE OBLIGATORY ROLE OF ENDOTHELIAL-CELLS IN THE RELAXATION OF ARTERIAL SMOOTH-MUSCLE BY ACETYLCHOLINE. *Nature* 288, 373-376.
- Garthwaite, J., 2010. New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Molecular and Cellular Biochemistry* 334, 221-232.
- Gatto, E.M., Riobo, N.A., Carreras, M.C., Chernavsky, A., Rubio, A., Satz, M.L., Poderoso, J.J., 2000. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 4, 534-539.
- Gonzalez-Martinez, J.A., Moddel, G., Ying, Z., Prayson, R.A., Bingaman, W.E., Najm, I.M., 2009. Neuronal nitric oxide synthase expression in resected epileptic dysplastic neocortex. *Journal of Neurosurgery* 110, 343-349.
- Gorren, A.C.F., Schrammel, A., Schmidt, K., Mayer, B., 1998. Effects of pH on the structure and function of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* 331, 801-807.
- Gursoy-Ozdemir, Y., Can, A., Dalkara, T., 2004. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke* 35, 1449-1453.
- Gyurko, R., Leupen, S., Huang, P.L., 2002. Deletion of exon 6 of the neuronal nitric oxide synthase gene in mice results in hypogonadism and infertility. *Endocrinology* 143, 2767-2774.
- Haghikia, A., Mergia, E., Friebe, A., Eysel, U.T., Koesling, D., Mittmann, T., 2007. Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *Journal of Neuroscience* 27, 818-823.

- Han, Y.X., Lin, Y.T., Xu, J.J., Cao, L.L., Liu, X.W., Jiang, H., Chi, Z.F., 2011. STATUS EPILEPTICUS STIMULATES PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR gamma COACTIVATOR 1-alpha/MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT SYSTEM PATHWAY BY A NITRIC OXIDE-DEPENDENT MECHANISM. *Neuroscience* 186, 128-134.
- Handy, R.L.C., Moore, P.K., 1998. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. *British Journal of Pharmacology* 123, 1119-1126.
- Hess, D.T., Patterson, S.I., Smith, D.S., Skene, J.H.P., 1993. NEURONAL GROWTH CONE COLLAPSE AND INHIBITION OF PROTEIN FATTY ACYLATION BY NITRIC-OXIDE. *Nature* 366, 562-565.
- Hirabayashi, H., Takizawa, S., Fukuyama, N., Nakazawa, H., Shinohara, Y., 1999. 7-nitroindazole attenuates nitrotyrosine formation in the early phase of cerebral ischemia-reperfusion in mice. *Neuroscience Letters* 268, 111-113.
- Huang, P.L., 1999. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32, 1353-1359.
- Huang, P.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H., Fishman, M.C., 1993. TARGETED DISRUPTION OF THE NEURONAL NITRIC-OXIDE SYNTHASE GENE. *Cell* 75, 1273-1286.
- Huang, Z.H., Huang, P.L., Ma, J.Y., Meng, W., Ayata, C., Fishman, M.C., Moskowitz, M.A., 1996. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 16, 981-987.
- Ignarro, L.J., 2000. Nitric Oxide, Biology and Pathobiology. Academia Press, San Diago. 1003P, 13, a
- Ignarro, L.J., 2000b. Nitric Oxide, Biology and Pathobiology. Academia Press, San Diago, 1003P, 27-29, b
- Kendrick, K.M., GuevaraGuzman, R., delaRiva, C., Christensen, J., Ostergaard, K., Emson, P.C., 1996. NMDA and kainate-evoked release of nitric oxide and classical transmitters in the rat striatum: In vivo evidence that nitric oxide may play a neuroprotective role. *European Journal of Neuroscience* 8, 2619-2634.
- Kim, G.W., Kondo, T., Noshita, N., Chan, P.H., 2002. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice - Implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 33, 809-815.

Kolesnikov, Y.A., Pick, C.G., Ciszewska, G., Pasternak, G.W., 1993. BLOCKADE OF TOLERANCE TO MORPHINE BUT NOT TO KAPPA-OPIOIDS BY A NITRIC-OXIDE SYNTHASE INHIBITOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 5162-5166.

Koprowski, H., Spitsin, S.V., Hooper, D.C., 2001. Prospects for the treatment of multiple sclerosis by raising serum levels of uric acid, a scavenger of peroxynitrite. *Annals of Neurology* 49, 139-139.

Kovacs, R., Rabanus, A., Otahal, J., Patzak, A., Kardos, J., Albus, K., Heinemann, U., Kann, O., 2009. Endogenous Nitric Oxide Is a Key Promoting Factor for Initiation of Seizure-Like Events in Hippocampal and Entorhinal Cortex Slices. *Journal of Neuroscience* 29, 8565-8577.

Kriegsfeld, L.J., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Nelson, R.J., Snyder, S.H., 1997. Aggressive behavior in male mice lacking the gene for neuronal nitric oxide synthase requires testosterone. *Brain Research* 769, 66-70.

Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Przedborski, S., 1999. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature Medicine* 5, 1403-1409.

Maneen, M.J., Hannah, R., Vitullo, L., DeLance, N., Cipolla, M.J., 2006. Peroxynitrite diminishes myogenic activity and is associated with decreased vascular smooth muscle F-actin in rat posterior cerebral arteries. *Stroke* 37, 894-899.

McCall, T.B., Feelisch, M., Palmer, R.M.J., Moncada, S., 1991. IDENTIFICATION OF N-IMINOETHYL-L-ORNITHINE AS AN IRREVERSIBLE INHIBITOR OF NITRIC-OXIDE SYNTHASE IN PHAGOCYtic-CELLS. *British Journal of Pharmacology* 102, 234-238.

McMillan, K., Adler, M., Auld, D.S., Baldwin, J.J., Blasko, E., Browne, L.J., Chelsky, D., Davey, D., Dolle, R.E., Eagen, K.A., Erickson, S., Feldman, R.I., Glaser, C.B., Mallari, C., Morrissey, M.M., Ohlmeyer, M.H.J., Pan, C.H., Parkinson, J.F., Phillips, G.B., Polokoff, M.A., Sigal, N.H., Vergona, R., Whitlow, M., Young, T.A., Devlin, J.J., 2000. Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1506-1511.

Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M., Koesling, D., 2006. Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *Journal of Clinical Investigation* 116, 1731-1737.

Misko, T.P., Moore, W.M., Kasten, T.P., Nickols, G.A., Corbett, J.A., Tilton, R.G., McDaniel, M.L., Williamson, J.R., Currie, M.G., 1993. SELECTIVE-INHIBITION OF THE INDUCIBLE NITRIC-OXIDE SYNTHASE BY AMINOGUANIDINE. *European Journal of Pharmacology* 233, 119-125.

- Pehl, U., Schmid, H.A., 1997. Electrophysiological responses of neurons in the rat spinal cord to nitric oxide. *Neuroscience* 77, 563-573.
- Pulvirenti, L., Balducci, C., Koob, G.F., 1996. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces intravenous cocaine self-administration in the rat. *Neuropharmacology* 35, 1811-1814.
- Russwurm, M., Behrends, S., Harteneck, C., Koesling, D., 1998. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochemical Journal* 335, 125-130.
- Russwurm, M., Wittau, N., Koesling, D., 2001. Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction - Targeting of the nitric oxide-sensitive $\alpha(2)\beta(1)$ guanylyl cyclase to synaptic membranes. *Journal of Biological Chemistry* 276, 44647-44652.
- Schmidtko, A., Gao, W., Konig, P., Heine, S., Motterlini, R., Ruth, P., Schlossmann, J., Koesling, D., Niederberger, E., Tegeder, I., Friebe, A., Geisslinger, G., 2008. cGMP produced by NO-sensitive guanylyl cyclase essentially contributes to inflammatory and neuropathic pain by using targets different from cGMP-dependent protein kinase I. *Journal of Neuroscience* 28, 8568-8576.
- Takizawa, S., Fukuyama, N., Hirabayashi, H., Nakazawa, H., Shinohara, Y., 1999. Dynamics of nitrotyrosine formation and decay in rat brain during focal ischemia-reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19, 667-672.
- Thiyagarajan, M., Kaul, C.L., Sharma, S.S., 2004. Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxyxynitrite decomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats. *British Journal of Pharmacology* 142, 899-911.
- Vincent, S.R., 1994. NITRIC-OXIDE - A RADICAL NEUROTRANSMITTER IN THE CENTRAL-NERVOUS-SYSTEM. *Progress in Neurobiology* 42, 129-160.
- Werner, E.R., Pitters, E., Schmidt, K., Wachter, H., WernerFelmayer, G., Mayer, B., 1996. Identification of the 4-amino analogue of tetrahydrobiopterin as a dihydropteridine reductase inhibitor and a potent pteridine antagonist of rat neuronal nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* 320, 193-196.
- White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S., 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences* 179, 1-33.
- Wojtal, K., Gniatkowska-Nowakowska, A., Czuczwar, S.J., 2003. Is nitric oxide involved in the anticonvulsant action of antiepileptic drugs? *Polish Journal of Pharmacology* 55, 535-542.
- Yu, Z.F., Bruce-Keller, A.J., Goodman, Y., Mattson, M.P., 1998. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *Journal of Neuroscience Research* 53, 613-625.
- Zdravotnická ročenka České republiky 2009. ÚZIS ČR

Internetové zdroje:

- 1) <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Reactive-Oxygen-Species-Including-Nitric-Oxide/Probes-for-Nitric-Oxide-Research.html#head4>
- 2) <http://www.blueboxsensors.com/userfiles/File/Database/Nitric%20Oxide%20Sensor.pdf>