

Dušikov oksid II: biološki učinki in učinkovine, ki sproščajo NO

Nitric oxide II: biological activity and compounds that dissociate NO

Janez Mravljak, Barbara Byrne Habič, Slavko Pečar

POVZETEK: Dušikov oksid kot ključni prenašalec v številnih fizioloških in patofizioloških procesih, izraža večino bioloških učinkov preko aktivacije topne guanilat ciklaze. Pri posameznih obolenjih je terapevtsko ugodno bodisi povečanje njegove koncentracije, ali pa zaviranje njegove prekomerne tvorbe. Poleg organskih nitratov, ki so v terapiji že vrsto let, preizkušajo nove NO-donorje z drugačnim mehanizmom sproščanja in učinki tudi na druge tarčne efektorske sisteme in tkiva.

Ključne besede: biološki učinki dušikovega oksida, donorji NO.

ABSTRACT: Nitric oxide, as a key mediator in many physiological and pathophysiological processes, expresses most of its biological effects by activation of soluble guanylyl cyclase. In some illnesses it is therapeutically desirable to increase its concentration, in others to inhibit its excessive formation. Apart from organic nitrates that have been used in therapy for several years, new NO donors with different mechanisms of dissociation and selective effects in other target effector systems and tissues have more recently been tested.

Key words: biological effects of nitric oxide, NO donors.

1 Uvod

V prvem delu preglednega prispevka o dušikovem oksidu (1) smo predstavili kemične ter radicalske lastnosti dušikovega oksida (NO) in pestrost kemičnih reakcij NO v organizmu. Dejstvo je, da je NO nepogrešljiv pri normalnem delovanju organizma in da je udeležen v mnogih patoloških procesih. Velika reaktivnost NO zahteva nemoteno delovanje regulatornih mehanizmov, ki nprestano skrbijo za uravnavanje nastajanja tako nevarne snovi, kot je NO in tudi drugih dejavnikov, s katerimi lahko NO reagira. Če sta hitrost nastajanja in koncentracija NO v določenem tkivu v sprejemljivih okvirih, potem lahko govorimo o koristnosti NO. Ker je prisotnost NO pomemben dejavnik in regulator biokemičnih procesov, se je porodila ideja, da bi lahko od zunaj (z zdravili) vplivali na nastajanje NO v organizmu, če je to nastajanje kakorkoli moteno, oziroma NO prekomerno nastaja. Zato so zanimive tako učinkovine, ki bi pripomogle k povečanju lokalne koncentracije NO, kot učinkovine, ki bi lokalno in selektivno zavirale nastajanje NO.

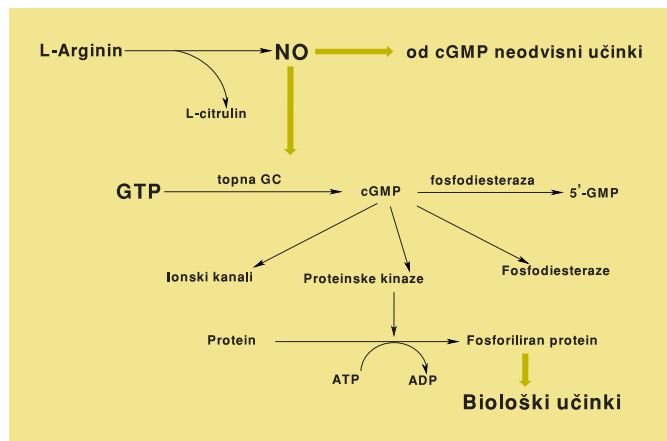
Razvoj novih učinkovin s selektivnimi vplivi na ravnovesje NO je še v začetnih razvojnih stopnjah. Znanе so že številne spojine vodnice in narejeni učinkoviti derivati. Učinkovine, ki se bodo na tem področju še pojavile, bodo korenito posegle v obravnavo nekaterih obolenj, kjer smo danes še brez učinkovitih zdravil, najbrž pa se bodo uveljavile tudi na področju preventive. V tem prispevku bomo po kratkem

pregledu patoloških stanj, kjer je udeležen NO, predstavili potencialne kandidate za učinkovine, ki sproščajo NO v *in vivo* pogojih. V tretjem preglednem članku pa bomo podrobneje obravnavali selektivne inhibitorje NO sintaz kot potencialne zdravilne učinkovine.

2 Nastajanje in učinki NO v organizmu

Delovanje NO je tesno povezano z encimi, ki ga tvorijo (NO sintaze ali krajše NOS), s porazdelitvijo NOS po tkivih in njihovo aktivacijo. NO sintetizirajo: endotelijska (eNOS), nevronska (nNOS) in inducibilna (iNOS) NOS (1). Sprva so menili, da sta le eNOS in nNOS običajno prisotna in tkivno značilna (konstitutivna) encima, medtem ko se iNOS pojavlja samo v posebnih (patoloških) razmerah (2). Danes vemo, da so v tkivih skoraj vedno prisotne in tudi potrebne vse tri oblike NOS, ki skupno prispevajo k celotni paleti učinkov NO.

Ugotovili so, da infuzija L-arginina (substrat za NOS) (2) povzroči hiter padec sistoličnega in diastoličnega tlaka tako pri zdravih prostovoljcih kot pri bolnikih s hipertenzijo. Opisani so tudi ugodni učinki L-arginina pri terapiji intraokularnega tlaka in pri ishemiji retine; v kombinaciji z antioksidanti pa naj bi ugodno vplival na potek zdravljenja ateroskleroze. Ideja, da bi bilo dodajanje L-arginina k hrani smiselno za zniževanje krvnega pritiska in po balonski angioplastiki, ker bi se



Slika 1: Nastanek in biološki učinki NO preko aktivacije topne gvanilat ciklaze (GC). GTP = gvanozin trifosfat; cGMP = ciklični gvanozin monofosfat; GMP = gvanozin monofosfat; ATP = adenzin trifosfat; ADP = adenzin difosfat.

Figure 1: Formation and biological effects of NO caused by activation of soluble guanylyl cyclase (GC). GTP = guanosine triphosphate; cGMP = cyclic guanosine monophosphate; GMP = guanosine monophosphate; ATP = adenosine triphosphate; ADP = adenosine diphosphate.

preko NO zmanjšala reaktivnost trombocitov, s čimer bi preprečili restenozo, žal nima neposredne uporabnosti, ker L-arginin ni le substrat za NOS, ampak vpliva na izločanje hormonov, na posamezne funkcije imunskega sistema in na celjenje ran, ki je neodvisno od NO.

NO, ki ga sintetizira eNOS, ima učinke predvsem v kardiovaskularnem sistemu, kjer sprosti gladke mišice v stenah žil, zavira adhezijo trombocitov in levkocitov, zavira razmnoževanje gladko-mišičnih celic, vpliva na angiogenezo in na izražanje žilno-endotelijskega rastnega faktorja (3, 4, 5). Nastali NO najprej aktivira v citosolu topno gvanilat ciklazo (tGC), ki začne proizvajati ciklični gvanozin monofosfat (cGMP), ta pa preko kaskade reakcij povzroči padeč koncentracije znotrajceličnega Ca^{2+} in s tem povezano relaksacijo miozinskih vlaken (slika 1) (6). Del teh učinkov so potrdili na živalskih modelih, ko so z inhibicijo eNOS povzročili vazokonstrikcijo (in posledično hipertenzijo) ter pospešeno aterosklerozo zaradi aktivacije trombocitov.

Tudi NO, ki ga tvori nNOS v perifernem živčevju, povzroča relaksacijo gladkih mišic tako v stenah žil kot v sfinktrih prebavil, v žolčniku in mehurju, v gobastem tkivu ter v dihalnih poteh. Ker NO deluje v isti kaskadni vrsti kot sildenafil (slika 1), ima vplive tudi na erektilno funkcijo. Tudi v skeletnih mišicah so dokazali prisotnost nNOS, vendar je vloga NO v tem okolju manj raziskana. Z uporabo inhibitorjev sklepajo na možno vlogo NO pri regulaciji kontrakcije, pri privzemu glukoze zaradi napora in pri kontroli tonusa arteriol znotraj mišic.

Vloga NO, ki ga proizvaja nNOS v centralnem živčnem sistemu (CŽS), je drugačna od do sedaj opisanih. Dokazali so, da NO sodeluje pri vedenju, ravnotežju, koordinaciji gibov in pri procesih pomnjenja. Del živčnega sistema, kjer se NO pojavlja kot mediator, so poimenovali "nitrenergično" živčevje (7). Raziskave delovanja tega dela živčevja so na začetku in verjetno se bo izkazalo, da je uravnava krvnega tlaka močno odvisna od noradrenergično pogojene vazokonstrikcije in nitrenergično pogojene dilatacije ter da njuno neravnovesje prispeva k nastanku hipertenzije.

Ugotovili so, da imata dejavni nNOS in eNOS v nekaterih organih različne in včasih celo nasprotujoče si učinke, čeprav oba encima proizvajata NO (3). Tako ima NO iz nNOS pozitiven inotropni učinek, verjetno posredno preko aktivacije sproščanja Ca^{2+} iz sarkoplazmatskega retikuluma, medtem ko NO, ki ga proizvaja eNOS, zmanjšuje aktivnost srca tako, da zavira z α -adrenoceptorji izzvano

kontraktilnost preko učinkov na L-tip Ca^{2+} kanalov. Ker je v obeh primerih NO produkt delovanja NOS in ker NO preko aktivacije tGC povzroči nastajanje cGMP, je zelo verjetna razlaga za različnost učinkov različna prostorska porazdelitev eNOS in nNOS ter različnost efektornega sistema, ki ga aktivira cGMP. Ker ima NO omejeno življenjsko dobo, bo NO iz eNOS ali nNOS aktiviral le sebi bližnje tarčne sisteme, kar pomeni, da razporeditev in aktivacija posameznega tipa NOS po tkivu lahko povzroči aktivacijo različnih tarčnih sistemov in s tem različne končne učinke.

Zanimiva je ugotovitev, da je nNOS udeležena tudi v patofizioloških procesih, medtem, kot za eNOS ni takih dokazov. Ugotovitve so pomembne za načrtovanje zaviralcev za posamezen tip NOS in za načrtovanje indikacijskega področja uporabe. Opravljene raziskave kažejo, da utegne biti zaviranje nNOS terapevtsko uporabnejše kot zaviranje eNOS.

Ker je zmanjšano nastajanje NO lahko vzrok mnogim gastrointestinalnim, urogenitalnim, erektilnim in respiratornim motnjam, so zanimive tudi snovi, ki v telesu lahko sproščajo NO. Te učinkovine (NO donorji) lahko oponašajo učinke nitrenergičnega sistema in jih že uporabljajo pri zdravljenju ahalazije ezofagusa (nesposobnost sprostitve gastroezofagealnega sfinktra pri požiranju). Raziskujejo tudi njihovo morebitno uporabnost pri zdravljenju neustreznega delovanja drugih GIT sfinktrov. Tako že uporabljajo gliceriltrinitrat (GTN, nitroglicerini) pri zdravljenju žolčnih kolik, amilnitrit pa so že leta 1882 uspešno uporabili za relaksacijo materničnega mišičja in s tem olajšali porod posteljice; vendar te učinke v ginekologiji in porodničarstvu ne uporabljajo pogosto. Z dajanjem GTN so uspeli zmanjšati krče maternice pri nosečnicah, ki jim je grozil prezgodnji porod, brez stranskih učinkov na kardiovaskularne parametre matere ali ploda, kar dodatno dokazuje pomembno vpletenost NO v fiziološke procese in uporabnost NO donorjev.

Tretja NOS, ki sintetizira NO, je inducibilna NOS (iNOS), opisana prvič v makrofagih kot ključni encim pri izražanju njihove citotoksičnosti. Ta izoformna oblika praviloma ni izražena v normalno aktivnih celicah; do indukcije pride v delečih se celicah kot odziv na dražljaj z bakterijskimi endotoksini ali citokini vnetja (8, 9). Ko je iNOS izražena, tvori velike količine NO, njena aktivnost pa za razliko od eNOS in nNOS, ni odvisna od intracelularne koncentracije Ca^{2+} . Kopicijo se

dokazi, da obstajajo vrstno-, tkivno- in celično-specifični pogoji za induktivno izražanje iNOS. Dejavnost iNOS je pomembna pri odstranjevanju ali obrambi pred protozoi, bakterijami, glivicami, virusi in rakavimi celicami ter pri uravnavanju tvorbe citokinov.

Zanimivo je, da se iNOS izraža tudi v celicah, ki niso neposredno udeležene pri obrambi organizma in v odsotnosti mikroorganizmov. V teh primerih je lahko nekontrolirana aktivnost iNOS škodljiva, kot je škodljiva prekomerna tvorba NO pri odzivu na infekcijo. Študije na miših z okvarjenim genom za iNOS so pokazale še druge fiziološke vloge iNOS, od katerih je zanimiva osteoklastna resorpcija kosti. Prisotnost in aktivnost iNOS je nadalje pomembna pri celjenju kožnih ran in črevesne sluznice ter pri zaščiti srca pred letalno ishemijo. Obstajajo dokazi, da je iNOS udeležena tako pri nastanku vnetja, kot pri odstranjevanju njegovih posledic, zato je trditev, da sta eNOS in nNOS fiziološki izoformni obliki, iNOS pa je udeležena samo v patologiji, pretirana in zavajajoča.

2.1 Vloga NO v nekaterih patoloških stanjih

Za okvirno predstavitev razširjenosti NO v organizmu in njegove vpletenosti v številne biokemične procese bomo na kratko predstavili nekatera stanja, kjer je vpletenost NO dokazana in kjer obstaja možnost, da bi se z vplivi na njegovo koncentracijo lahko doseglo tudi zdravielne učinke. Čeprav je do celovitega razumevanja biokemičnih procesov z udeležbo NO še daleč, pa so raziskave in razvoj novih učinkovin s selektivnimi vplivi na posamezne tipe NOS, aktualne že danes. Uporabna zdravielna učinkovina z vplivom na NOS bo morala zadostiti vsaj dvema pogojema: morala bo selektivno delovati na določen tip NOS in, kar bo veliko težje, morala bo delovati le v določenem tkivu. Slednja zahteva bo verjetno pomemben omejitveni dejavnik pri uvajanju učinkovin v terapevtsko uporabo.

Septični šok

NO, ki ga sintetizira iNOS pri septičnem šoku v velikih količinah, povzroči obsežno, na vazokonstriktorje odporno vazodilatacijo in povečano permeabilnost, kar je resna motnja v delovanju organizma (3). Nadalje endotoksini inducirajo NO sintezo v miokardu, endokardu in venah, kar dodatno prispeva k disfunkciji srca in manjšemu tonusu žil. Ko so pri ljudeh prvič (1991) uporabili inhibitorje NOS (N-monometil-L-arginin ali L-NMMA,) za zdravljenje simptomov septičnega šoka, so ugotovili ugodno hemodinamsko stabilizacijo pacientov. Poleg omenjenih učinkov NO pa spomnimo še na radikalske reakcije samega NO, ki smo jih že predstavili (1) in povzročijo neposredno okvaro tkiva.

Vnetje

NO, ki ga tvori eNOS v začetku vnetnega procesa, verjetno deluje v smeri zmanjšanja in omejitve vnetja z zaviranjem aktivacije levkocitov in agregacije trombocitov ter z vazodilatacijo. Nasprotno pa NO, ki ga tvori iNOS, prispeva h kroničnemu vnetju, zato bi bila uporaba selektivnih zaviralcev iNOS (in hkrati antioksidantov), primerna za zdravljenje kroničnih vnetnih procesov (3). Na živalskih modelih so že uspeli zmanjšati poškodbe tkiva pri akutnem vnetju, pri artritisu ter drugih vnetnih stanjih, vendar daljše jemanje NOS inhibitorjev zmanjša aktivnost osteoklastov in kostno maso, kar lahko privede do

stanja podobnega osteoporozi. Druga vnetna stanja, pri katerih prihaja do povečanega nastajanja NO so psoriza, astma in kronično vnetje prebavnega trakta (Crohnova bolezen), kjer pa so raziskave vpletenosti NO še na začetku.

Možganska kap

NO, ki se sprošča pri možganski kapi zaradi hipoksije in metabolnih sprememb, ki hipoksijo spremljajo, ima tako koristen, kot škodljiv učinek (3). V zgodnjem obdobju kapi, NO iz nNOS poveča nastajanje poškodb, medtem ko NO iz eNOS, deluje protektivno zaradi vazodilatacije. Neselektivni zaviralci NOS v tem primeru niso uporabni in lahko poškodbe zaradi kapi še povečajo, verjetno zaradi vazokonstrikcije. Poskusi na miših kažejo, da bi bili selektivni nNOS zaviralci lahko terapevtsko uporabni pri zmanjšanju posledic možganske kapi. Vloge iNOS pri kapi še niso uspeli v celoti ovrednotiti, dosedanje raziskave pa kažejo, da bo verjetno tudi inhibicija iNOS zaželena. Vsekakor pa bo tudi v tem primeru potrebno poskrbeti za zaustavitev radikalskih reakcij, v katere se vpleta NO in ki vodijo v poškodbe tkiva.

Diabetes

Diabetes, odvisen od insulina, je avtoimunska bolezen, ki vodi do propada celic β v pankreasu zaradi delovanja citokinov posredno in neposredno na te celice. Eden izmed predlaganih toksičnih mehanizmov njihovega delovanja je indukcija iNOS znotraj same β celice. NO zmanjša sposobnost celice za proizvodnjo in izločanje insulina in povzroči propad celice. Tudi makrofagi, ki infiltrirajo celice Langerhansovih otočkov v začetku razvoja diabetesa, izločajo citokine (npr. IL-1 β), ki povzročijo izražanje iNOS v makrofagih. Selektivni zaviralci iNOS so na živalih preprečili razvoj sladkorne bolezni po dajanju streptozotocina in bodo morda učinkoviti tudi pri preprečevanju propada pankreasnih celic pri človeku in s tem nastanka sladkorne bolezni.

Pri diabetesu so opazili zmanjšano nastajanje NO v endoteliju, s čemer so povezani znani simptomi: periferna vazokonstrikcija, zmanjšano praznjenje želodca, motena peristaltika in impotenca. Na podganah z diabetesom so dokazati zmanjšano aktivnost NOS in s tem povezano zmanjšano relaksacijo duodenuma. Razlogi za zmanjšano aktivnost NOS še niso v celoti proučeni (10).

Migrena

Pri pacientih z migreno glicerilnitrinat (GTN) sproži napad, ki je enak spontanemu napadu (11). Z L-NMMA napad zmanjšamo, vendar učinek ne gre preko vazokonstrikcije, saj se pretok v cerebralni arteriji ne spremeni. Do sedaj znana vloga NO in vpletenost serotonina pri migreni sta osnova za predpostavko, da migrenski napad sproži v ključnih predelih možganskega žilja serotonin, ki preko 5-HT_{2B/2C} receptorja povzroči sproščanje NO iz endotelija ali nitrenergičnega živčevja, ta pa vpliva na cerebrovaskularno perfuzijo. NO povzroči vazodilatacijo in aktivacijo živčnih končičev, da se sproži vnetju podoben proces, značilen za migreno.

Pulmonalna hipertenzija

Inhalacijska terapija novorojencev in odraslih z NO je morda presenetljiva uporaba NO, spričo relativno velike reaktivnosti/toksičnosti NO (12). Z uporabo lokalno nizke koncentracije

NO (<80 ppm) v zmesi zraka za vdihavanje, ublažimo njegove morebitne neugodne sistemske učinke. Vazodilatoren učinek je omejen na arterije, ki so še do neke mere ventilirane. Ker so na voljo učinkoviti sistemi spremljanja dejanskega odmerka NO, ki ga dobi bolnik, so zmanjšali možnost predoziranja, vendar problemi povratne inhibicije NOS zaradi dajanja eksogenega NO in podaljšan čas strjevanja krvi (13), še niso rešeni.

Agregacija trombocitov in ateroskleroza (5)

Lastnost organskih nitratov, da zmanjšajo agregacijo trombocitov se zaradi hipotenzivnega učinka klinično ne izkorišča. Za to indikacijo je zanimiv S-nitrozoglutation (slika 2), stabilen nitrozotiol in donor NO, ki agregacijo močno inhibira, a hkrati le minimalno zniža krvni tlak. Uporablja se v primerih, ko terapija z acetilsalicilno kislino in heparinom pri transmuralni koronarni angioplastiki ni uspešna. Ker NO preprečuje adhezijo levkocitov tudi na venule, inhibira mitozo in proliferacijo gladkega mišičja žil in drugih celic, je verjetno, da bodo med bodočimi donorji NO tudi uporabna zdravila proti aterosklerozi (3).

Celjenje ran

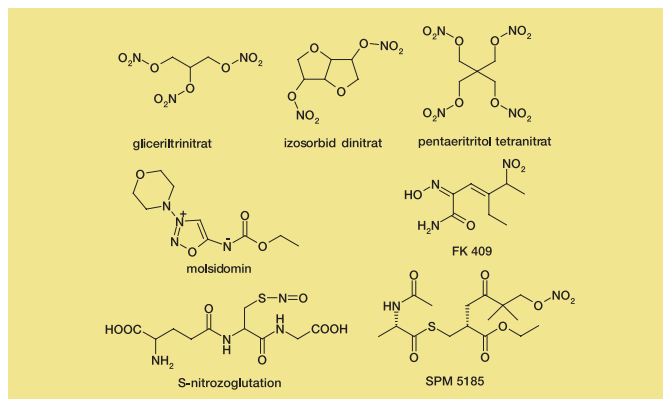
NO in donorji NO imajo ugodnem vpliv na celjenje ran (14, 15), vendar vloga NO pri tem procesu še ni v celoti pojasnjena. Tudi pri diabetikih NO deluje ugodno, ker je pri njih zmanjšana endogena sinteza NO (10). Poročajo o inhibitorynem učinku NO na sintezo kolagena v rani pri topikalni aplikaciji natrijevega nitroprusida in arginina. Kompetitiven zaviralec NOS, metilni ester N-nitro-L-arginin pa je povečal koncentracijo kolagena v ranjenem tkivu (16).

Protitumorna terapija

Imunoterapija tumorjev z interleukinom-2 (zdravljenje renalnih tumorjev) in terapija s faktorjem tumorske nekroze (TNF α) vodi do indukcije NOS in posledične hipotenzije (17). Z zaviranjem nastajanja NO (L-NMMA) so uspeli preprečiti hipotenzijo, kar močno poveča učinkovitost terapije. Predvidevajo, da bi lahko še povečali učinkovitost z dajanjem višjih odmerkov interleukina-2 in TNF α sočasno z L-NMMA, ki bi nevtraliziral stranski učinek hipotenzije.

3 Donorji NO in njihova možna terapevtska uporabnost

Poleg NO (plin), ki ga dodajajo novorojencem v zrak za inhaliranje (12), se v terapiji že dolgo uporabljajo učinkovine, ki v *in vivo* pogojih sproščajo NO. Med njimi je nitroglicerol (gliceriltrinitrat, GTN, slika 2) ena najstarejših (11,18,19) saj se v terapiji uporablja že več kot stoletje. Organski nitriti (slika 2) se uporabljajo pri stabilni in nestabilni angini pectoris, koronarnem vazospazmu, srčni kapi in pri kronični kongestivni bolezni srca. Delovanje nitratov pri angini pectoris je posledica vazodilatacije v venah, kar zmanjša priliv krvi v srce in s tem ventrikularni volumen ter pritisk. V nekoliko večjih odmerkih organski nitriti dilatirajo tudi arterije in zmanjšajo upor v odvodnicah iz srca, kar spet zmanjša potrebo po kisiku v srčni miškulaturi. Kadar je angina pectoris posledica vazospazma koronarnih arterij, organski nitriti poleg omenjene zmanjšane porabe kisika srca, dilatirajo še stisnjene koronarke (20, 21). Poleg te uporabe, so nitriti učinkoviti pri izboljšanju prekrvavitve uterusa pri nosečnicah, ki jim grozi preeklampsija povezana z zmanjšano produkcijo NO.

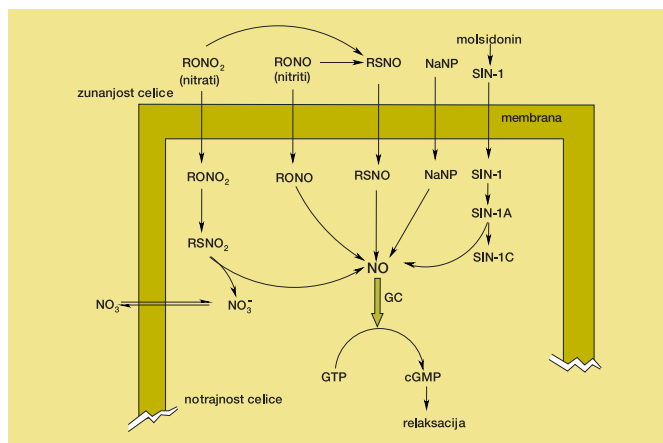


Slika 2: Organski nitriti: gliceriltrinitrat, izosorbid dinitrat in pentaeritritol tetranitrat, molsidomin in FK 409, S-nitrozoglutation in SPM 5185.

Figure 2: Organic nitrates: glyceryltrinitrate, isosorbide dinitrate, pentaerythritol tetranitrate, molsidomine and FK 409, S-nitrosoglutathione and SPM 5185.

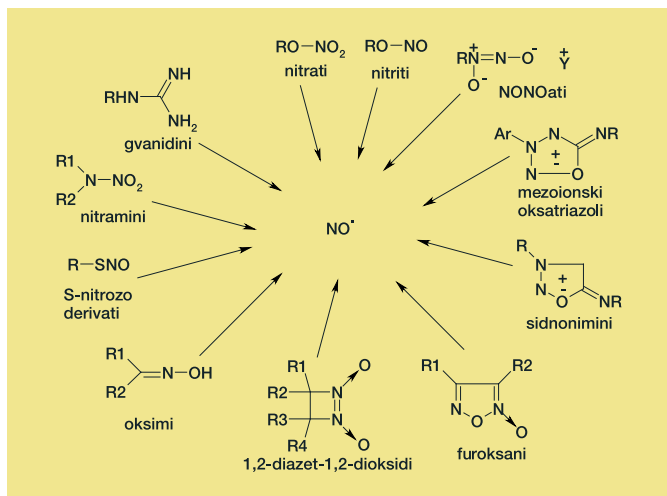
Klasični donorji NO so estri dušikove(V) kisline in poliola, npr.: GTN, izosorbid dinitrat, izosorbidmononitrat, pentaeritritol tetranitrat (slika 2), anorganske nitrozo spojine (natrijev nitroprusid), S-nitrozotiole (S-nitrozo-N-acetil-D,L-penicilamin, S-nitrozoglutation), diazodiolati (NONO-ati in alkil-NONO-ati), oksimi (FK 409), hidroksilamini in druge spojine (18,19). Novejši NO donor je sidnonimin (molsidomin, SIN-1 = linsidomin) (slika 2).

Delovanje organskih nitratov so pojasnili šele z odkritjem NO in z ugotovitvijo, da nitriti v nizu pretvorb v telesu, lahko sproščajo NO (slika 3). Pri tem sodelujeta glutation-S-transferaza in citokrom P450, pri neencimski poti pa so pomembni v citosolu prisotni tioli. Po obeh



Slika 3: Poti nastanka NO iz različnih vrst NO donorjev: $RONO_2$ = organski nitrat; $RSNO_2$ = tionitrat; $RONO$ = organski nitrit; $RSNO$ = S-nitrozotiol; $NaNP$ = natrijev nitroprusid; GC = gvanilat ciklaza; SIN = metabolit molsidomina (22)

Figure 3: Pathways of NO formation from different classes of NO donors: $RONO_2$ = organic nitrate; $RSNO_2$ = thionitrate; $RONO$ = organic nitrite; $RSNO$ = S-nitrosothiol; $NaNP$ = sodium nitroprusside; GC = guanylate cyclase; SIN = metabolite of molsidomine (22)



Slika 4: Kemične strukture, ki v *in vivo* pogojih sproščajo NO (15).

Figure 4: Groups, which can dissociate NO in vivo (15).

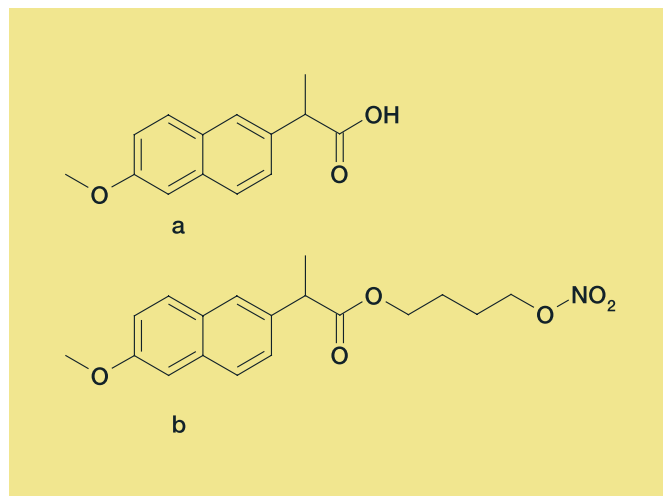
poteh naj bi nastal nestabilen tionitrat ali nitrozotiol kot intermediat. Natrijev nitroprusid spontano sprošča NO po doslej še neznanem mehanizmu, molsidomin pa se v jetrih pretvori v metabolit SIN-1, ki po hidrolizi sprošča NO po reakciji s kisikom, pri čimer nastane tudi superoksidni anion (22).

Na izoliranih organih so pokazali, da SPM 5185 [N-nitratopivaloil-S-(N'-acetilalanil)-cistein] (slika 2) dilatira vene in arterije tudi v primeru, ko so z dolgotrajnim dajanjem GTN povzročili toleranco (23).

Poleg natrijevega nitroprusida, ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$), anorganski donor NO), in estrov dušikove(V) kisline, poznamo še številne druge dušikove spojine, ki lahko v *in vivo* pogojih sproščajo NO, neodvisno od aktivnosti NOS (18,19). Nabor struktur, ki imajo možnost sproščanja NO je na sliki 4, vendar bo pot od tu do morebitnih učinkovin še dolga, ker bo potrebno v molekule z donorskim delom vgraditi še selektivnost in ustrezne transportne lastnosti.

3.1 Modificirane nesteroidne protivnetne učinkovine (NSAD) kot donorji NO

NSAD, ki z inhibicijo ciklooksigenaze-1 (COX-1) in ciklooksigenaze-2 (COX-2) (24) zavirajo sintezo prostaglandinov, hkrati zmanjšajo tudi prekrvavljenost prebavne sluznice in adhezijo nevtrofilcev, kar vodi v patološke poškodbe sluznice prebavnega sistema (GIT). Ko so ugotovili vlogo NO pri zaščiti mukozne plasti sluznice GIT, se je porodila ideja, da bi v molekulo NSAD uvedli NO donorsko skupino in tako zmanjšali njihovo toksičnost. Učinki NO v GIT so namreč podobni učinkom prostaglandinov, poleg tega pa NO zavre izražanje iNOS, katere sinteza je pri vnetju in poškodbah povečana (25). Na živalskih modelih so več tednov preizkušali derivate flubiprofena, ketoprofena, diklofenaka in naproksena (slika 5), ki so bili spremenjeni tako, da je bila molekula hkrati inhibitor ciklooksigenaze in NO donor. Nove učinkovine so estri znanih NSAD z dioli, ki imajo drugo hidroksilno skupino zaestreno z dušikovo(V) kislino. Učinkovine inhibirajo COX-1 in COX-2, podobno kot matične spojine, vendar brez neugodnih stranskih učinkov na sluznico. Klinična testiranja teh učinkovin že potekajo (26,27).



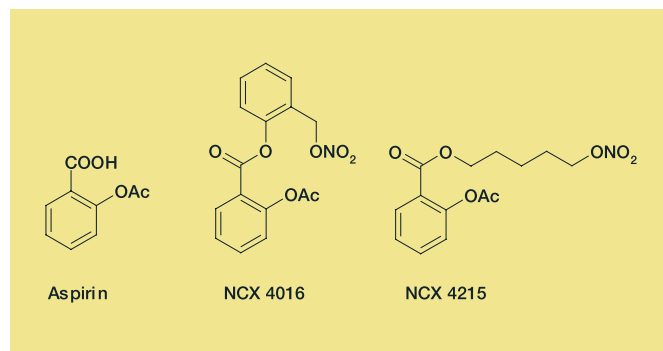
Slika 5: Naproksen (a) in (+)-4-(nitrooksi)butil 2-(6-metoksi-2-naftil)propanoat (b, NO naproksen)

Figure 5: Naproxene (a) and (+)-4-(nitrooxy)butyl 2-(6-methoxy-2-naphthyl)propanoate (b, NO-Naproxene)

NO ugodno vpliva na kontraktilno in metabolične funkcije v ishemičnem srcu ter sodeluje pri nastanku prostanooidov. Po infarktu nastaja NO v srčni mišici zaradi aktivnosti iNOS v makrofagih v pogojih ishemije. Ker je vrh aktivnosti iNOS dva dni po začetku infarkta, se je pojavila ideja o "novem Aspirinu" z donorsko NO stransko verigo (slika 6). Sproščanje NO je pomembno pri ishemiji, kjer vpliva na vazodilatacijo koronark in izboljša funkcijo srca, tako da zmanjša kontraktilnost, kar pomeni varčevanje z energijo poškodovanega srca. "NO-Aspirini" bi bili tako posebej koristni v prvi fazi infarkta, ko se NO še ne sprošča iz poškodovanih celic (28).

3.2 Razvoj selektivnih donorjev NO

Z razkrivanjem pomembne in nenadomestljive vloge NO v fizioloških in patofizioloških procesih se odpirajo možnosti za nove učinkovine, ki bi selektivno povečale koncentracije NO v določenih ciljnih tkivih (22). Za doseganje selektivnosti učinkov v željenih tkivih že danes pri načrtovanju skušajo izrabiti znane porazdelitve encimov, še zlasti



Slika 6: Strukture Aspirina in "NO Aspirinov": NCX 4215 in NCX 4016

Figure 6: Structures of Aspirin and "NO-Aspirins": NCX 4215 and NCX 4016

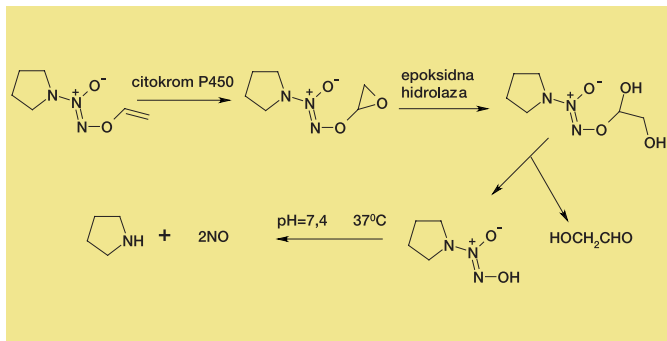
tistih, ki lahko sodelujejo pri pretvorbi predzdravila v obliko, ki sprošča NO. Slika 7 prikazuje nastanek NO iz V-PYRRO/NO v jetrih zaradi kemijskih pretvorb predzdravila z jetrnimi encimi.

Selektivni donorji NO se bodo pojavili kot zdravila ali kot predzdravila, ko bo zadovoljivo rešen problem sproščanja NO v določenem organu ali tkivu. Rešitev tega problema je lahko čisto tehnološka z ustreznimi dostavnimi sistemi, farmacevtsko-kemična z ustreznimi predzdravili ali kombinirana. Takoj, ko bodo rešeni omenjeni problemi, lahko pričakujemo večje spremembe v zdravljenju mnogih obolenj.

5 Sklep

Poleg znanih donorjev dušikovega oksida, ki jih že vrsto let uspešno uporabljamo v terapiji in katerih delovanje so pojasnili z odkritjem vloge NO v telesu, raziskovalci iščejo in preizkušajo nove zdravilne učinkovine, z drugačnimi mehanizmi sproščanja NO, ki bi lahko delovale na željena tarčna mesta. Obetaven pristop je razvoj učinkovin z dvojnimi učinkom, ko izhajamo iz znane učinkovine, na katero uvedemo farmakoforno skupino, ki v *in vivo* pogojih sprošča NO.

Danes niso več problem spojine, ki pod določenimi pogoji lahko sproščajo NO ampak je problem sproščanje NO samo v določenem ciljnim organu ali tkivu. Rešitev tega težkega problema je velik izziv za raziskovalce novih tkivno selektivnih donorjev NO. Kljub veliki količini informacij o sestavi in delovanju našega organizma je do odkritja tkivno specifičnega in za zdravljenje uporabnega donorja NO še daleč.



Slika 7: Predviden nastanek NO iz V-PYRRO/NO v prisotnosti jetrnih encimov

Figure 7: Anticipated NO formation from V-PYRRO/NO caused by liver enzymes

6 Literatura

- Byrne Habič B, Mravljak J, Pečar S. Dušikov oksid I: lastnosti, kemična reaktivnost in nastajanje NO v organizmu. *Farm Vestn* 2004; 55: 283-291.
- Moncada S, Higgs E A. Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies Related to Nitric Oxide. *FASEB J* 1995; 9: 1319-1330.
- Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why?. *Drug Discov Today* 2002; 1: 939-950.
- Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of Nitric Oxide in the Modulation of Angiogenesis. *Curr Pharm Design* 2003; 9 (7): 521-530.
- Cooke J P, Dzau V J. NITRIC OXIDE SYNTHASE: Role in the Genesis of Vascular Disease. *Annu Rev Med* 1997; 48: 489-509.
- Voet D, Voet J G. NO and Possibly CO Are Biological Messengers. In: *Biochemistry*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995: 1290-1291.

- Toda N, Okamura T. The Pharmacology of Nitric Oxide in the Peripheral Nervous System of Blood Vessels. *Pharmacol Rev* 2003; 55(2): 271-324.
- Kröncke K D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 147-156.
- Rao K M K. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Env Heal B* 2000; 3(1): 27-58.
- Schafer M R, Tantry U et al. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiological correlation. *Surgery* 1997; 121 (5): 513-9.
- Behrends S. Drugs that Activate Specific Nitric Oxide Sensitive Guanylyl Cyclase Isoforms Independent of Nitric Oxide Release. *Curr Med Chem* 2003; 10: 291-301.
- Hurford W E, Steudel W, Zapol W M. Clinical Therapy with Inhaled Nitric Oxide in Respiratory Diseases. In: Ignarro L J. Nitric Oxide, Biology and Pathobiology. Academic press, 2000: 932-947.
- Kerwin J F, Lancaster J R, Feldman P L. Nitric Oxide: A New Paradigm for Second Messengers. *J Med Chem* 1995; 38: 4343-4362.
- Muscara M N, McKnight W, Asfaha S et al. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* 2000; 129 (4): 681-6.
- Schafer M R, Fuchs N, Proksch B et al. Tacrolimus impairs wound healing: a possible role of decreased nitric oxide synthesis. *Transplantation* 1998; 65 (6): 813-8.
- Shukla A, Rasik A M, Shankar R. Nitric oxide inhibits wound collagen synthesis. *Mol Cell Biochem* 1999; 200 (1-2): 27-33.
- Hobbs A J, Higgs A, Moncada S. Inhibition of Nitric Oxide Synthase as a Potential Therapeutic Target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:191-220.
- Granik V G, Ryabova S Y, Grigoriev N B. Exogenous nitric oxide donors and inhibitors of its formation (the chemical aspects). *Russ Chem Rev* 1997; 66: 717-731.
- Granik V G, Grigor'ev N B. Exogenous donors of nitric oxide (a chemical aspect). *Russ Chem Bull* 2002; 51: 1375-1422.
- Zazinger J, Feelisch M, Bassenge E. Novel organic nitrates are potent dilators of large coronary arteries with reduced development of tolerance during long-term infusion in dogs: role of the sulfhydryl moiety. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23: 772-778.
- Kelly R A, Smith T W. Nitric Oxide and Nitrovasodilators: Similarities, Differences and Interactions. *Am J Cardiol* 1996; 77: 2C-7C.
- Feelisch M. Biotransformation to nitric oxide of organic nitrates in comparison to other nitrovasodilators. *Eur Heart J* 1993; 14 (Supplement I): 123-132.
- Arnet U, Yang Z, Siebenmann R et al. Development of nitrate tolerance in human arteries and veins: comparison of nitroglycerin and SPM 5185. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 401-406.
- Pečar S. Inhibitorji ciklooksigenaze-2 kot antirevmatiki. *Farm Vestn* 2004; 55: 119-123.
- Wolfe M M. Future Trends in the Development of Safer Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Am J Med* 1998; 105 (5A): 44S-52S.
- Wallace J L. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Gastroenteropathy: The second Hundred Years. *Gastroenterology* 1997; 112: 1000-1016.
- Wallace J L, Pittman Q J, Cirino G. Nitric oxide-releasing NSAIDs: a novel class of GI-sparing antiinflammatory Drugs. *Agents Actions Suppl* 1995; 46: 121-99.
- Bing R J, Yamamoto T, Yamamoto M et al. New look at myocardial infarction: toward a better aspirin. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 25-31.