

FUNZIONI BIOLOGICHE DELL'OSSIDO NITRICO (NO)

NO è un gas diffusibile classificabile come II messaggero in grado di:
modulare l'attività di enzimi specifici che legano NO: es. guanilato-ciclastasi che porta alla formazione del II messaggero cGMP (nella muscolatura liscia cGMP causa dilatazione)
legare e modificare enzimi e canali ionici (nitrosilazione) che cambiano così la loro attività

NO è prodotto dall'enzimo NO-sintasi che degrada l'arginina a citrullina liberando una mol di NO

Esistono diverse isoforme di NO-sintasi schematicamente classificabili in base alla loro attività basale

NO-sintasi costitutiva calcio-dipendente: è attivata solo quando nella cellula aumenta la concentrazione dello ione calcio; è l'isoforma normalmente presente nell'endotelio in cui NO si forma solo "a comando", diffonde nelle cellule muscolari vicine causandone rilassamento e nel lume del vaso inibendo l'aggregazione piastrinica. E' presente anche nel SNC dove regola diverse funzioni sinaptiche
NO-sintasi inducibile calcio-indipendente: è sempre attiva; quindi la attività totale di una cellula dipende da quanto enzima la cellula produce (induzione). E' la forma di NO-sintasi presente nei macrofagi: nelle cellule a riposo vi è poco enzima, quando la cellula viene attivata da stimoli vari (es infiammazione, presenza di batteri) essa viene "indotta" a produrre molta NO-sintasi. L'alta concentrazione di enzima porta alla produzione di grosse quantità di NO che uccidono il batterio (e lo stesso macrofago).

NO è rapidamente degradato/inattivato: è quindi fondamentalmente un secondo messaggero "ad azione locale"; è diverso dai classici secondi messaggeri in quanto può svolgere i propri effetti anche su cellule diverse da quelle che lo hanno prodotto

STORIA DELLA SCOPERTA DEL RUOLO BIOLOGICO DEL NITROSSIDO

Numerosi agenti ad attività vasodilatatrice agiscono stimolando la produzione di EDRF

La prima osservazione che l'endotelio potesse svolgere un ruolo attivo nel rilasciamento della muscolatura liscia vasale a seguito di appropriata stimolazione farmacologica fu di Furchgott e Zawadzki che, nel 1980, documentarono come la rimozione dell'endotelio da preparati vascolari in vitro, fosse in grado di prevenire la vasodilatazione indotta da acetilcolina (Figura 26.1). Per spiegare tale fenomeno essi suggerirono l'esistenza di un Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF), che veniva liberato dalle cellule endoteliali a seguito della stimolazione con acetilcolina e che rappresentava il mediatore dell'azione rilasciante sulle cellule muscolari lisce vasali. A tale originale osservazione seguirono altri studi che documentarono come stimoli di altra natura (quali la bradichinina, l'ADP, la trombina ecc.) fossero in grado di determinare vasodilatazione dipendente dall'endotelio. Venne, inoltre, documentato come il rilascio di EDRF fosse correlato a variazioni dei livelli intracellulari di Ca^{2+} , dal momento che alcuni Ca^{2+} ionofori, quali l'A23187 o lo U44619, che non agiscono attraverso recettori di membrana ma incrementando direttamente le concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} , dimostrarono proprietà simili all'acetilcolina ed alla bradichinina nel rilasciare EDRF. Analogamente, è stato possibile tracciare il profilo farmacologico dell'EDRF. Infatti, è stato documentato come tale intermediario labile rilasciato dalle cellule endoteliali avesse un'emivita di pochi secondi, venendo la sua azione biologica a cessare in presenza di ossiemoglobina e superossido, un radicale di O_2 , a sua volta inattivato da un enzima, la superossido dismutasi (SOD), che potenzia notevolmente l'azione dell'EDRF. Un fondamentale contributo nella precisazione del meccanismo di azione dell'EDRF derivò, in quegli anni, dalla scoperta di come l'EDRF agisse rilasciando il muscolo liscio vasale ed extravasale attraverso la stimolazione della guanilato ciclasi solubile. Tra l'altro, si dimostrò come le cellule endoteliali esercitassero un'importante azione antiaggregante piastrinica attraverso il rilascio di EDRF, allargando ulteriormente il campo di interesse per questo composto che veniva sempre più a rivestire un significato di fondamentale importanza come regolatore locale del microcircolo.

L'EDRF è il nitrossido

La precisazione del profilo farmacologico dell'EDRF si rivelò utile ai fini di una sua identificazione in termini biochimici. Infatti, le caratteristiche di emivita e le modalità di rilascio e di inibizione dell'EDRF presentavano importanti analogie con alcuni nitroderivati utilizzati nel trattamento della cardiopatia ischemica quali gli esteri dei nitrati (nitroglicerina, isosorbide dinitrato ecc.). La possibilità che l'organismo potesse produrre nitrati in maniera indipendente dalla dieta era nota da tempo. Fu però solo all'inizio degli anni ottanta che si precisò meglio il concetto di una fonte endogena di produzione per il nitrato negli organismi viventi. Dal momento che la fonte più importante di nitrato è rappresentata dall'NO, era piuttosto difficile immaginare che un gas, ritenuto sino a quell'epoca provvisto di soli effetti tossici, potesse essere di utilità nella fisiologia degli organismi viventi. Tuttavia, in tal senso orientavano studi in vitro sull'attività dei macrofagi che, attivati da endotossine o citochine, rilasciavano NO in quantità tali da determinare un effetto tossico per i microrganismi. Inoltre, Hibbs e coll. nel 1987 documentarono come la fonte di tale gas era un aminoacido, la L-arginina e come la metilazione di tale aminoacido portasse ad inibizione del rilascio di NO. Tali osservazioni ben si conciliavano con alcune osservazioni preliminari in cui era stato dimostrato come l'NO rappresentasse un potente attivatore della guanilato ciclasi in tessuti cerebrali e come la stessa L-arginina potesse incrementare i livelli di cGMP in colture neuronali. Esistevano, dunque, tutti i presupposti per immaginare che l'EDRF fosse intimamente correlabile con un nitroderivato che somigliasse all'NO. Moncada e coll. nel 1987 (vedi Moncada et al., 1991), documentarono che l'EDRF corrispondeva all'NO, come evidenziato con tecniche di chemiluminescenza; inoltre, aveva la stessa breve emivita, le stesse caratteristiche farmacologiche (inibizione con ossiemoglobina e blu di metilene e potenziamento con la SOD) e determinava gli stessi effetti nelle cellule bersaglio, producendo vasodilatazione ed inibizione dell'aggregazione piastrinica. Inoltre, è stato possibile documentare come l'NO fosse prodotto dal gruppo guanidino-terminale della L-arginina durante la sua degradazione enzimatica in citrullina e di come tale bioconversione fosse inibita da un analogo metilato della L-arginina, la monometil-arginina (L-NMMA), come originariamente documentato da Hibbs e coll. (1987). Questa scoperta veramente straordinaria ha aperto nuove frontiere nella comprensione dei meccanismi di regolazione della pressione arteriosa, della circolazione distrettuale (coronarica, cerebrale, renale, mesenterica, degli arti, dei corpi cavernosi etc.) nonché del ruolo svolto dall'NO a livello del SNC e di altri importanti distretti dell'organismo.

CHIMICA DELL'NO

L'NO è un radicale libero di azoto presente in condizioni normali come inquinante atmosferico e nel fumo di sigaretta. I radicali liberi sono specie chimiche in cui gli elettroni del livello energetico più esterno sono spaiati; essi tendono a reagire attivamente con i tessuti biologici determinando variazioni dello stato chimico-fisico delle molecole con cui vengono a contatto. La forma elettronicamente più diffusa in natura è dei radicali liberi dell'azoto è NO, detto nitrossido. L'NO è in uno stato intermedio di ossidazione per cui è in grado sia di ossidare che di ridurre i composti chimici con cui viene a contatto.

L'NO può interagire in diversi modi con la materia vivente, trasformandosi in composti più stabili che possono sia essere attivi a livello biologico che essere utili come indici biochimici della produzione di NO. Tali reazioni sono riassunte nella tabella 26.1.

Interazioni con O_2 . L'NO può interagire con O_2 formando NO_2 sotto forma di gas o nitrito (NO_2^-) in soluzione acquosa. L' NO_2^- è uno dei prodotti che si formano costantemente in natura come conseguenza della produzione di NO e della sua successiva interazione con l' O_2 ; la sua misurazione è un utile indice della produzione di NO.

Interazioni con anione superossido (O_2^-). Oltre che con l' O_2 , l'NO è in grado di reagire con un altro radicale libero presente nei liquidi biologici o nelle cellule, l'anione superossido (O_2^-), trasformandosi in perossinitrito ($-\text{OONO}$) e quindi in nitrato (NO_3^-). L'abnorme formazione di $-\text{OONO}$ è di estrema importanza nell'indurre danno e morte cellulare come verrà discusso in altra parte del capitolo.

Interazioni con ozono. L'NO può interagire con l'ozono (O₃) formando NO₂ attivato. Tale NO₂ ad alta energia può essere misurato mediante tecniche di chemiluminescenza spesso utilizzate per determinare le concentrazioni di NO.

Interazioni con ossiemoglobina ed altre emoproteine. In presenza di ossiemoglobina (Hb₃+O₂) l'NO interagisce con essa formando metaemoglobina e nitrato (NO₃⁻). Anche questa reazione è un utile indice di studio della produzione di NO e potrebbe risultare estremamente utile nella spiegazione di alcuni meccanismi patogenetici coinvolti in talune patologie, come alcune sindromi peripartum od in corso di fenomeni emorragici, in cui vi sia un elevato rilascio di Hb₃+O₂. Tale reazione, inoltre, rappresenta il prototipo di tutta una serie di reazioni dell'NO con le cosiddette emoproteine in cui il ferro (Fe²⁺) è complessato con la protoporfirina. L'NO, interagendo con il ferro dell'eme, produce un nitrosil-eme che può essere misurato spettrofotometricamente. Di particolare rilievo, nell'ambito delle interazioni con le emoproteine, è la reazione dell'NO con la guanilato ciclasi solubile, che rappresenta il vero recettore per l'NO. L'interazione dell'NO con il ferro dell'eme contenuto nella guanilato ciclasi, produce una modificazione conformazionale dell'enzima che, nella forma nitrosilata, è attivo e induce l'aumento della concentrazione intracellulare di GMP ciclico (3'5'-cGMP). L'NO non è invece capace di attivare la guanilato ciclasi di membrana (insolubile).

Interazioni con composti solforati. Una reazione che, oltre ad essere ricorrente in natura, potrebbe essere di rilievo nell'azione biologica dell'NO, è rappresentata dalla nitrosilazione di alcuni composti solforati e formazione di nitrosotioili. Per esempio, la cisteina può interagire con l'NO formando S-nitroso-cisteina: quest'ultimo composto è un importante attivatore della guanilato ciclasi e recentemente è stato ipotizzato che l'EDRF possa essere S-nitroso-cisteina anziché NO.

Interazioni con amine. Un'altra reazione di importanza biologica è la nitrosilazione delle amine. Le nitrosamine, rilasciate dai macrofagi dopo stimolazione con linfocchine od endotossine, esercitano un'azione tossica nei confronti dei batteri contribuendo all'attività di difesa operata dai macrofagi nei confronti degli agenti infettivi.

BIOSINTESI DELL'NO

L'NO è sintetizzato a partire dalla L-arginina

La biosintesi dell'NO nelle cellule endoteliali ed in altri distretti dell'organismo avviene principalmente attraverso la trasformazione dell'aminoacido L-arginina in citrullina (Figura 26.2); fonti alternative di produzione non possono, a tutt'oggi, essere escluse. Analoghi della L-arginina, quali la N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), agiscono da falsi substrati e sono inibitori selettivi della produzione di NO. Tali inibitori della NO sintetasi inducono un'importante riduzione della produzione sia di NO che di citrullina. L'azione della L-NMMA può essere antagonizzata dalla L-arginina ma non dalla D-arginina.

La biosintesi di NO avviene per passaggi successivi. Il primo consiste nella trasformazione della L-arginina in idrossi-arginina da parte della NO sintetasi; questa reazione, che è catalizzata da una porzione specifica dell'enzima, richiede la presenza di un cofattore enzimatico, la tetraidrobiopterina. La idrossiarginina interagirebbe quindi con H₂O₂ sviluppata per opera dell'attività catalasica propria di un'altra porzione dell'enzima della NO sintetasi e che richiede come cofattori NADPH, FAD ed FMN. A tale reazione seguirebbe la formazione di un ulteriore substrato intermedio che, infine, verrebbe convertito in citrullina liberando NO. Ne deriva che la NO sintetasi è un complesso di attività enzimatiche, intimamente connesse fra loro, che consistono in una *monoossigenasi tetraidrobiopterino-dipendente*, una *diidropteridina riduttasi NADPH-dipendente* ed una *NADPH ossidasi*.

La NO sintetasi può essere costitutiva o inducibile

La NO sintetasi è stata purificata da diversi tessuti di mammifero. La forma endoteliale dell'enzima è detta *costitutiva* ed è una proteina di 1429 aminoacidi con una massa molecolare di circa 160 Kd. La sequenza aminoacidica dell'enzima presenta notevoli analogie con la citocromo P450-reduttasi; l'enzima contiene siti di legame per tetraidrobiopteridina, NADPH, FMN, FAD e, importante per la regolazione dell'attività enzimatica, per la calmodulina (vedi figura 26.3). Nelle cellule endoteliali l'attività enzimatica può essere misurata sia nel citosol che a livello delle membrane cellulari. Anche la forma neuronale della NO sintetasi è costitutiva ma differisce da quella endoteliale in quanto esclusivamente citosolica e per una maggiore sensibilità alla modulazione da parte della calmodulina rispetto alla NO sintetasi citosolubile endoteliale.

Il termine "costitutiva" è stato introdotto per differenziare l'attività enzimatica presente nelle cellule endoteliali e nervose da quella "inducibile" che compare nei macrofagi (e in altri tipi cellulari dotati di attività immunocompetente) a seguito di stimolazione con sostanze quali endotossine e citochine (interferoni, interleuchine, TNF, ecc.). La forma inducibile della NO sintetasi ha la caratteristica fondamentale di non essere modulata nella sua attività enzimatica dalla concentrazione intracellulare di calcio o di complesso calcio-calmodulina. Nelle cellule che l'esprimono, l'attività enzimatica totale dipende fondamentalmente dal numero di molecole di enzima che sono presenti. L'effetto di citochine ed endotossine è quindi quello di regolare l'espressione genica dell'enzima, inducendone la sintesi.

NITRODERIVATI

Sono farmaci che agiscono principalmente liberando NO

NO viene liberato attraverso la degradazione enzimatica (metabolismo) dei farmaci

Gli effetti dipendono dalla sede in cui i farmaci sono metabolizzati

Se i farmaci sono somministrati per via orale, passano subito al fegato che li degrada rapidamente e quasi completamente (effetto di primo passaggio)

Se somministrati per vie drenate da vasi che non confluiscono nel fegato (es. somministrazione sublinguale, somministrazione percutanea/cerotto) possono esplicare effetti che sono rilevanti soprattutto a livello vascolare (le cellule endoteliali sono ricche di enzimi che degradano/attivano i nitroderivati)

La quantità di enzimi che metabolizzano i nitroderivati è più abbondante nei grossi vasi venosi di capacitanza; quantità minori si hanno nelle arterie e ancor meno a livello degli sfinteri prearteriolarari (da cui dipendono le resistenze periferiche)

Effetti cardiovascolari dei Nitroderivati

Sequenze dose dipendenti:

Effetti Sistemici

1) Dilatazione grosse vene di capacitanza (riduzione precarico: maggiore attività di glutatione-reduttasi?): no riflessi compensatori (attenzione in pz con sindr Bradbury-Egglestone e Shy-Drager: aggrava angina da riduzione pressione di perfusione coronarica)

2) Ulteriore riduzione del precarico e riduzione resistenze periferiche: riduzione p.a. sistolica e diastolica e gettata cardiaca attiva riflessi compensatori

Effetti cardiovascolari dei Nitroderivati

Effetti su circolo coronarico

Effetti di coronarodilatazione non evidenti se non ad alte dosi (attenzione stealing): utile in coronarospasmo

Coronarodilatazione prevalente in vasi di grosso calibro: aumento perfusione

Ridistribuzione flusso che in angina è molto ridotto in territorio subendocardico (massima compressione)

Apertura collaterali?

Principi di Trattamento dell'Angina Pectoris

Prodotto triplo: pressione aortica x frequenza cardiaca x tempo di eiezione
Il superamento del proprio limite porta ad attacco

- 1) Riduzione del lavoro attraverso riduzione del rimo e/o della contrattilità

- 2) Riduzione della pressione ventricolare sinistra

- 3) Aumento della perfusione coronarica

- 4) Riduzione trombosi coronarica (A. instabile)

Problemi con terapia prolungata con nitroderivati

Tolleranza

Zero-hour effect: angina notturna in pz trattati con formulazioni a lento rilascio

rebound