

Vydáno v konečné redakční podobě jako:

*Nukleosidy Nukleotidy Nukleové kyseliny*. 2008 August ; 27(8): 967–978. doi:10.1080/15257770802257952.

## Inaktivace oxidu dusnatého kyselinou močovou

Christine Gersch<sup>1</sup>, Sergiu P. Paliu<sup>1</sup>, Kyung Mee Kim<sup>1</sup>, Alexander Angerhofer<sup>2</sup>, Richard J. Johnson<sup>1</sup> a George N. Henderson<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Oddělení nefrologie a hypertenze, Lékařská fakulta, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

<sup>2</sup>Oddělení chemie, College of Liberal Arts and Sciences, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

<sup>3</sup>Divize endokrinologie a metabolismu, Lékařská fakulta, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

<sup>4</sup>General Clinical Research Center, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

### Abstrakt

Identifikace oxidu dusnatého (NO) jako relaxačního faktoru odvozeného od endoteliálních buněk v roce 1980 vedla k bezprecedentnímu biomedicínskému výzkumu NO a stanovila NO jako jednu z nejdůležitějších regulačních molekul kardiovaskulárního, nervového a imunitního systému. Snížení hladin NO v endotelových buňkách vedoucí k "endotelové dysfunkci" bylo označeno za klíčovou patogenetickou událost předcházející rozvoji hypertenze, metabolického syndromu a kardiovaskulárních onemocnění. Snížení endoteliálního NO u kardiovaskulárních onemocnění se připisuje působení oxidantů, které buď přímo reagují s NO, nebo rozpojují jeho substrátový enzym. V této zprávě prokazujeme, že kyselina močová (UA), nejhojnější antioxidant v plazmě, přímo reaguje s NO v rychlé nevratné reakci, jejímž výsledkem je tvorba 6-aminouracilu a vyčerpání NO. Dále ukazujeme, že tato reakce probíhá přednostně s NO i v přítomnosti oxidantů peroxynitritu a peroxidu vodíku a že reakce je alespoň částečně blokována glutathionem. Tato studie ukazuje potenciální mechanismus, kterým UA může vyčerpat NO a způsobit endoteliální dysfunkci, zejména za podmínek oxidačního stresu, kdy je UA zvýšený a intracelulární glutathion je vyčerpáný.

### Klíčová slova

Kyselina močová; oxid dusnatý; kardiovaskulární onemocnění; endoteliální dysfunkce; 6-aminouracil; glutathion

### Úvod

Kyselina močová (UA) vzniká v savcích systémech jako konečný produkt metabolismu purinů. U většiny savců je UA dále rozkládána na allantoin pomocí enzymu urikázy; tento enzym však u hominoidů před pěti až patnácti miliony let zmutoval[1].[2] Tato ztráta aktivity urikázy má za následek nejen vyšší hladiny UA v plazmě, ale také omezuje naši schopnost regulovat UA, takže u člověka lze pozorovat velmi rozdílné hladiny. UA má vlastnosti zachraňující volné radikály[2,3] a je nejhojnějším antioxidantem v lidské plazmě[4-6].[7-10] Za podmínek oxidačního stresu může působit také jako prooxidant.[7-10] Je známo, že výrazně zvýšené hladiny UA (>6,2 mg/dl nebo >370  $\mu$ M) způsobují dnu a nefrolitiázu, ale důležitější je, že mají



jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění, zejména hypertenze, obezity/metabolického syndromu a onemocnění ledvin[11-15].

Nedávné experimentální a klinické studie spojují zvýšenou hladinu UA s endoteliální dysfunkcí a snížením hladiny oxidu dusnatého (NO). Experimentální studie uvádějí, že UA může snižovat hladinu NO v endoteliálních buňkách v kultuře,[16] blokovat acetylcholinem indukovanou vazodilataci aortálních kroužků[16] a snižovat množství cirkulujících nitritů u pokusných zvířat. U lidí byl zjištěn cirkadiánní rytmus, ve kterém jsou hladiny UA a oxidu dusnatého v nepřímé korelaci.[17] Chronická hyperurikémie je také spojena s endoteliální dysfunkcí[16] a bylo zjištěno, že snížení hladin UA pomocí inhibitorů xantinoxidázy výrazně zlepšuje funkci endotelu.[16] Inhibitory xantinoxidázy však také snižují tvorbu oxidantů, takže zlepšení endoteliální funkce by mohlo odrážet přímé snížení oxidantů spojených s xantinoxidázou na rozdíl od snížení kyseliny močové jako takové.

Ačkoli je význam endoteliální dysfunkce u kardiovaskulárních onemocnění dobře znám, většina důkazů naznačuje, že hlavní mechanismus, kterým k tomu dochází, je oxidační stres, při němž superoxid buď přímo inaktivuje NO (tvorbou peroxynitritu), odpojuje endoteliální NO syntázu, nebo pasivně zvyšuje inhibiční substrát (asymetrický dimethylarginin) inhibiční enzymu dimethylarginin dimethylaminohydrolázy.[18] V tomto ohledu bylo prokázáno, že UA pomáhá zachovat hladinu endoteliálního NO prostřednictvím své role antioxidantu, a to buď blokováním rozpojení endoteliální NO syntázy reakcí s peroxynitritem,[18] nebo zabráněním oxidanty indukované inaktivaci extracelulární superoxididismutázy.[19] Vzniká tedy paradox, neboť jak může UA, který je nejhodněji zastoupeným (asi šestkrát více než askorbát) antioxidantem v plazmě,[6] vyvolat in vivo endoteliální dysfunkci?

V této studii jsme zkoumali možnost, že UA může reagovat přímo se samotným NO. Na rozdíl od většiny volných radikálů má NO nízkou elektronovou afinitu, a proto v chemii NO s anionty nepřevládají reakce přenosu elektronů[20].

## Materiály a metody

### Příprava činidel

Všechny chemikálie a činidla, pokud není uvedeno jinak, byly získány od společnosti Sigma. 9- Kyselina methylurová a LiOH-1H<sub>2</sub> O byly zakoupeny od společnosti Fluka. Destilovaná, deionizovaná voda (bez kovových iontů) a EDTA (500 mM) byly zakoupeny od společnosti Gibco. Kyselina 1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-jírovcová (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-UA) byla zakoupena od společnosti Cambridge Isotopes. Peroxynitrit byl zakoupen od společnosti Cayman Chemical. Všechny experimenty byly prováděny ve stínu před světlem.

### Reakce UA, <sup>15</sup>N<sub>2</sub> -UA, urátu lithného nebo kyseliny 9-methylurové s NO [reakce 1]

UA, N<sup>15</sup><sub>2</sub> -UA, urát lithný nebo kyselina 9-methylurová [0,3 mM až 10 mM]] byl přidán do fosforečnanového pufru draselného (0,10 mM a 0,30 mM fosfát, pH 7,4 a 9,0) obsahujícího 0,1 mM EDTA (konečný objem 3,0 ml). Reakční směs byla 10 sekund vortexována a poté 1 minutu profukována argonem (TriGas). Po pročištění argonem byly reakční směsi umístěny na 15 minut na led. V typickém případě byly reakce prováděny ve třech opakováních probubláváním NO (Air Liquide, 99,998% čistota NO) po dobu 10, 30 nebo 90 sekund (průtok 2 ml/minutu) přes ledový roztok, po kterém následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Reakční směsi byly umístěny zpět na led a alikvoty každé reakční směsi byly přeneseny do LC- MS lahviček na led a byly uloženy při -80 °C, dokud nebylo možné provést LC-MS analýzu. Reakci 1 jsme také zkoumali při -20, 0, 25 a 60 °C. Reakce UA a N<sup>15</sup><sub>2</sub> -UA s NO byly provedeny jako dvojice identických reakcí, aby se usnadnila hmotnostně spektrometrická identifikace produktů.

### Reakce UA s NO v přítomnosti peroxynitritu nebo peroxidu vodíku [reakce 2 a 3]

UA (0,3 mM až 10 mM) byl přidán do draselného fosfátového pufru obsahujícího EDTA. Do ledové reakční směsi byl poté přidán jeden molární ekvivalent peroxynitritu nebo peroxidu vodíku. Reakční směs se 10 sekund vortexovala, poté se dala na led a 1 minutu se pročistila argonem. Reakce UA s NO se prováděly probubláváním ledově studených směsí s NO po dobu 10, 30 nebo 90 sekund (2 ml/minutu). Reakční směsi se nechaly inkubovat při pokojové teplotě po dobu 3 minut a poté byly opět umístěny na led. Alikvoty každé reakční směsi byly přeneseny do lahvíček pro LC-MS analýzu.

### Reakce UA s NO za přítomnosti antioxidantů [reakce 4-8]

UA byla přidána do fosforečnanovodíkového pufru obsahujícího EDTA za stejných podmínek, jak je uvedeno výše. K reakčním směsím byl poté přidán jeden molární ekvivalent antioxidantu [askorbátu (ASC), tetrahydrobiopterinu (BH<sub>4</sub>), glutathionu (GSH), cysteinu (CYS) nebo tyrosinu (TYR)] a po dobu 10 sekund se vortexovalo. Reakce byly pročištěny argonem, umístěny na led a poté reagovaly s NO, jak je popsáno výše. Pro stanovení ochrany UA různými antioxidanty bylo použito 30 sekund probublávání a zbývající UA byl kvantifikován pomocí LC-MS v režimu SRM.

### Reakce UA s NO v lidské plazmě a v lyzátech endoteliálních buněk aorty (HAEC) [reakce 9 a 10]

Reakce NO s N<sup>15</sup><sub>2</sub>-UA lidskou plazmou nebo buněčnými lyzáty byly prováděny podobným způsobem jako reakce popsané výše s následujícími výjimkami: <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-UA (0,3-10 mM) byl přidán ke směsi lidské plazmy nebo lyzátu HAEC v PBS (objemový poměr 1:3). K této směsi byla přidána EDTA (konečná koncentrace 0,10 mM). Při typické reakci byly tyto směsi následně pročištěny argonem a probublávány NO, jak je uvedeno výše, po dobu 90 sekund (zkoušeno při dobách probublávání 30, 60, 90, 180 a 360 sekund). Reakční směs byla před analýzou LC-MS deproteinizována 3 ml 10% kyseliny trichloroctové. Všechny ostatní reakční podmínky byly stejné jako výše uvedené.

### Analýzy reakčních směsí

Reakční směsi byly analyzovány pomocí LC-MS v režimech fullscan (pozitivní i negativní), MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie) a SRM (monitorování jedné reakce) za použití metody APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku). Kromě toho byly některé vzorky dále analyzovány také pomocí metody ESI (ionizace elektrosprejem). Koncentrace UA byly stanoveny v režimu SRM pomocí metody APCI v negativním režimu (sledované reakce pro UA byly m/z 166,9→95,9 při 25 V a 166,9→123,9 při 25 V a pro N<sup>15</sup><sub>2</sub>-UA byly m/z 168,9→96,9 při 25 V a 168,9→124,9 při 25 V). 6-AU, alantoin a triuret byly kvantifikovány v pozitivním režimu APCI pomocí příslušných iontů SRM. LC-MS/MS analýzy reakčních směsí byly provedeny pomocí LC systému Agilent 1100 a hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem ThermoFinnigan TSQ 7000 vybaveného rozhraním APCI pracujícím v režimu pozitivních iontů. LC analýzy byly prováděny v režimu gradientové eluce s použitím kolony Phenomenex Luna 5μ C18 100A (150 mm × 4,6 mm). Použitá mobilní fáze zahrnovala gradient octan amonný/kyselina octová a methanol nebo gradient kyselina mravenčí/methanol. Mobilní fáze průtok byl 0,6 ml min<sup>-1</sup> a injekční objem 20 μl.

### Výsledky a diskuse

Zkoumali jsme přímou reakci NO (ve formě plynného NO [21,22]) s UA a značenou kyselinou 1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-močovou (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-UA) za anaerobních podmínek v několika různých médiích, včetně lidské plazmy a lyzátů endoteliálních buněk, které napodobují fyziologické prostředí. Na

anaerobní podmínky byly zvoleny tak, aby bylo zajištěno, že studujeme přímé reakce NO s UA a nikoli reakce dále oxidovaného N O<sub>23</sub> nebo NO<sub>2</sub> (kyslík snadno oxiduje NO[23]). pH (7,4 a 9,0) ani koncentrace pufru (0,10 a 0,30 mM), neměly vliv na produkt reakce. Jako pufr se obvykle používal fosforečnan draselný s koncentrací UA v rozmezí od 0,3 mM (fyziologická úroveň[6]) do 10 mM. Ve zkoumaném rozsahu neměla koncentrace UA žádný vliv na vznikající produkty. Reakční schéma studie je znázorněno na obrázku 1. Reakce byly prováděny ve vodném pufru (reakce 1); ve vodném pufru v přítomnosti oxidantu (peroxynitritu a H O<sub>22</sub> ) (reakce 2 a 3); ve vodném pufru v přítomnosti vybraných biologicky významných antioxidantů (ASC, GSH, CYS, TYR a BH<sub>4</sub> ) (reakce 4 až 8); a v lidské plazmě (reakce 9) nebo lyzátech lidských aortálních endoteliálních buněk (HAEC) (reakce 10). Rovněž reakce mezi urátem lithným (lépe rozpustným při fyziologickém pH) a NO a reakce mezi kyselinou 9-methylurovou a NO byla studována v médiích popsanych v reakcích 1 až 3. Poměry UA k peroxynitritu nebo k peroxidu vodíku (reakce 2 a 3) a UA:antioxidant (reakce 4 až 8) byly použity v molárních poměrech 1:1. V reakcích 4 až 8 byly použity reakce mezi urátem lithným a NO. V typickém případě byly reakce prováděny ve třech opakovaných probubláváních NO po dobu 10, 30 nebo 90 sekund (průtok 2 ml/minutu) ledovým roztokem (chlad zvyšuje rozpustnost NO ve vodě a snižuje množství, které uniká během probublávání), po kterém následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 3 min. Reakci 1 jsme zkoumali také při teplotách -20, 0, 25 a 60 °C a při různých teplotách vznikal stejný produkt. Optimální doba probublávání NO reakčním médiem byla stanovena na 30 sekund (90 sekund pro plazmu a buněčné lyzáty), kdy reakce UA probíhá do konce, což se projeví vymizením píku UA v LC/MS analýze.

Podrobné zkoumání produktů vznikajících reakcí UA s NO pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) ukázalo, že dominantní koncový produkt má molekulovou hmotnost 127 u a chromatografický retenční čas přibližně 6 minut (obr. 2A). V režimu pozitivních iontů byl převažujícím iontem signál protonovaného produktu (ion [127 + H]<sup>+</sup>) s *m/z* 128 (obrázek 2B). Reakční produkt ponechaný v reakční směsi byl stabilní nejméně po dobu jednoho měsíce při okolní teplotě. Když se reakce (krátkodobé probublávání NO), které obsahovaly nezreagovaný UA, nechaly stát při teplotě okolí, nedošlo k žádné další reakci, což naznačuje, že NO byl v reakci zcela spotřebován a že žádný další NO nebyl k dispozici z média nebo z další reakce reakčních produktů (například z reakcí, v nichž NO působil jako katalyzátor).

Značený<sup>15</sup> N<sub>2</sub>-UA reagoval s NO a vytvořil produkt s molekulovou hmotností 129 u (ion [129 + H]<sup>+</sup> s *m/z* 130) (obr. 2C a 2D). Tento výsledek jasně naznačuje, že detekovaný konečný produkt inkorporoval oba<sup>15</sup> atomy N ze šestičlenného kruhu purinového skeletu UA. Zkoumání experimentálních dat a dat z molekulárních modelů umožnilo určit molekulový vzorec jako C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub> pro sloučeninu s hmotností 127 u (nebo C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 15N<sub>2</sub> pro sloučeninu s hmotností 129 u) a strukturu sloučeniny jako aminouracil. Aminouracil má dva polohové isomery: 5-aminouracil (5-AU) a 6-aminouracil (6-AU). Pro jednoznačné rozlišení jednoho izomeru od druhého byly komerčně dostupné vzorky obou izomerů podrobeny tandemové hmotnostní spektrometrii za podmínek disociace vyvolané srážkou (CID) při srážkových energiích v rozmezí 15 až 40 eV. Bylo zjištěno, že fragmentační vzorce aminouracilů jsou specifické pro jednotlivé izomery. V hmotnostních spektrech obou aminouracilů byl společný pouze jeden fragmentový ion s *m/z* 111. Ostatní detekované fragmentové ionty byly pro oba isomery odlišné, a lze je tedy považovat za diagnostické ionty pro rozpoznání isomerů. Hlavní fragmentační vzorce protonovaného 5-AU jsou následující: [127 + H]<sup>+</sup> (*m/z* 128) → [128-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (*m/z* 111) → [111-CO]<sup>+</sup> (*m/z* 83) → [83-CO]<sup>+</sup> (*m/z* 55). Hlavní fragmentační vzorce protonovaného 6-AU jsou uvedeny na obrázku 3.

Bylo zjištěno, že MS/MS data získaná analýzami konečných produktů reakcí UA s NO (reakce 1 až 10) jsou shodná s daty zaznamenanými pro standardní 6-AU (obr. 3). Kromě toho je fragmentace generovaná z produktu reakce 1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-UA s NO dokonale popsána stejným schématem (obrázek 3). Předložené údaje tedy potvrzují, že UA může přímo reagovat s NO za vzniku 6-AU. Reakce (reakce 1 až 3) NO s kyselinou 9-methylurovou vedly ke vzniku N-methylaminouracilu s molekulovou hmotností 141 u, což dokazuje, že v konečném produktu zůstal zachován fragment N9-Me. To potvrzuje, že atom dusíku-9 (obrázek 1) v purinovém skeletu UA se stává dusíkem aminoskupiny v 6-AU.

Reakce UA s NO v přítomnosti peroxynitritu nebo peroxidu vodíku rovněž vytvářely 6-AU rychlou selektivní reakcí, při níž UA přednostně reagoval s NO před oxidanty již v roztoku. Za popsanych reakčních podmínek se urát Li choval podobně jako UA.

Reakce NO s N<sup>15</sup><sub>2</sub>-UA v lidské plazmě a lyzátech endoteliálních buněk (HAEC) produkovaly pouze značený 6-AU. Obrázek 4 znázorňuje identifikaci značeného 6-AU z reakcí N<sup>15</sup><sub>2</sub>-UA s NO v plazmě. Tvorba 6-AU v lidské plazmě (představující extracelulární kompartment) i v lidských buněčných lyzátech (představujících intracelulární kompartment) podtrhuje biologický význam této reakce a měření 6-AU v lidských biologických vzorcích poskytuje možnost stanovit rozsah přímé reakce NO s UA v těchto biologických systémech.

Předběžné studie in vivo byly provedeny také na potkanech, kterým byla podána infuze N<sup>15</sup><sub>2</sub>-UA, a také analýzou vzorků moči pacientů s hypertenzí a preeklampií na přítomnost UA a jeho metabolitů. Tyto studie naznačily tvorbu 6-AU in vivo. Ačkoli jsme to dosud nezjistili, je možné, že meziproducty z reakce UA s NO in vivo mohou být odkloněny na jiné produkty nebo že 6-AU je dále metabolizován. To nic nemění na důležité skutečnosti, že NO může být rychle vyčerpán přímou reakcí s UA. Probíhají další studie k charakterizaci těchto potenciálních cest. Kontrolní studie reakcí NO s metabolity UA alantoinem a triuretem ukázaly, že ani alantoin, ani triuret nereagovaly s NO za vzniku 6-AU.

Zkoumali jsme také reakce UA (a Li urátu) s NO (30sekundové bublání NO) v přítomnosti následujících antioxidantů: ASC, BH<sub>4</sub>, GSH, CYS a TYR (molární poměr UA k antioxidantu a NO 1:1:1). Koncentrace zbývajících UA byly stanoveny pomocí LC-MS jako míra ochrany UA daným antioxidantem. Z testovaných antioxidantů poskytuje nejlepší ochranu UA před reakcí s NO jeden ekvivalent GSH. Za podmínek nízkého oxidačního stresu a vysoké dostupnosti GSH je tedy možné, že GSH částečně blokuje reakci UA-NO. Naopak za podmínek oxidačního stresu by přímá reakce NO s UA mohla být významným zdrojem vyčerpání NO a endoteliální dysfunkce.

Zatímco tato práce probíhala (reakci NO s UA jsme objevili v červenci 2005; viz obrázek 5), Suzuki[24] oznámil vznik nitrosovaného UA reakcí UA s NO. Suzukiho studie byly provedeny za aerobních podmínek a za těchto podmínek se předpokládá, že hlavní nitrosující formou je N O<sub>23</sub> a nikoli NO[21]. Naše studie (kromě studií in vivo) jsme prováděli za anaerobních podmínek, abychom zajistili, že studujeme přímé reakce NO s UA. LC-MS analýzy našich reakčních produktů se zdroji APCI a ESI v pozitivním a negativním módu neodhalily přítomnost nitrosovaného UA. Je možné, že sloučenina, kterou uvádí Suzuki[24], je labilním meziproductem (autor uvádí poločas rozpadu 2,2 minuty ve fosfátovém pufru) reakce N O<sub>23</sub> (nebo jiné oxidované formy NO

jako je NO<sub>2</sub>), a nikoli reakce NO s UA. Naproti tomu jsme identifikovali stabilní 6-aminouracil z reakce NO s UA.

Klinický význam zjištění, že kyselina močová může reagovat s oxidem dusnatým za vzniku 6-aminouracilu, není dosud stanoven. Mohl by však poskytnout mechanismus, jak může kyselina močová inhibovat funkci endotelu za podmínek oxidačního stresu, kdy je intracelulární glutathion vyčerpán. Může také poskytnout logické vysvětlení, proč UA může fungovat jako antioxidant, který blokuje účinky exogenního peroxynitritu na odpojení endoteliální NO syntázy[18], avšak v přítomnosti vysokých koncentrací UA podporuje snížení intracelulární hladiny NO.[16] To také poskytuje vysvětlení, proč infuze UA zdravým jedincům (pravděpodobně s dobrými intracelulárními zásobami glutathionu) nezpůsobují akutní endoteliální dysfunkci[25]. konečně by to mohlo vysvětlit nedávnou zprávu[26], že alopurinol zlepšuje endoteliální funkci spíše blokováním oxidačního stresu než snížením sérových koncentrací UA. V tomto případě by blokováním oxidačního stresu mohl alopurinol obnovovat intracelulární zásoby glutathionu zpět na zdravou úroveň. Tato zvýšená koncentrace intracelulárního glutathionu by snížila vymývání NO UA nezávisle na sérových koncentracích UA. Je důležité si uvědomit, že UA může mít i jiné mechanismy, kterými se podílí na indukcii endoteliální dysfunkce. Nicméně vzhledem k přednostnímu vymývání NO UA, a to i v přítomnosti peroxynitritu, by tato cesta mohla být potenciálně významná. Stabilní koncový produkt, 6-AU, může sloužit jako marker pro detekci přímé reakce NO s UA in vivo a jeho podílu na endoteliální dysfunkci za podmínek oxidačního stresu. Je zřejmé, že je zapotřebí dalších studií, které by se zabývaly významem této reakce za patofyziologických podmínek.

## Poděkování

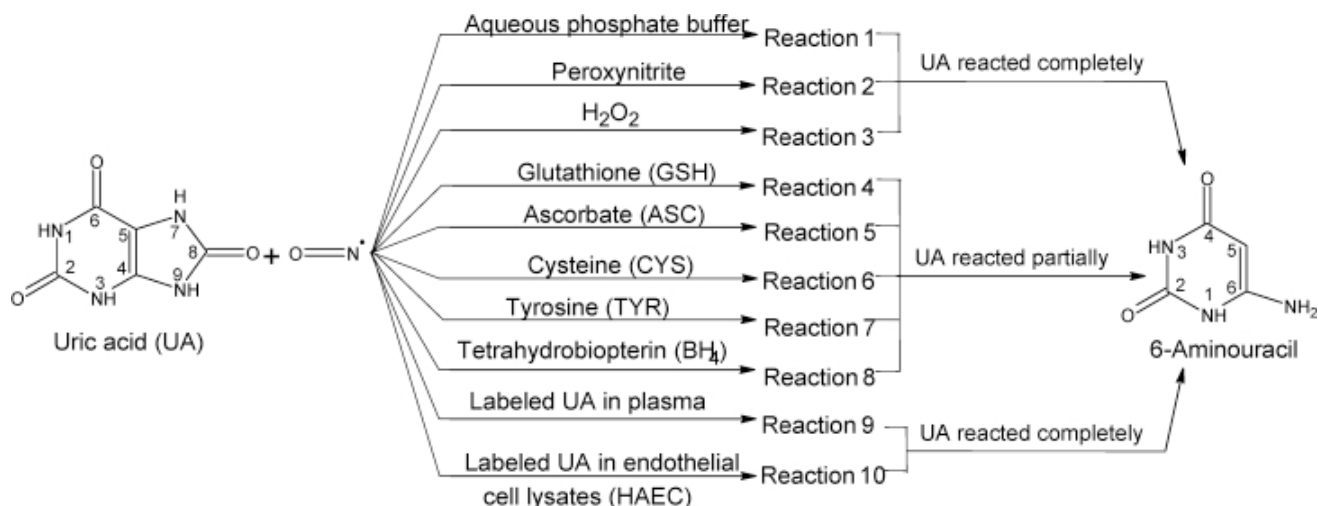
Tato práce byla podpořena společností Gatorade a granty NIH DK-52121, HL-68607 a MO1-RR00082.

## Odkazy

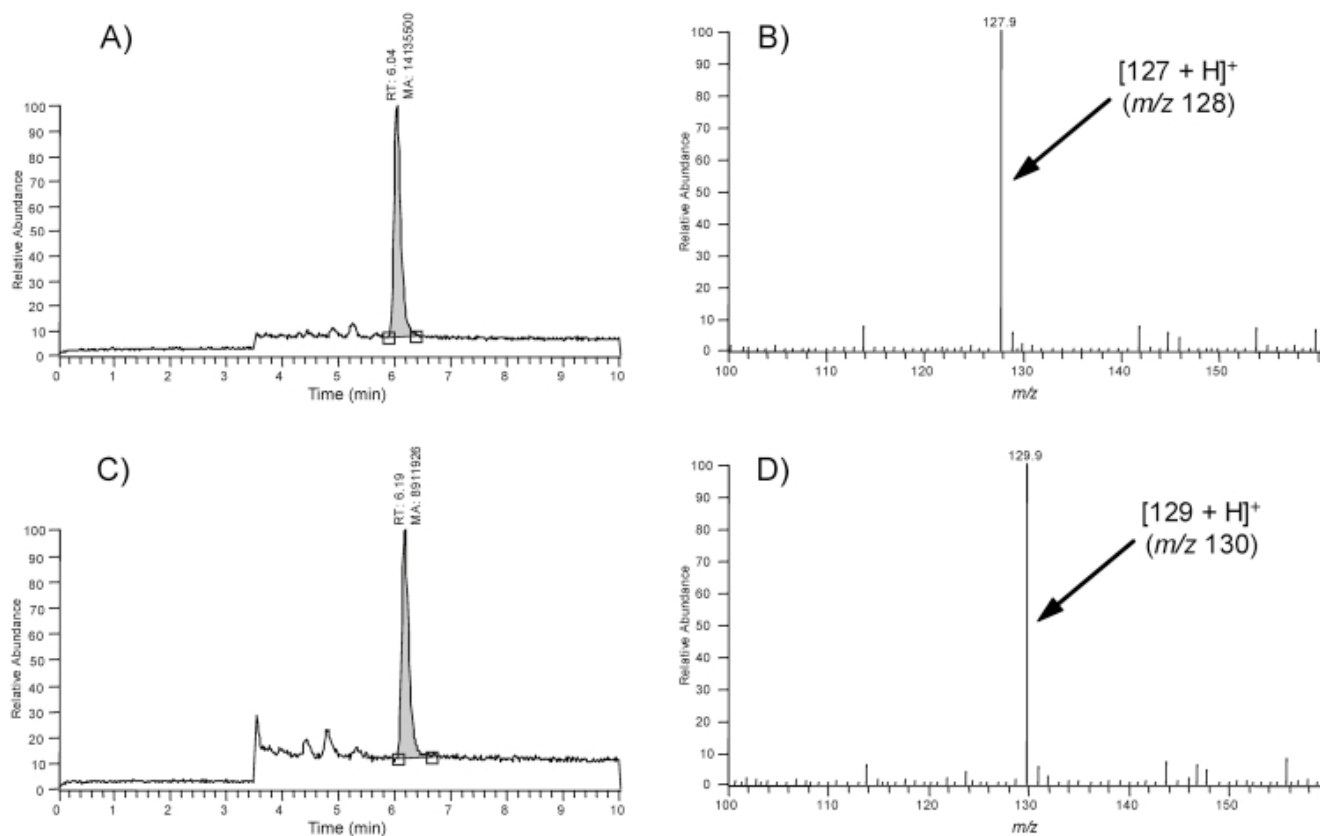
1. Wu X, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT. Dvě na sobě nezávislé mutační události při ztrátě urátových oxidů během evoluce hominoidů. *J Mol Evol* 1992;34:78-84. [PubMed: 1556746]
2. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DF, Dikalov S. Interakce peroxynitritu s kyselinou močovou v přítomnosti askorbátu a thiolů: důsledky pro odpojení endoteliální syntázy oxidu dusnatého. *Biochem Pharmacol* 2005;70:343-354. [PubMed: 15963955]
3. Robinson KM, Morre JT, Beckman JS. Triuret: nový produkt peroxynitritem zprostředkované oxidace urátu. *Arch Biochem Biophys* 2004;423:213-217.
4. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Kyselina močová poskytuje lidem antioxidační ochranu proti stárnutí a rakovině způsobené oxidanty a radikály: hypotéza. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6853-6862.
5. Kand'ar P, Zakova P, Muzakova V. Sledování antioxidačních vlastností kyseliny močové u lidí u lidí u lidí za úvahu za úvahu za úvahu měření měření měření hladin allantoinu v plazmě kapalinovou chromatografií. *Clin Chim Acta* 2006;365:249-256. [PubMed: 16194528]
6. Hediger MA. Funkce ledvin: Brána k dlouhému životu? *Nature* 2002;417:393-395. [PubMed: 12024201]
7. Bagnati M, Perugini C, Cau C, Bordone R, Albano E, Bellomo G. Kdy a proč se antioxidant rozpustný ve vodě stává prooxidantem během oxidace lipoproteinů o nízké hustotě vyvolané mědí: Studie využívající kyselinu močovou. *Biochem J* 1999;340:143-152. [PubMed: 10229669]
8. Sanguinetti SM, Batthyany C, Trostchansky A, Botti H, Lopez GI, Wikinski RLW, Rubbo H, Schreier LE. Oxid dusnatý inhibuje prooxidační působení kyseliny močové během oxidace LDL zprostředkované mědí. *Arch Biochem Biophys* 2004;423:302-308. [PubMed: 15001394]
9. Kittridge KJ, Willson RL. Kyselina močová podstatně zvyšuje volnými radikály indukovanou inaktivaci alkoholdehydrogenázy. *FEBS Lett* 1984;170:162-164. [PubMed: 6373370]

10. Aruoma OI, Halliwell B. Inaktivace alfa-antiproteinázy hydroxylovými radikály. Vliv kyseliny močové. *FEBS Lett* 1989;244:76-80. [PubMed: 2538353]
11. Johnson RJ, Feig DI, Kang DH, Herrera-Acosta J. Resurrection of uric acid as a causal risk factor in essential hypertension. *Hypertension* 2005;45:18-20. [PubMed: 15557387]
12. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Ahort RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. Kyselina močová jako příčinný faktor metabolického syndromu vyvolaného fruktózou. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F625-F631. [PubMed: 16234313]
13. Masuo K, Kawaguchi H, Mikani H, Ogihara T, Tuck ML. Sérové koncentrace kyseliny močové a plazmatického norepinefrinu předpovídají následný přírůstek hmotnosti a zvýšení krevního tlaku. *Hypertenze* 2003;42:474-480. [PubMed: 12953019]
14. Iseki K, Oshiro S, Tozawa M, Iseki C, Ikemiya Y, Takishita S. Význam hyperurikémie pro časnou detekci selhání ledvin u vyšetřované skupiny osob. *Hypertension Res* 2001;24:691-697.
15. Tomita M, Mizuno S, Yamanaka H, Hosoda Y, Sakuma K, Matuoka Y, Odaka M, Yamaguchi M, Yosida H, Morisawa H, Murayama T. Does hyperuricemia affect mortality? Prospektivní kohortová studie japonských pracovníků mužského pohlaví. *J Epidemiol* 2000;10:403-409. [PubMed: 11210110]
16. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, Krotova K, Block ER, Prabhakar S, Johnson RJ. Hyperurikémie indukuje endoteliální dysfunkci. *Kidney Int* 2005;67:1739-1742. [PubMed: 15840020]
17. Kanabrocki EL, Sothorn RB, Messmore HL, Roitman-Johnson B, McCormick JB, Dawson S, Brenner FW, Third JL, Nemchausky BA, Shirazi P, Scheving LE. Cirkadiální vztah kyseliny močové a oxidu dusnatého v séru. *J Am Med Assoc* 2000;283:2240-2241.
18. Forstermann U. Úloha endoteliální NO syntázy v cévním onemocnění: Odpojení redukce kyslíku od syntézy NO a jeho farmakologický zvrát. *Biol Chem* 2006;387:1521- 1533. [PubMed: 17132097]
19. Goldstone AB, Liochev SI, Fridovich I. Inactivation of copper, zinc superoxide dismutase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Mechanismus ochrany. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1860-1863. [PubMed: 17157188]
20. Chacko SA, Wenthold PG. The negative ion chemistry of nitric oxide in gas phase. *Mass Spectrom Rev* 2006;25:112-116. [PubMed: 16138298]
21. Kharitonov VG, Sundquist AR, Sharma VS. Kinetika nitrosace thiolů oxidem dusnatým v přítomnosti kyslíku. *J Biol Chem* 1995;270:28158-28164. [PubMed: 7499306]
22. Patel JM, Zhang J, Block ER. Oxidem dusnatým indukovaná inhibice syntázy oxidu dusnatého plicních endoteliálních buněk prostřednictvím interakce s alosterickými thioley: Úloha thioredoxinu v regulaci katalytické aktivity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:410-419. [PubMed: 8810647]
23. Hoehn T, Gratopp A, Raehse K, Koehne P. Účinky hyperoxie a oxidu dusnatého na endogenní produkci oxidu dusnatého v polymorfonukleárních leukocytech. *Neonatology* 2005;94:132-137. [PubMed: 18332642]
24. Suzuki T. Nitrosace kyseliny močové vyvolaná oxidem dusnatým za aerobních podmínek. *Nitric Oxide* 2007;16:266-273. [PubMed: 17166753]
25. Waring WS, Adwani SH, Breukels O, Webb DJ, Maxwell SR. Hyperurikémie nezhoršuje kardiovaskulární funkce u zdravých dospělých. *Heart* 2004;90:155-159. [PubMed: 14729785]
26. George J, Carr E, Davies J, Belch JJ, Struthers A. Vysoké dávky alopurinolu zlepšují funkci endotelu hlubokým snížením vaskulárního oxidačního stresu, nikoliv snížením kyseliny močové. *Circulation* 2006;114:2508–2516. [PubMed: 17130343]



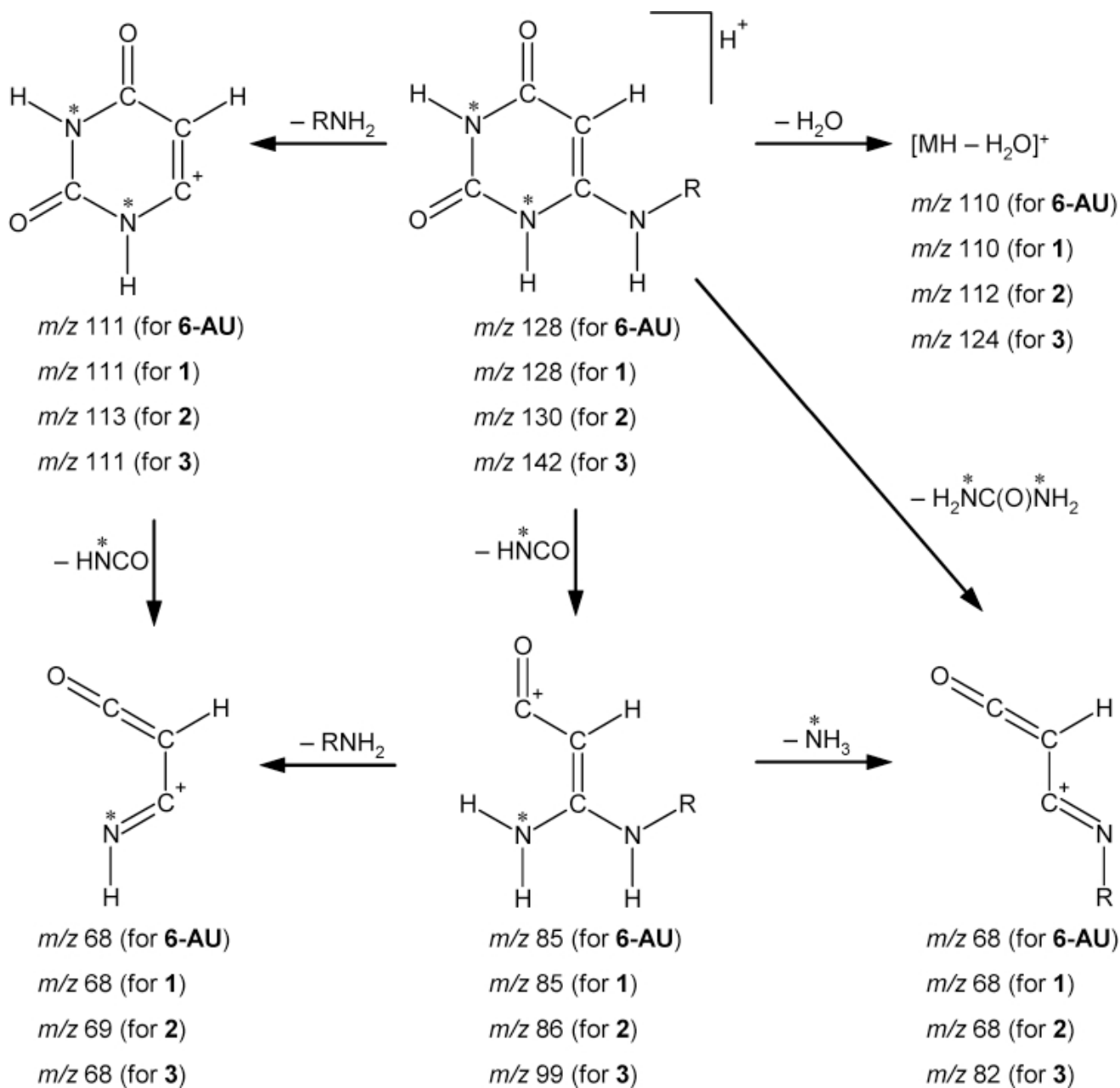
**OBRÁZEK 1.**

Shrnutí reakce NO s kyselinou močovou (UA) a značenou UA. Reakce 1 až 8 byly provedeny jako dvojice se značenou a neznačenou kyselinou močovou, aby se usnadnila hmotnostně spektrometrická analýza a identifikace produktů. Byl také zkoumán vliv několika pH (7,4 a 9,0) a teplot (-20, 0, 25 a 60 °C), které neměly vliv na tvorbu 6-aminouracilu jako produktu. Reakce 1 až 3 byly rovněž provedeny s kyselinou 9-methylurovou. Kromě toho byly reakce 1 až 8 provedeny také s rozpustnějším urátem lithným (pouze fyziologické pH). Kvantifikace byla provedena pomocí LC-MS/MS. Ve všech uváděných experimentech bylo optimalizováno probublávání NO (z předběžných studií) pro dokončení reakce UA. Proto se v dané reakci spotřebuje 100 % nebo velmi blízko 100 % UA. Optimální doba probublávání NO reakčním médiem byla stanovena na 30 sekund (90 sekund pro plazmu a buněčné lysáty), kdy reakce UA probíhá až do konce, což se projeví vymizením píku UA v LC/MS analýze. Výjimkou z optimalizace doby probublávání byly případy, kdy byly použity antioxidanty, v tomto případě byla použita 30sekundová doba probublávání bez ohledu na rozsah reakce.

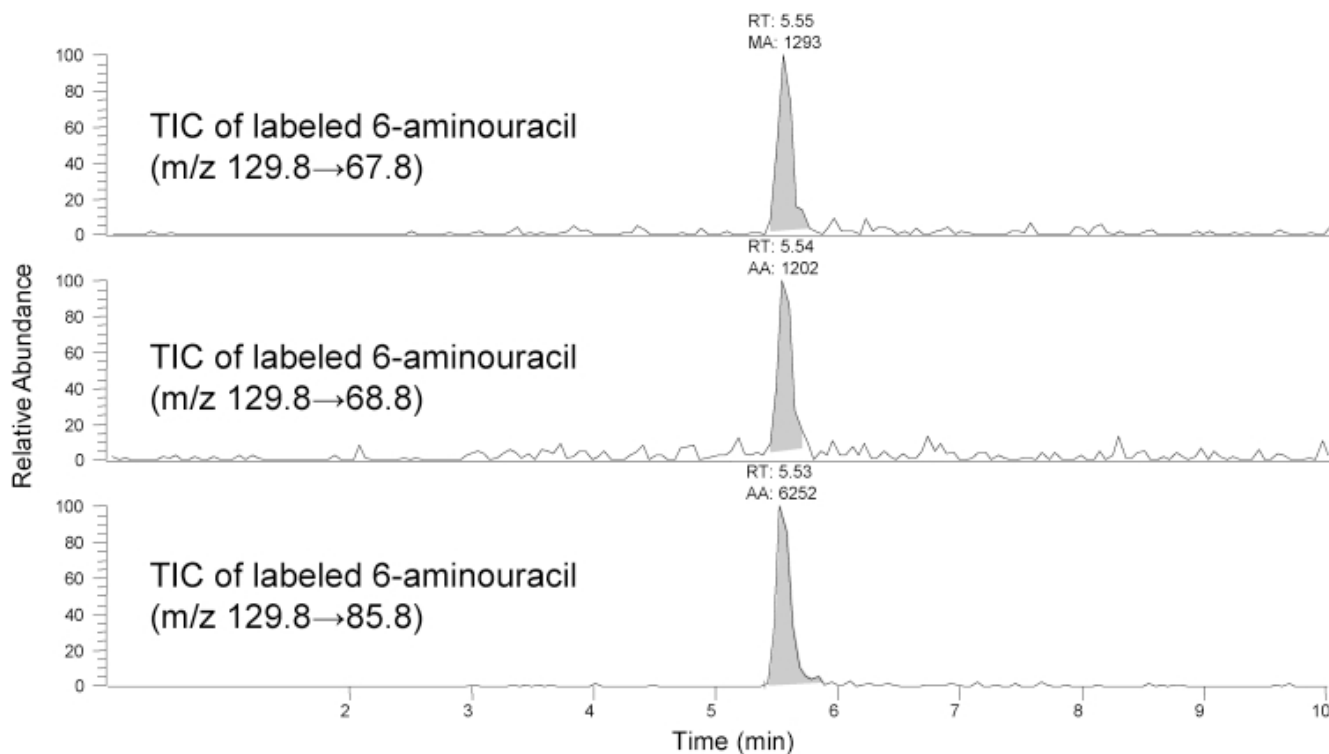
**OBRÁZEK 2.**

LC-MS analýzy produktů reakce UA (panely A a B) a značeného UA ( $N^{15}_2$ -UA; panely C a D). Panely A a C ukazují LC-MS stopu (celkový proud iontů) a panely B a D zobrazují odpovídající hmotnostní spektra. Pík při 6,04 min v panelech A a B je totožný s komerčně dostupným 6-aminouracilem. Tvorba M+1 z 130

z  $^{15}N_2$ -UA, jasně naznačuje, že detekovaný konečný produkt obsahoval jak značený  $^{15}N$  atomy ze šestičlenného kruhu purinového skeletu UA.

**OBRÁZEK 3.**

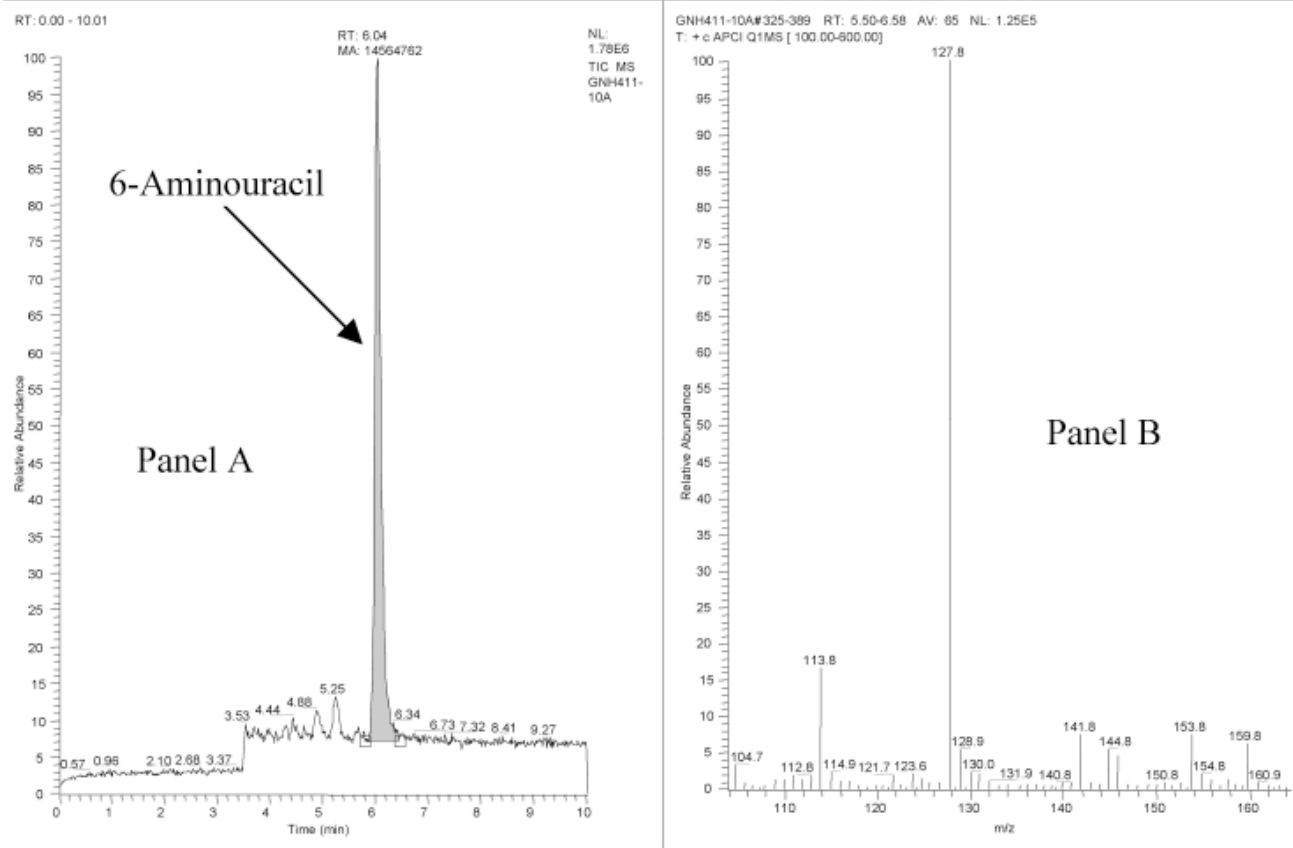
Hlavní fragmentační vzorce protonovaných 6-aminouracilů za podmínek CID. (Poznámky: **6-AU** představuje standardní 6-aminouracil; **1** představuje sloučeninu vyrobenou z UA; **2** vyrobenou ze značeného 1,3- $^{15}\text{N}_2$ -UA; **3** vyrobenou z kyseliny 9-methylurové; hvězdička představuje atom  $^{15}\text{N}$  (pro značenou sloučeninu **2**); R = H pro **6-AU**, **1** a **2**; a R =  $\text{CH}_3$  pro sloučeninu **3**.)

**OBRÁZEK 4.**

LC-MS/MS identifikace  $^{15}\text{N}$  značeného 6-aminouracilu (6-AU) (retenční čas = 5,55 minuty) z plazmatických reakcí  $\text{N}^{15}_2$ -UA s NO. Na třech panelech jsou zobrazeny celkové iontové chromatogramy (TIC) tří specifických SRM značeného 6-AU. Přítomnost všech tří značených SRM v produktu plazmatické reakce potvrzuje tvorbu značeného 6-AU z  $\text{N}^{15}_2$ -UA a NO.

GNH411-10A

7/23/2005 12:30:09 PM

**OBRÁZEK 5.**

LC-MS analýza produktů reakce kyseliny močové (panely A a B) s NO. Obrázek obsahuje originální razítko s datem analýzy na podporu tvrzení o objevu. Panel A ukazuje LC-MS stopu (celkový proud iontů) a panel B ukazuje odpovídající hmotnostní spektra ( $M+1$  iont = 128). Pík v 6,04 minutě v panelu A je totožný s komerčně dostupným 6-aminouracilem. Kromě toho byly ve stopě LC-MS přítomny dva malé neidentifikované píky (při 4,88 a 5,25 minutě).