Korean Journal of Microbiology (2014) Vol. 50, No. 2, pp. 87-94
DOI http://dx.doi.org/10.7845/kjm.2014.4029
Copyright ⓒ 2014, The Microbiological Society of Korea

산화질소가 미생물에 미치는 영향 및 이를 이용한 항균전략

최은영† · 노진기† · 핫산눌하스니 · 유진욱*
부산대학교 약학대학

Antimicrobial Mechanisms of Nitric Oxide and Strategies for Developing Nitric Oxide-based Antimicrobial Agents

Eun Young Choi†, Jin-Ki Noh†, Nurhasni Hasan, and Jin-Wook Yoo*
College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea

(Received May 7, 2014 / Accepted June 14, 2014)

Nitric oxide (NO), which has been recognized as an integral molecule in maintaining homeostasis, plays an important role in host defense against microbes. NO has diverse antimicrobial mechanisms by directly and/or indirectly interacting with microbes. Under the circumstance that there is an urgent need for a new class of antimicrobial agents due to antibiotic resistance, much effort has been made to develop a NO-based antimicrobial agent. In order to make it possible, strategies to store and release NO in a controlled manner are required because NO has a gaseous property and a very short half-life. In this review, we described NO biochemistry and its mechanisms of antimicrobial activity. In additions, we introduced various NO-releasing systems that improve NO's antimicrobial activity.

***Keywords*:** antimicrobial activity, nitric oxide (NO), NO-releasing systems

항균물질의 발견과 이에 따른 항생제의 개발은 인류의 수명 연장과 현대의학을 발전시키는데 현격한 공헌을 하였다. 특히 1960년대까지 약 13-14개의 새로운 계열의 항생제를 포함한 많은 항생제들이 개발되었고, 여러 감염질환에 대응하는 항생제들을 이용해 효과적인 감염치료가 이루어질 수 있었다. 하지만 1970년 이후 FDA 승인을 받은 대부분의 항생제는 기존계열 항생제를 단순히 변화시킨 약물들이고 새로운 계열의 항생제 수는 5개로 급감했다(Spellberg *et al.*, 2004). 항생제에 대한 내성이 보통 2년 이내에 생기는 것을 고려할 때(Coates *et al.*, 2011), 새로운 계열의 항생제 개발 저하는 최근 심각한 사회적 문제가 되고 있는 항생제 내성균 감염의 치료에 선택할 수 있는 항생제 수가 줄어들고 있다는 것을 의미한다(Falagas and Bliziotis, 2007; Outterson *et al.*, 2007). 이에 따라 항생제의 내성을 제어하는 방법과 더불어 내성문제를 회피 할 수 있는 새로운 항균 기전을 가진 항생제 개발이 시급히 요구되고 있다.

산화질소(nitric oxide, NO)는 인체 내의 혈압조절, 신경전달, 그리고 면역과정의 항상성유지에 매우 중요한 역할을 한다. 특히 NO는 미생물 감염을 막는 인체 방어기전에 필수적인 내인성 물질로 알려져 있다(Bogdan, 2001). 저농도의 NO는 면역세포의 성장과 활성을 촉진하는 신호전달 물질로 작용하는 반면, 고농도의 NO는 호중구의 호흡폭발(respiratory burst)와 같은 상황에서 DNA, 단백질 및 지질과의 공유결합을 통하여 대상 병원균의 성장을 억제하거나 사멸한다. 최근 NO는 뛰어난 항균작용과 더불어 내성에 매우 강한 것으로 알려지면서 새로운 계열의 항균제로의 개발 가능성이 대두되고 있다.

하지만 NO는 약 3-4초의 짧은 반감기를 가진 기체분자로 순수한 NO 자체를 이용해 의약품으로 개발하기는 매우 어렵다. 이에 따라 NO 가스를 효율적으로 방출하는 시스템에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 방출시스템을 통해 불안정한 기체분자인 NO의 저장뿐만 아니라 감염부위에서의 농도 유지가 가능하게 되어 이들을 이용한 새로운 항균전략들이 큰 관심을 받고 있다.

본 총설에서는 항균작용에 관련된 NO의 합성 및 생화학적인 특징을 알아보고 지금까지 밝혀진 NO의 항균작용 기전에 대하여 정리하였다. 또한 최근 연구되고 있는 NO 방출시스템과 이들의 감염치료 효과를 소개하고 새로운 항균제로서의 NO의 잠재성에 대해 고찰하고자 하였다.

본 론

NO의 발견

NO는 이원자 자유라디칼로 산업 공정 및 자동차 배기가스 등에서 생성되는 대기 오염 물질로 처음 알려졌으나, 1987년 말 포

†These authors contributed equally to this work.
*For correspondence. E-mail: jinwook@pusan.ac.kr; Tel.: +82-51-510-2807

유동물 세포에서의 체내 합성이 밝혀져 NO가 생리학적 효과를 가지는 것으로 알려지게 된다(Ignarro *et al.*, 1987). 그 이후 생체 내에서 NO의 생성 및 작용 기전을 해명하기 위해 많은 연구가 이루어지게 된다. 특히 1998년 NO의 발견과 생리적 기능을 밝힌 공로로 노벨 생리학상이 수여되고, 이를 계기로 NO에 대한 의료 및 과학적인 관심이 기하급수적으로 증가하였다(Dusse *et al.*, 2003; Scatena *et al.*, 2010). 최근 NO의 다양한 생리학적 영향이 기존에 알려진 것보다 더 광범위 하다는 것이 밝혀졌다(Friedman and Friedman, 2009). NO는 혈관내피세포의 탄력유지를 통한 혈압조절(Wennmalm, 1994; Amadeu *et al.*, 2007), 혈소판의 기능 조절(Ignarro *et al.*, 1987; Murad, 2006; Miller and Megson, 2007), 장의 연동운동과 음경발기를 조절하는 신경 전달물질(Ignarro *et al.*, 1987; Murad, 2006; Miller and Megson, 2007) 및 상처치료(Witte and Barbul, 2002) 등의 역할을 하여 인체의 항상성 유지에 깊게 관여되어 있다. 특정농도에서 정상세포에 영향을 주지 않으면서 암세포 사멸효과도 나타내는 것이 알려져 있다(Wink *et al.*, 2008).

NO의 생체 내 합성

NO는 기본적으로 L-arginine을 원료물질로 하여 NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 생성된다. NOS는 eNOS (내피세포 산화질소 합성효소, endothelial NOS), nNOS (신경 산화질소 합성효소, neuronal NOS) 및 iNOS (유도성 산화질소 합성효소, inducible NOS) 세가지가 존재하고, 각 효소에 의해 생성된 NO는 발현, 조절 패턴 및 조직 분포 등이 달라진다(Shin *et al.*, 2007; Saraiva *et al.*, 2011; Coneski and Schoenfisch, 2012). eNOS와 nNOS는 일반 세포에서 구성적으로 발현되는 반면, iNOS는 수지상 세포, 자연 살해 세포, 비만세포, 단핵구, 대식 세포, 호산구와 중산구 등 면역세포에서 유도 발현된다(MacMicking *et al.*, 1997). eNOS와 nNOS를 가지는 세포는 짧은 시간 동안 저농도의 NO를 생산하여 주로 세포 내 신호전달이나 단백질의 활성 또는 억제에 관여하는 반면, 활성 대식세포 등에서 발현되는 iNOS는 고농도의 NO를 생산하여 nitrosation, nitration 및 oxidation 반응을 일으켜 주로 선천적 면역에 깊게 관여하고 있다(Wink and Mitchell, 1998; Thomas *et al.*, 2008). 특히, iNOS에 의한 NO의 생성은 eNOS나 nNOS에 비해 NO의 생성으로 인한 되먹임 저해에 영향을 훨씬 적게 받기 때문에, 병원균 침입 시 방어작용을 위해 지속적으로 NO를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있다(Bogdan, 2011).

NO의 생화학적 특성

NO의 항균작용은 질산화 반응(nitrosation)이나 산화 반응(oxidation) 등을 통해 생성되는 질소화 물질이나 산화물질 등에 의해 간접적으로도 많이 일어나므로, NO의 항균기전에 앞서 이것의 생화학적인 특징에 대해 먼저 알아볼 필요가 있다.

NO는 지용성 기체분자로 단순확산을 통하여 세포막을 쉽게 투과하는 것으로 알려져 있어 세균의 안과 밖에서 세포 구성성분과 쉽게 반응이 가능하다(Fang, 1997). NO는 산소와의 자동산화 반응을 통해 N_2O_3를 생성하여 질산화적 스트레스(nitrosative stress)를 유도한다(Gorham and Scamman, 1934). NO는 라디칼 가스로 산소가 존재하는 환경에서 산소와 반응하여 자동산화반응을 일으키는데, NO와 O_2의 반응과 NO/$O_2^{\cdot-}$의 반응이 주된 반응이며 NO와 산소의 반응으로 RNOS (reactive nitrogen oxide species)가 생성된다. 세포막의 지질층에서 NO의 자동산화는 NO_2를 만들고, 부가적인 NO의 반응으로 N_2O_3가 생성된다(Wink and Mitchell, 1998; Espey *et al.*, 2001). NO_2는 지질 과산화 과정을 일으킬 수 있는 강력한 산화제로 알려져 있다.

$$2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$$
$$NO_2 + NO \leftrightarrow N_2O_3$$

표준 수소 전극의 1.2 V의 산화력을 가지는 NO_2는 지질 과산화 과정을 일으킬 수 있는 강력한 산화제이다. 그러나 수용액상태에서의 NO_2는 NO의 자동산화를 통해 N_2O_3가 생성되는 과정에서 유의할만한 양이 생성되지 않는다.

또한, NO는 $O_2^{\cdot-}$와의 반응을 통해 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 생성한다(Beckman, 1991). Peroxynitrite의 형성은 NO와 superoxide의 양과 여러 생체 물질과의 반응에 의해 조절된다. 세포 내에서 세포 호흡의 결과로 peroxynitirite가 superoxide를 생성하며, NO의 농도가 높은 미토콘드리아에서 생성된다. Peroxynitrite의 중요성은 *M. tuberculosis*와 *S. typhimurium* 같은 세균이 peroxynitrite를 nitrite로 무독화 시키는 peroxiredoxin을 가지고 있는 것을 보아도 알 수 있다(Bryk *et al.*, 2000). Peroxynitrite의 분해는 peroxynitrous acid (ONOOH)을 통해 일어나는데, 이 과정에서 *trans*-ONOOH, $\cdot NO_2$ 그리고 $\cdot OH$의 중간체를 생성하고 이들은 표적 분자의 전자를 산화시킨다(Espey *et al.*, 2002). 미생물에서 일어나는 NO에 의한 산화적/질산화적 스트레스의 기전을 Fig. 1에 요약하였다.

$$NO + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONOO^-$$
$$ONOO^- + H^+ \leftrightarrow \textit{cis}\text{-}ONOOH$$
$$\textit{cis}\text{-}ONOOH \rightarrow \textit{trans}\text{-}ONOOH$$
$$\textit{trans}\text{-}ONOOH \rightarrow [NO_2\cdot \mid \cdot OH] \rightarrow NO_3^-$$

NO의 항균작용 기전

NO의 항균작용은 크게 직접작용과 여러 반응을 통해 생성된 RNOS의 작용인 간접작용으로 나눌 수 있다(Fig. 1). NO의 직접작용에는 금속 화합물과의 반응과 라디칼과의 반응이 있고(Wink and Mitchell, 1998), 간접작용으로는 nitrosation, oxidation, nitration의 반응에 의한 nitrosoamine 형성, nitrosothiol 형성, 탈아민화, hydroxylation, 지질과산화와 DNA 가닥 절단 등의 작용이 있다(Nguyen *et al.*, 1992). 저농도에서의 NO는 직접작용이 우세하고, 고농도에서의 NO는 RNOS에 의한 간접작용이 우세한 것으로 알려져 있다(Wink and Mitchell, 1998).

NO의 직접작용으로 heme기의 특성을 가진 단백질과의 직접반응이 있다. Heme기를 가진 단백질로는 guanylate cyclase, cytochrome P450 및 NOS가 있다. Guanylate cyclase는 NO와의 반응을 통해 활성화되어 많은 조절 기능을 매개하는 핵심적

인 이차전달자인 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 생성을 촉진한다. 이 반응은 혈관긴장도, 혈소판기능, 신경전달물질 및 세포 내 상호작용에 영향을 주어 면역반응을 활성화시켜 항균작용을 증가시킨다. 저농도에서 NO는 guanylate cyclase의 Fe(II)에 가역적으로 결합하여, Fe-nitrosyl complex를 형성한다. NO와 Fe의 결합은 histidine을 제거하게 되고, 그 결과로 5배위(five coordinate) nitrosyl complex가 형성되어 guanylate cyclase가 활성화된다(Wink and Mitchell, 1998).

또한 NO는 호르몬 합성, 약물 활성화 및 발암물질의 생성을 매개하는 주요 효소인 cytochrome P450을 가역적, 비가역적인 방법으로 억제한다. Cytochrome P450의 경우 guanylate cyclase와는 달리 Fe-nitrosyl complex가 cytochrome P450의 활성을 억제한다(Stadler *et al.*, 1994). 가역적 억제의 경우, NO가 heme기에 결합하여 활성에 필수적인 산소와의 결합을 억제하여 cytochrome P450의 촉매반응을 직접적으로 억제시킨다(Wink *et al.*, 1993).

DNA 합성에 필수적인 ribonucleotide reductase와 같은 heme기가 없는 metalloenzyme도 NO와 직접 반응하여 활성이 억제되고, DNA 합성의 억제가 세포증식의 억제로 이어져 항균활성을 나타낸다(Lepoivre *et al.*, 1990). 그러나 metalloenzyme과는 달리 Fe과 직접 상호작용하기보다 중간 생성물인 라디칼과 NO의 반응이 주된 기전이다. Ribonucleotide reductase의 turnover시 생성되는 tyrosyl 라디칼이 NO와 반응하여 효소 활성이 억제된다(Lepoivre *et al.*, 1992). 또한 환원된 thiol 그룹의 nitrosylation도 관여하는 것으로 보인다. Deoxynucleoside의 첨가는 항바이러스 효과를 낮추기 때문에 NO의 ribonucleotide reductase 억제작용은 vaccinia virus를 억제할 수 있는 것으로 나타났다(Mělková and Esteban, 1995). Fe의 첨가와 tricarboxylic acid (TCA) cycle의 중간체가 부분적으로 virus의 복제를 회복시키기 때문에 NO 관련 항균 기전은 NO뿐만 아니라 다양한 작용과 유기적으로 연결되어 있다(Karupiah and Harris, 1995), 원핵세포도 ribonucleotide reductase를 포함하고 있지만 NO의 작용은 아직 밝혀지지 않았다.

NO의 간접 항균작용은 NO/O_2 또는 $NO/O_2^{\cdot-}$ 반응에 의해 생성된 RNOS에 의해 주로 이루어진다(Pryor *et al.*, 1982; Wink *et al.*, 1994). RNOS에 의한 nitrosation 반응은 RNOS의 NO가 친핵성기로 옮겨지는 반응으로 nitrosoamine이나 S-nitrosothiol이 형성된다. S-nitrosothiol, N_2O_3 및 dinitrosyl-thiol-iron 복합체와 같은 NO 동족체들은 잠재적으로 nitrosation 반응을 일으키는 종이다.

Nitrosation의 대표적인 작용은 DNA에서의 화학적 변형이다. NO를 통한 DNA 변형은 주로 RNOS와 DNA의 직접반응, DNA 수선 억제, 알킬화제와 과산화수소 생성 촉진에 의해 이루어진다. RNOS와 DNA의 직접반응에서는 N-nitrosating 중간체가 cytosine, adenine 및 guanine을 탈아민화 시킨다(Juedes and Wogan, 1996; Fang, 1997). DNA 수선 메커니즘이 결핍된 *Salmonella typhimurium*을 지속적으로 NO에 노출시켰을 때, DNA 탈아민화 반응이 관찰되었다(Maragos *et al.*, 1993). 재조합 DNA 수선메커니즘이 결핍된 *S. thphimurium*은 S-nitrosothiol과 peroxynitrite 생성 물질인 3-morpholinosydnonimune에 의하여 생장 억제와 항균작용이 쉽게 나타나고, 쥐에서의 병원성이 약화되는 것을 관찰 할 수 있었다(De Groote *et al.*, 1995). 또한, NO는 알킬화된 DNA 수선 효소를 억제한다(Laval and Wink, 1994; Laval *et al.*, 1997). DNA는 cytosine 잔기를 가지고 있는데, cytosine 잔기의 $^-$SH와 NO가 반응하여 S-NO 부가체를 형성한다. 이 반응을 S-nitrosylation이라고 한다. 이러한 부가체는 알킬기를 guanine에서 단백질로 전이되는 것을 억제시켜 DNA 알킬기 전이효소의 작용을 차단하여 DNA를 변형시킨다. 또한

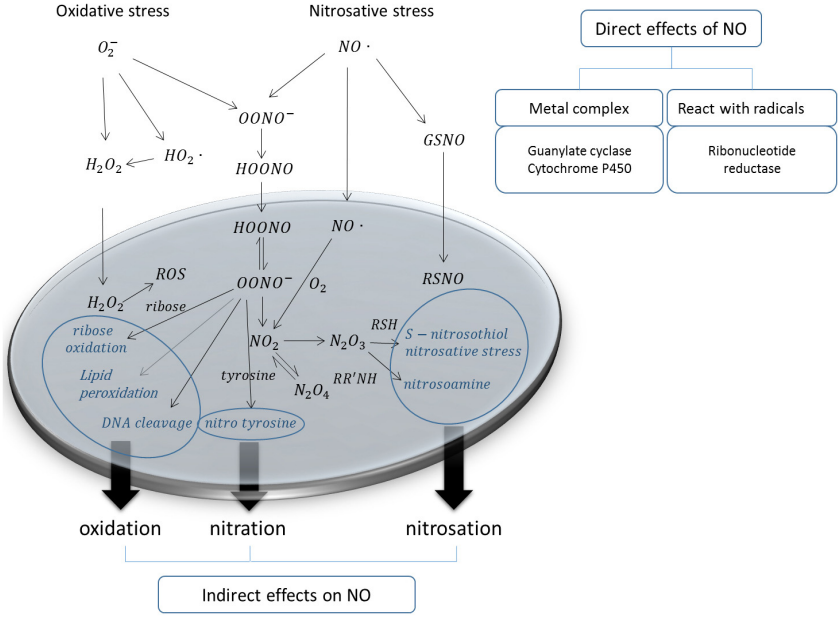

Fig. 1. Antibacterial mechanisms of NO.

RNOS는 알킬화제와 과산화수소의 생성을 촉진하여 DNA에 독성을 일으킨다. 고농도의 NO에 의해 생성된 RNOS는 비가역적으로 heme 단백질에 결합하게 되고, 단백질로부터 heme기를 제거하여 효소활성을 억제한다. 이러한 반응은 세균에 Fe 결핍을 유도하여 항균작용을 나타낸다(Wink *et al.*, 1993; Fang, 1997; Wink and Mitchell, 1998).

RNOS는 tyrosine 잔기에 nitration을 일으켜 신호전달 과정에서 중요한 역할을 하는 tyrosine의 인산화를 억제하여 단백질의 기능과 turnover를 변형시켜 항균작용을 나타낸다. Tyrosine의 nitration은 myeloperoxidase에 의해서도 일어난다. Myeloperoxidase는 단핵구와 다형핵 백혈구(polymorphonuclear neutrophil)에서 분비되는 효소로서 hypochlorous acid 생성을 촉진하여 잠재적인 nitrating agent인 nitryl chloride (NO_2Cl)를 형성하게 된다(Eiserich *et al.*, 1998).

RNOS는 산화반응을 통해 DNA 가닥 절단과 지질과산화을 일으켜 항균 작용을 나타낸다. $NO_2\cdot$와 peroxynitrite는 가닥 절단 및 DNA 변화 등을 통해 DNA를 산화하여 손상시킬 수 있다(Juedes and Wogan, 1996). 최근 periplasmic superoxide dismutase가 결핍된 *S. typhimurium*의 병원성이 약화되는 것이 밝혀졌는데, 이것은 NOS의 억제나 $O_2^{\cdot-}$를 생성시키는 식세포 oxidase의 결핍에 의해 회복되는 것이다. 이 결과는 세균의 superoxide dismutase의 존재에 의해 길항되는 $NO\cdot$와 $O_2^{\cdot-}$로부터의 peroxynitrite 생성이 *salmonellosis*에서 숙주의 항균작용에 중요한 부분이라는 것을 나타낸다. 또한 peroxynitrite는 리포좀의 지질과산화 반응을 중재하는 것으로 보이며, $NO_2\cdot$ 또한 지질과산화를 유도한다. 이러한 지질 과산화 반응은 NO의 항균 활성에 기여하는 것으로 생각된다(Rubbo *et al.*, 1994; Fang, 1997). RNOS는 DNA, 단백질 및 지질을 변형시키는 것 뿐만 아니라 면역 반응을 조절하고 숙주의 다른 기능을 조절함으로써 미생물에 간접적인 효과도 나타낸다. NO는 면역세포의 부착과 기능, 세포 증식과 cytokine 생성 등을 포함하여 면역 조절자 역할을 한다(Wei *et al.*, 1995). 그러므로 NO에 의한 간접 항균효과는 NO-의존 IFN-γ 유도, NO 또는 peroxynitrite-의존의 결과로 호중구로부터의 $O_2^{\cdot-}$와 H_2O_2의 방출량의 증가로 나타난다. NO의 면역조절자의 역할이 병원균과 NO-연관 항균활성에 중요한 역할을 하는 것이라 할 수 있다.

미생물마다 NO의 항균작용이 발생하는 기전에서 다양한 차이를 보였다. 예를 들면, $NO\cdot$는 *S. typhimurium*이나 *E. coli*에 대해 항균작용을 나타내지 않았으나, S-nitrosothiol은 정균작용 나타내며 peroxynitrite는 항균작용을 나타낸다(De Groote *et al.*, 1995; Pacelli *et al.*, 1995). 대조적으로 S-nitrosothiol과 $NO\cdot$는 *S. aureus* (Kaplan *et al.*, 1996), *L. major* (Assreuy *et al.*, 1994)와 *G. lambilia* (Fernandes and Assreuy, 1997)에 대해 정균작용을 나타내나, peroxynitrite는 강력한 항균작용을 나타낸다.

현재까지 NO에 대한 항생제의 내성이 밝혀진 바는 없다. 최근 연구에서 NO를 처리한 *S. aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis*, *E. coli*와 *P. aeruginosa* 모두 최소억제농도(MIC) 값의 유의미한 증가가 없었다(Privett *et al.*, 2012). NO에 대한 저항성이 발견되지 않은 이유는 NO가 다양한 기전으로 항균작용을 나타내기 때문으로 여겨지고 있다(Ghaffari *et al.*, 2006, 2007; Privett *et al.*, 2012). 즉, NO는 세균막을 쉽게 통과하여 nitrosation, oxidation 및 nitration이 진행되는데, 저항성이 발현되기 위해서는 이러한 다양한 기전에 대한 변이가 동시에 나타나야 하기 때문에 미생물이 내성을 나타내기가 쉽지 않다.

NO를 이용한 항균전략

NO를 항균제로 개발하기 위해서는 NO의 저장과 방출을 조절하는 전략이 필요하다. 즉 짧은 반감기와 기체적 성질을 가진 NO를 감염부위로 충분한 시간 동안 안전하게 전달하여야 한다. 지금까지 연구된 NO 방출시스템 중 본 총설에서는 NO 가스와 NO 공여체 및 이들을 이용한 최신 NO 방출시스템을 소개하고자 한다.

NO 가스: NO 가스의 직접적 적용은 NO의 항균작용을 연구하는 초기에 많이 사용되었다. NO 가스의 직접 적용은 *P. aeruginosa* 및 *S. aureus*의 성장을 억제하고, 특히 고농도 NO는 멸균작용을 나타내었다(Ghaffari *et al.*, 2005). 토끼의 상처모델에서 NO 가스는 *S. aureus*의 사멸효과를 보인 반면, 면역세포나 섬유아세포 등의 정상세포에는 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다(Ghaffari *et al.*, 2007). NO는 미생물뿐만 아니라 기생충과 바이러스에도 억제효과를 가진다(De Groote and Fang, 1995). NO 가스의 직접적용은 신생아의 폐고혈압의 치료법으로 승인 되어 안전한 방법으로 알려져 있다. 하지만 NO의 직접 적용시스템은 가스컨테이너, 압력조절기, 가습장치 및 열장치 등의 다루기 어려운 장치들로 구성되어 있고 실제 항균작용을 나타내기 위해서는 장시간 지속적으로 적용이 필요한 까다로운 과정을 거쳐야 하는 단점을 가지고 있다.

NO 공여체: NO 공여체는 NO의 방출 조절과 작용부위까지의 전달과정 동안 NO의 라디칼을 안정화 시킬 수 있는 수송체이다. 이상적인 공여체는 상온에서 NO를 긴 시간 동안 저장할 수 있고, 지속적으로 방출해야 하고, 독성이 없으며 염증을 일으키지 않아야 한다(Englander and Friedman, 2010). 1980년대 중반 이후 자발적이고 지속적인 NO 방출이 가능한 다양한 계열의 NO 공여체가 개발되고 있다. 이들 공여체의 대부분은 nitrite, nitrate, N-nitroso, C-nitroso, metal-NO complexes 및 diazeniumdiolates (NONOates) 등의 저분자량 화합물이다(Wang *et al.*, 2002). 이들 화합물의 화학적 성질에 따라, NO의 방출 특성이 달라진다(Wang *et al.*, 2009). Nitroglycerin과 sodium nitropusside처럼 심혈관계 질환에 오랫동안 사용되어 온 organic nitrates는 갑작스러운 두통 또는 저혈압과 같은 바람직하지 않은 효과를 유도할 수 있어 항균제로 개발하기에 제한이 있다(Riccio *et al.*, 2009). 최근 NO 방출이 조절 가능한 공여체인 NONOate와 RSNO을 이용하여 NO의 항균효과를 연구한 많은 사례들이 있다.

Diazeniumdiolate 또는 NONOate이라 불리는 NO 공여체는 친핵성 첨가물에 결합된 dioloate 그룹 [-N(O-)n=O]으로 구성된다(Jo *et al.*, 2009). 일반적으로 아민그룹의 질소가 친핵성 물질로 사용된다. Diolate 그룹은 무산소 환경에서 NO 가스를 출발물질에 노출하면 생성된다. 출발물질에 따라 PROLI NONOate,

PAPA NONOate (Seabra and Duran, 2010), DPTA NONOate (Kapadia *et al.*, 2008) 그리고 DETA NONOate (Keefer, 2005) 등의 다양한 NONOate가 합성된다(Fig. 2). NONOate은 체내의 생리적 조건에서 자발적으로 공여체 1몰당 2몰의 NO를 방출하며, 그 방출패턴의 예측이 가능한 장점을 가지고 있어 NO의 다양한 항균 작용의 연구에 이용되고 있다. 세포에 존재하는 폴리아민인 diethylenetriamine을 출발물질로 사용하여 만든 DETA NONOate는 그람음성균과 그람양성균에 대한 항균작용뿐만 아니라, 칸디다균의 성장억제와 아졸계통의 항균제와의 상승작용을 나타낸다(McElhaney-Feser *et al.*, 1998; Dukelow *et al.*, 2002; Raulli *et al.*, 2002). 항균제인 케토코나졸에 NONOate를 결합한 경우에도 케토코나졸 단독 사용보다 항균작용이 증강된다(Konter *et al.*, 2008). NONOate은 체내에서 예측가능한 NO 방출 특성으로 항균제로 개발 잠재성이 매우 크지만, 출발물질이 독성이 있을 경우 NO 방출 후 재 생성된 출발물질로 인해 독성 문제가 있을 수 있으므로 주의가 필요하다. 또한 대부분의 NONOate는 반감기가 24시간을 넘지 않아 지속적인 NO 방출이 필요한 경우 NONOate의 단독사용이 어려운 점도 있다.

NONOate와 더불어 자주 이용되는 NO 공여체로 S-nitrosothiols (RSNO)가 있다. Figure 2에서 보듯이 RNSO는 thio 그룹(R-SH)에 NO가 결합된 형태로 생체 환경에서 구리이온에 의한 분해, 아스코르브산이나 특정 파장의 빛에 의한 반응으로 이 결합이 깨어질 때 NO가 방출된다(Seabra *et al.*, 2007). S-nitrosoglutathione (GNSO)와 S-nitroso-Nacetyl-DL-penicillamine (SNAP)가 대표적인 RSNO이다 GSNO와 SNAP는 그람음성균과 그람양성균 모두에서 사멸효과를 가지고, 리슈마니아 등의 여러 기생충에서도 항균효과를 보인다(Marcinkiewicz, 1997; de Souza *et al.*, 2006; Souza-Lima Sr *et al.*, 2011). 특히 생체 내에서 NO의 저장 및 수송에 사용되는 GNSO의 경우 인체 세포에 독성을 나타내지 않는 농도에서 항균작용이 있어 안정성이 높은 것으로 알려져 있다(Bryan *et al.*, 2004). 리슈마니아 피부감염을 환자에서 SNAP를 투여 하지 않은 경우 치료효과가 없었지만, SNAP를 투여한 환자는 치료효과가 상승되었다(Ishima *et al.*, 2007). RSNO는 내인성 NO로 독성이 적은 장점이 있지만, NONOate에 비해 생체 내에서의 NO 방출의 예측이 어렵고 미생물이 RSNO를 분해하는 기전이 알려져 있어 항생제로 개발하기 위해서 그 방출 특성을 조절하는 전략이 요구된다(Laver *et al.*, 2010).

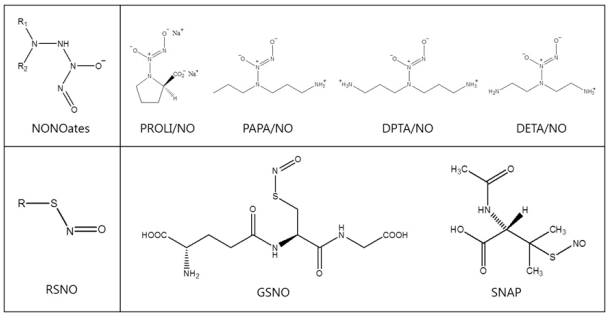

Fig. 2. Types of NO donors and their structures.

NO 방출시스템: NO가스나 NO 공여체를 직접 사용하는 것은 NO의 효과를 검증하기에 효과적인 방법이나, 위에서 설명했듯이 항균제로 사용하기에는 NO의 농도 유지와 지속시간 유지에 여전히 어려움이 있다. 최근 이러한 단점을 극복하기 위해 다양한 NO 방출시스템이 개발되고 있다.

NO의 저장능력과 방출특성 제어를 위해 고분자 물질이나 나노물질에 NONOate를 결합하여 NO를 방출하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 실리콘 계열의 고분자인 N-(6-aminohexyl)-aminopropyltrimethoxysilane (AHAP3)에 NONOate를 봉입한 솔-겔(sol-gel)을 코팅한 한 경우, 제어 방출된 NO가 *E. coli* 및 *P. aeruginosa*의 세포막 구조에 영향을 주어 amoxicillin을 처리한 경우와 유사한 세포막 방해 작용으로 항균효과를 나타낸다 (Nablo and Schoenfisch, 2005). NONOate를 코팅한 실리콘 생체이식제는 *S. aureus*, *E. coli* 및 *P. aeruginosa*의 부착을 저해하여 유의미한 감염 억제효과를 보인다(Singh *et al.*, 1996). 나노섬유로 만들어진 NO 방출성 상처치료 드레싱은 *S. aureus*의 성장을 억제하고 리슈마니아에 감염된 환자의 상처의 치료 속도를 증가시킨다(Bhide, 2006). 이식제나 상처치료 드레싱 등에 사용되는 NONOate를 이용한 다양한 방출시스템은 초기 24시간 동안 상처부위에 충분한 NO를 방출하여 감염제어에 효율적이긴 하지만, 이식제의 전체 사용기간을 감안할 때 방출기간의 지속성을 좀 더 부여할 필요가 있다. NO 방출에 의한 세포독성 부분도 심도 있는 연구가 필요할 것으로 보인다.

RSNO를 이용한 방출성 시스템도 활발히 연구되고 있다. RSNO-제로겔(xerogel)은 빛에 노출 시 NO를 방출하는 환경 감응성 시스템으로 대조군에 비해 *P. aeroginosa* 부착을 현격히 감소시킨다(Riccio *et al.*, 2009). RSNO 폴리에스테르 코팅 또한 빛에 의해 NO 방출이 조절되는 환경 감응성 시스템으로 표면항균성을 보여준다(Seabra *et al.*, 2010). 최근 광섬유 케이블의 끝에 광활성 금속인 nitrosyl($Mn(PaPY_3)(NO))ClO_4$)로 제로겔을 코팅하여 항균작용을 관찰한 흥미로운 연구도 있다(Halpenny *et al.*, 2010). *P. aeruginosa*, *E. coli*, MSSA 및 MRSA의 플랑크톤 배양 조직에 NO 공여체를 코팅한 광섬유 끝부분을 삽입하여 실험한 결과, 5-10분의 NO 노출로 이들 균이 사멸되었다. NO 방출을 유도하는 sol-gel 코팅의 활용을 통해 스테인리스-스틸 재질의 세균 부착 저항력을 향상시키는 방법도 연구되고 있다 (Nablo *et al.*, 2005). *P. aeruginosa*, *S. aureus* 및 *S. epidermidis*의 부착 능력은 상온 및 생리적 온도에서 NO 존재 하에 감소된다.

최근 인체에 적용 가능한 다양한 생체재료의 등장 및 나노기술의 발달과 함께 다양한 NO 방출능력을 지닌 시스템이 개발될 것으로 사료된다. 또한 NO는 자체 항균작용뿐만 아니라 기존 항균제와의 상승작용도 많이 보고되고 있는 점을 감안할 때, 약물 봉입이 가능한 NO 방출시스템을 이용해 NO와 기존 항균제의 상승작용으로 향상된 항균능력을 지닌 새로운 항균시스템의 개발 또한 기대된다.

결 론

짧은 반감기를 가진 지용성 기체분자인 NO가 인체의 항상성

유지에 필수적인 물질로 알려지면서 지난 20여 년간 NO에 대한 매우 활발한 연구가 이루어지고 있다. 특히 NO가 인체를 미생물로부터 보호하는 면역시스템에서 매우 중요한 역할을 하는 항균물질로 이를 이용한 항균작용 기전에 대한 연구가 활발히 진행되었다. NO는 직접적으로 미생물의 핵심단백질인 guanylate cyclase, cytochrome P450, NOS 등과 반응하여 항균작용을 나타낼 뿐만 아니라 질산화반응이나 산화반응을 통해 생성되는 RNOS를 통해 간접적으로도 항균효과를 나타낸다. 이러한 다양한 항균 기전은 미생물이 NO에 대한 내성을 가지는 것을 어렵게 하여 MRSA 등의 내성균에서도 항균효과를 나타낸다. 이러한 이유로 NO를 항생제로 개발하려는 많은 연구가 이루어지고 있다. 하지만 NO는 짧은 반감기와 가스분자라는 단점을 가지고 있어 항생제로 사용하기 위해서는 감염부위에 유효 농도의 NO를 충분한 시간 동안 유지해야 한다는 개발상의 난점이 존재한다. 이를 극복하기 위해 NONOate와 RSNO 등 다양한 NO 공여체를 이용해 NO의 항균작용에 대한 연구가 이루어지고 있고, 이와 더불어 최근 고분자 기술과 나노기술을 이용한 NO 방출시스템을 통해 항균효과를 강화시키면서 인체에 적용이 가능한 형태로 개발이 이루어지고 있다. 물론 새로운 계열의 항생제로 개발하기에는 아직 많은 연구가 필요할 것이다. 하지만 최근 항생제 내성문제로 새로운 계열의 항생제가 시급히 요구되는 시점에서, 내성을 나타내고 있지 않는 것으로 알려져 있는 NO는 새로운 계열의 항생제로 개발 될 수 있는 잠재성이 큰 후보물질이라 할 수 있다.

적 요

인체의 항상성 유지에 필수적인 물질로 알려진 산화질소는 인체를 침입한 미생물로부터 보호하는 면역반응에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 산화질소는 미생물에 직간접적으로 작용하여 다양한 기전으로 항균작용을 나타낸다. 항생제의 심각한 내성이 심각한 사회적 문제로 대두되면서 새로운 계열의 항생제 개발이 절실한 시점에서 항균물질로서의 산화질소에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 매우 짧은 반감기와 기체분자인 산화질소를 항생제로 이용하기 위해서는 산화질소의 저장과 방출을 제어할 전략 필요하다. 본 총설에서는 산화질소의 체내에서의 생화학적 특성과 항균작용을 나타내는 다양한 기전에 대해 설명하였다. 또한 산화질소 방출을 조절하여 항균작용을 향상시키는 최근의 연구에 대해 알아보았다.

감사의 말

이 논문은 부산대학교 자유 과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

Amadeu, T.P., Seabra, A.B., de Oliveira, M.G., and Costa, A.M. 2007. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **21**, 629−637.

Assreuy, J., Cunha, F.Q., Epperlein, M., Noronha-Dutra, A., O'Donnell, C.A., Liew, F.Y., and Moncada, S. 1994. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major. *Eur. J. Immunol.* **24**, 672−676.

Beckman, J.S. 1991. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J. Dev. Physiol.* **15**, 53−59.

Bhide, M. 2006. Nitric oxide delivery from polymeric wound dressings. University of Akron.

Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 907−916.

Bogdan, C. 2011. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. Suppression and Regulation of Immune Responses, pp. 375−393. Springer.

Bryan, N.S., Rassaf, T., Maloney, R.E., Rodriguez, C.M., Saijo, F., Rodriguez, J.R., and Feelisch, M. 2004. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: An insight into their nature and kinetics *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4308−4313.

Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. 2000. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**, 211−215.

Coates, A.R., Halls, G., and Hu, Y. 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br. J. Pharmacol.* **163**, 184−194.

Coneski, P.N. and Schoenfisch, M.H. 2012. Nitric oxide release: part III. Measurement and reporting. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 3753−3758.

De Groote, M.A. and Fang, F.C. 1995. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin. Infect. Dis.* **21**, S162−S165.

De Groote, M.A., Granger, D., Xu, Y., Campbell, G., Prince, R., and Fang, F.C. 1995. Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6399−6403.

de Souza, G.F.P., Yokoyama-Yasunaka, J.K., Seabra, A.B., Miguel, D.C., de Oliveira, M.G., and Uliana, S.R.B. 2006. Leishmanicidal activity of primary *S*-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Nitric Oxide* **15**, 209−216.

Dukelow, A.M., Weicker, S., Karachi, T.A., Razavi, H.M., McCormack, D.G., Joseph, M.G., and Mehta, S. 2002. Effects of nebulized diethylenetetraamine-NONOate in a mouse model of acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Chest* **122**, 2127−2136.

Dusse, L.M.S.A., Vieira, L.M., and Carvalho, M.d.G. 2003. Nitric oxide revision. *Brazil. J. Arch. Pathol. Lab. Med.* **39**, 343−350.

Eiserich, J.P., Hristova, M., Cross, C.E., Jones, A.D., Freeman, B.A., Halliwell, B., and van der Vliet, A. 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**, 393−397.

Englander, L. and Friedman, A. 2010. Nitric oxide nanoparticle technology: a novel antimicrobial agent in the context of current treatment of skin and soft tissue infection. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **3**, 45−50.

Espey, M.G., Miranda, K.M., Thomas, D.D., and Wink, D.A. 2001. Distinction between nitrosating mechanisms within human cells and aqueous solution. *J. Biol. Chem.* **276**, 30085−30091.

Espey, M.G., Miranda, K.M., Thomas, D.D., Xavier, S., Citrin, D., Vitek, M.P., and Wink, D.A. 2002. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Ann. Ny. Acad. Sci.* **962**, 195−206.

Falagas, M.E. and Bliziotis, I.A. 2007. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int. J. Antimicrob. Agents* **29**, 630−636.

Fang, F.C. 1997. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin.*

Invest. **99**, 2818−2825.

Fernandes, P.D. and Assreuy, J. 1997. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**, 93−99.

Friedman, A. and Friedman, J. 2009. New biomaterials for the sustained release of nitric oxide: past, present and future. *Expert Opin. Drug Deliv.* **6**, 1113−1122.

Ghaffari, A., Jalili, R., Ghaffari, M., Miller, C., and Ghahary, A. 2007. Efficacy of gaseous nitric oxide in the treatment of skin and soft tissue infections. *Wound Repair Regen.* **15**, 368−377.

Ghaffari, A., Miller, C.C., McMullin, B., and Ghahary, A. 2006. Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. *Nitric Oxide* **14**, 21−29.

Ghaffari, A., Neil, D.H., Ardakani, A., Road, J., Ghahary, A., and Miller, C.C. 2005. A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial and mammalian cell cultures. *Nitric Oxide* **12**, 129−140.

Gorham, F. and Scamman, C. 1934. Papers of Charles V. Chapin. *MD New York, Commonwealth Fund*.

Halpenny, G.M., Gandhi, K.R., and Mascharak, P.K. 2010. Eradication of pathogenic bacteria by remote delivery of NO via light triggering of nitrosyl-containing materials. *Acs Med. Chem. Lett.* **1**, 180−183.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric-oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9265−9269.

Ishima, Y., Sawa, T., Kragh-Hansen, U., Miyamoto, Y., Matsushita, S., Akaike, T., and Otagiri, M. 2007. S-Nitrosylation of human variant albumin Liprizzi (R410C) confers potent antibacterial and cytoprotective properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 969−977.

Jo, Y.S., van der Vlies, A.J., Gantz, J., Thacher, T.N., Antonijevic, S., Cavadini, S., Demurtas, D., Stergiopulos, N., and Hubbell, J.A. 2009. Micelles for delivery of nitric oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14413−14418.

Juedes, M.J. and Wogan, G.N. 1996. Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat. Res.* **349**, 51−61.

Kapadia, M.R., Chow, L.W., Tsihlis, N.D., Ahanchi, S.S., Eng, J.W., Murar, J., Martinez, J., Popowich, D.A., Jiang, Q., Hrabie, J.A., and *et al.* 2008. Nitric oxide and nanotechnology: a novel approach to inhibit neointimal hyperplasia. *J. Vasc. Surg.* **47**, 173−182.

Kaplan, S.S., Lancaster, J.R., Jr., Basford, R.E., and Simmons, R.L. 1996. Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect. Immun.* **64**, 69−76.

Karupiah, G. and Harris, N. 1995. Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal by ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites. *J. Exp. Med.* **181**, 2171−2179.

Keefer, L.K. 2005. Nitric oxide (NO)- and nitroxyl (HNO)-generating diazeniumdiolates (NONOates): Emerging commercial opportunities. *Curr. Top. Med. Chem.* **5**, 625−634.

Konter, J., Mollmann, U., and Lehmann, J. 2008. NO-donors. Part 17: Synthesis and antimicrobial activity of novel ketoconazole-NO-donor hybrid compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8294−8300.

Laval, F., Wink, D., and Laval, J. 1997. A discussion of mechanisms of NO genotoxicty: Implication of inhibition of DNA repair proteins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **131**, 175−191.

Laval, F. and Wink, D.A. 1994. Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis* **15**, 443−447.

Laver, J.R., Stevanin, T.M., Messenger, S.L., Lunn, A.D., Lee, M.E., Moir, J.W., Poole, R.K., and Read, R.C. 2010. Bacterial nitric oxide detoxification prevents host cell S-nitrosothiol formation: a novel mechanism of bacterial pathogenesis. *FASEB J.* **24**, 286−295.

Lepoivre, M., Chenais, B., Yapo, A., Lemaire, G., Thelander, L., and Tenu, J.P. 1990. Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 14143−14149.

Lepoivre, M., Flaman, J.M., and Henry, Y. 1992. Early loss of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase of adenocarcinoma cells producing nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **267**, 22994−23000.

MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323−350.

Maragos, C.M., Andrews, A., Keefer, L.K., and Elespuru, R.K. 1993. Mutagenicity of glyceryl trinitrate (nitroglycerin) in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* **298**, 187−195.

Marcinkiewicz, J. 1997. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. *Immunopharmacology* **37**, 35−41.

McElhaney-Feser, G.E., Raulli, R.E., and Cihlar, R.L. 1998. Synergy of nitric oxide and azoles against Candida species *in vitro*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **42**, 2342−2346.

Mělková, Z. and Esteban, M. 1995. Inhibition of vaccinia virus DNA replication by inducible expression of nitric oxide synthase. *J. Immunol.* **155**, 5711−5718.

Miller, M.R. and Megson, I.L. 2007. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* **151**, 305−321.

Murad, F. 2006. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2003−2011.

Nablo, B.J., Rothrock, A.R., and Schoenfisch, M.H. 2005. Nitric oxide-releasing sol-gels as antibacterial coatings for orthopedic implants. *Biomaterials* **26**, 917−924.

Nablo, B.J. and Schoenfisch, M.H. 2005. *In vitro* cytotoxicity of nitric oxide-releasing sol-gel derived materials. *Biomaterials* **26**, 4405−4415.

Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C.L., Penman, B.W., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3030−3034.

Outterson, K., Samora, J.B., and Keller-Cuda, K. 2007. Will longer antimicrobial patents improve global public health? *Lancet Infect. Dis.* **7**, 559−566.

Pacelli, R., Wink, D.A., Cook, J.A., Krishna, M.C., DeGraff, W., Friedman, N., Tsokos, M., Samuni, A., and Mitchell, J.B. 1995. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* **182**, 1469−1479.

Privett, B.J., Broadnax, A.D., Bauman, S.J., Riccio, D.A., and Schoenfisch, M.H. 2012. Examination of bacterial resistance to exogenous nitric oxide. *Nitric Oxide* **26**, 169−173.

Pryor, W.A., Church, D.F., Govindan, C.K., and Crank, G. 1982. Oxidation of thiols by nitric-oxide and nitrogen-dioxide - synthetic utility and toxicological implications. *J. Org. Chem.* **47**, 156−159.

Raulli, R., McElhaney-Feser, G., Hrabie, J., and Cihlar, R. 2002. Antimicrobial properties of nitric oxide using diazeniumdiolates as the nitric oxide donor. *Rec. Res. Devel. Microbiol.* **6**, 177−183.

Riccio, D.A., Dobmeier, K.P., Hetrick, E.M., Privett, B.J., Paul, H.S., and Schoenfisch, M.H. 2009. Nitric oxide-releasing *S*-nitrosothiol-modified xerogels. *Biomaterials* **30**, 4494−4502.

Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B.A. 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* **269**, 26066−26075.

Saraiva, J., Marotta-Oliveira, S.S., Cicillini, S.A., Eloy Jde, O., and Marchetti, J.M. 2011. Nanocarriers for nitric oxide delivery. *J. Drug. Deliv.* **2011**, 936438.

Scatena, R., Bottoni, P., Pontoglio, A., and Giardina, B. 2010. Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks. *Curr. Med. Chem.* **17**, 61−73.

Seabra, A.B. and Duran, N. 2010. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. *J Mater. Chem.* **20**, 1624−1637.

Seabra, A.B., Martins, D., Simoes, M.M., da Silva, R., Brocchi, M., and de Oliveira, M.G. 2010. Antibacterial nitric oxide-releasing polyester for the coating of blood-contacting artificial materials. *Artif. Organs.* **34**, E204−214.

Seabra, A.B., Pankotai, E., Feher, M., Somlai, A., Kiss, L., Biro, L., Szabo, C., Kollai, M., de Oliveira, M.G., and Lacza, Z. 2007. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Dermatol.* **156**, 814−818.

Shin, J.H., Metzger, S.K., and Schoenfisch, M.H. 2007. Synthesis of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 4612−4619.

Singh, R.J., Hogg, N., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. 1996. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* **271**, 18596−18603.

Souza-Lima Sr, R.A., Cariello, A.J., Bispo Sr, M., De Souza Sr, G., De Oliveira, M., Hofling-Lima, A.L., and Pignatari, A. 2011. Bactericidal effect of nitric oxide donors against clinical isolates from keratitis. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* **52**, 5839.

Spellberg, B., Powers, J.H., Brass, E.P., Miller, L.G., and Edwards, J.E., Jr. 2004. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1279−1286.

Stadler, J., Trockfeld, J., Schmalix, W.A., Brill, T., Siewert, J.R., Greim, H., and Doehmer, J. 1994. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3559−3563.

Thomas, D.D., Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Flores-Santana, W., Switzer, C.H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambs, S., and *et al*. 2008. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 18−31.

Wang, J., Teng, Y.H., Hao, Y., Oh-Lee, J., and Mohanty, D.K. 2009. Preparation and properties of polyamines: part II-controlled and sustained release of nitric oxide (NO) from nitrosated polymers. *Polym. J.* **41**, 715−725.

Wang, P.G., Xian, M., Tang, X., Wu, X., Wen, Z., Cai, T., and Janczuk, A.J. 2002. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem. Rev.* **102**, 1091−1134.

Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.J., Huang, F.P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S., and Liew, F.Y. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**, 408−411.

Wennmalm, A. 1994. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J. Intern. Med.* **235**, 317−327.

Wink, D.A. and Mitchell, J.B. 1998. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 434−456.

Wink, D.A., Nims, R.W., Darbyshire, J.F., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G.W., Laval, F., Laval, J., and Cook, J.A. 1994. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O_2 reaction. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 519−525.

Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R., Eshenaur, S.C., and Nims, R.W. 1993. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 115−123.

Wink, D.A., Ridnour, L.A., Hussain, S.P., and Harris, C.C. 2008. The reemergence of nitric oxide and cancer. *Nitric Oxide* **19**, 65−67.

Witte, M.B. and Barbul, A. 2002. Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surg.* **183**, 406−412.