

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Srdan Đ. Stojanović

DISMUTACIJA AZOT MONOKSIDA U
BIOLOŠKIM I MODEL SISTEMIMA:
IN VITRO ISPITIVANJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2004.

Mentor: Dr Vesna Niketić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Beograd

Članovi Dr Vesna Niketić, redovni profesor
komisije: Hemijski fakultet, Beograd

Dr Mihajlo B. Spasić, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja
"Siniša Stanković", Beograd

Dr Ljuba Mandić, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Beograd

Datum odbrane: 02.12.2004. godine

Datum promocije:

Ova disertacija je urađena na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Vesne Niketić.

Prof. dr Vesni Niketić iskreno zahvaljujem za neizmernu strpljivost i razumevanje iskazanu tokom izrade disertacije. Prof. dr Mihajla Spasića, uvek vedrog duha i koji je uvek bio prisutan kada je zatrebalo, rado ću se sećati. Prof. dr Ljuba Mandić, iako nije bila uključena od samog početka, stalno je pokazivala interesovanje za moju disertaciju i pomagala kad je to bilo moguće - hvala.

Mom dragom kolegi dr Nenadu Tomaševiću, od nedavno amerikancu, koji je više bio zabrinut od mene samog za ovu disertaciju, ukazujem najtopliju zahvalnost za svu pruženu pomoć. Starom prijatelju Ljubiši Markoviću dugujem ništa manje zahvalnosti - teške trenutke mi je ublažavao partijama šaha...

Kolegama iz laboratorije Dragani Stanić, mr Milanu Nikoliću, Maji Karličić, Ninoslavu Staniću, Borisu Pejinu i Bojani Stanimirović zahvaljujem na pomoći u izradi eksperimentalnog dela disertacije.

Saradnicima prof. Spasića iz Instituta za biološka istraživanja dr Aleksandri Nikolić i dr Dušku Blagojeviću sam od srca zahvalan zato što su mi pomogli u savladavanju prvih koraka u određivanju aktivnosti superoksid dismutaza.

Kolegama iz Centra za Instrumentalnu analizu zahvaljujem na pomoći oko snimanja, NMR, MS i IC spektara.

Miodragu Mandiću što mi je omogućio snimanje fluorescentnih spektara, kao i hemičarima i fizičarima kod kojih sam rado svraćao u Institut "Vinča" veliko hvala.

Mom dragom prijatelju Jovanu Naumoviću, majstoru dopisnog šaha i taksisti na "odmoru" - čoveku božanske plemenitosti, bez koga nisam mogao ni jednog dana a da ne razmenim neko iskustvo, najiskrenije hvala od velemajestora.

Mojim roditeljima, rođacima i prijateljima koje nisam posebno pomenuo zahvaljujem na podršci.

IZVOD

"Dismutacija azot monoksida u biološkim i model sistemima: *in vitro* ispitivanja"

Sisari su izloženi endogenim i egzogenim izvorima azot monoksida (NO). U biološkoj sredini NO podleže kompleksnim reakcijama u kojima nastaju vrste reaktivnije od samog azot monoksida (RNOS), koje su uključene u mnoge fiziološke i (naročito) patofiziološke procese. Ove reakcije obuhvataju i konverziju NO u njegove reaktivne srodnike, nitrozonijum jon (NO^+) i nitroksilni (HNO/NO^-) anjon, koji mogu reagovati sa raznim ciljnim molekulima u biološkim sistemima što ima važnu ulogu u NO posredovanim procesima. Predloženo je da u biološkim sistemima NO prelazi u NO^+ ili HNO/NO^- vrste oksidacijom odnosno redukcijom NO pomoću metalnih jona. Mi smo postavili hipotezu da katalizom pomoću SOD i "slobodnog" gvožđa NO može da dismutuje ($2\text{NO} \rightarrow \text{NO}^+ + \text{HNO}/\text{NO}^-$) dajući obe vrste. U prvom delu rada ispitivan je efekat NO na aktivnost sve tri klase SOD: govedu Cu/ZnSOD, MnSOD (*E.coli*), FeSOD (*E.coli*) i FeSOD (*P.leiognathi*), a detaljno su ispitane modifikacije MnSOD nakon tretiranja sa NO. Nađeno je da je Cu/ZnSOD stabilna pri inkubiranju sa NO: čak i pri produženom inkubiranju nije došlo do značajnih promena u strukturi i aktivnosti enzima. Inkubiranje FeSOD i MnSOD sa NO dovodi do brze i znatne inaktivacije enzima. Pokazano je da inaktivacija MnSOD nastaje kao posledica ekstenzivnih modifikacija molekula enzima: fragmentacije polipeptidnog niza na ostacima histidina u aktivnom centru, modifikacija amino grupa, nitrovanja i oksidacije ostataka tirozina. Dokumentovano je da FeSOD i MnSOD katalizuju dismutaciju NO u NO^+ i NO^- vrste koje izazivaju modifikaciju i inaktivaciju enzima. U drugom delu rada ispitivana je sposobnost tragova jona gvožđa na dismutaciju NO. Nastajanje NO^+ vrsta rezultuje u sintezi S-nitrozotiola (RSNO) i nitrita, a HNO/NO^- u nastajanju hidroksilamina. Hidroksilamin je detektovan u rastvorima jona gvožđa inkubiranim sa NO u prisustvu cisteina, ali ne i glutaciona (GSH). Pokazano je da dodatak urata, dominantnog agensa za vezivanje "slobodnog" gvožđa, u rastvor glutaciona i jona gvožđa pre njihovog inkubiranja sa NO, dovodi do povećane sinteze GSNO i nastajanja hidroksilamina, uz gubitak urata koji prelazi u nitrozo/nitro proizvode koji nisu za sada identifikovani. Utvrđeno je da GSH štiti urat od raspadanja; efekat zavisi od odnosa GSH:urat. U neutralnim rastvorima proteina i jona gvožđa inkubiranih sa NO u prisustvu (ali ne i u odsustvu) urata detektovan je hidroksilamin i S-nitrozovanje proteina. RNOS generisane kao posledica dismutacije NO u rastvorima tirozina i jona gvožđa izazivaju nitrovanje i oksidaciju tirozina. U trećem delu je u *in vitro* eksperimentima ispitivana dismutacija NO katalizovana "slobodnim" gvožđem u cerebrospinalnoj tečnosti (CSF) zdravih osoba i osoba obolelih od amiotrofične lateralne skleroze (SALS). Nivo antioksidanata, proteinskih SH grupa, askorbata i urata, koji predstavljaju ligande za dinitrozil-gvožđe komplekse (DNIC) sa "slobodnim" gvožđem i/ili hvatače NO^+ i HNO/NO^- vrsta je promenjen kod SALS pacijenata. Da "slobodno" gvožđe katalizuje dismutaciju NO je dokazano nastajanjem RSNO i hidroksilamina u CSF uzorcima inkubiranim sa NO *in vitro*, odnosno potpunom inhibicijom ovih reakcija pomoću o-fenantrolina, helatora za jone gvožđa. Pokazano je da RNOS generisane dismutacijom NO reaguju sa askorbatom i uratom, što dovodi do njihovog gubitka, da prisustvo urata povećava kapacitet "slobodnog" gvožđa da katalizuje NO dismutaciju, dok je askorbat bolji hvatač od urata za generisane RNOS. Veći prinos RSNO, nitrita, hidroksilamina i 3-nitrotirozina u CSF uzorcima SALS pacijenata inkubiranih sa NO u odnosu na količine nađene u kontrolnim CSF uzorcima može da se objasni povećanim nivoom urata i smanjenim nivoom askorbata u CSF uzorcima SALS pacijenata. Rezultati prezentirani u ovom radu ubedljivo pokazuju da metal-posredovana dismutacija NO u biološkim uslovima ne samo da je moguća nego je i fiziološki relevantna. Zbog toga fiziološki značaj metal posredovane dismutacije NO zaslužuje dalja istraživanja.

Ključne reči: azot monoksid, superoksid dismutaza (SOD), NO dismutacija, reaktivne NO vrste (RNOS), Dinitrozil-gvožđe kompleksi (DNIC), Cerebrospinalna tečnost (CSF), nitrozotoli (RSNO)

ABSTRACT

"Dismutation of nitric oxide in biological and model systems: *in vitro* study"

Mammalian systems are exposed to nitric oxide (NO) through both exogenous and endogenous sources. Once formed, NO undergoes a complex series of reactions which lead to formation of several species more reactive than NO itself. Reactive nitrogen species (RNOS) derived from NO have been implicated in numerous physiological and (particularly) pathophysiological processes. These include NO conversion into its reactive congeners, nitrosonium (NO^+) and nitroxyl (HNO/NO^-) species, which both could react with various target molecules in biological systems with important consequences for NO mediated processes. It was suggested that in a biological system NO may be converted either to NO^+ or HNO/NO^- species by metal-catalyzed oxidation or reduction of NO, respectively. We hypothesized that the conversion of NO into both NO^+ and HNO/NO^- species may occur through the metal assisted NO dismutation ($2\text{NO} \rightarrow \text{NO}^+ + \text{HNO}/\text{NO}^-$) catalyzed by SODs and "free" iron. The effect of NO treatment *in vitro* on structural and functional alterations of Cu/Zn, Mn, and Fe type of SODs was studied. Significant difference in response to NO of Cu/ZnSOD compared to the Mn and Fe types was demonstrated. Cu/ZnSOD was shown to be stable with respect to NO: even on prolonged exposure, NO produced negligible effect on its structure and activity. In contrast, exposure to NO led to fast and extensive inactivation of both Mn and Fe types. Inactivation of MnSOD was demonstrated to be due to the extensive structural alterations, including the cleavage of enzyme polypeptide chains, presumably at His residues of the enzyme metal binding sites, amino groups modifications, tyrosine residue nitration and oxidation. The generation of nitrosonium and nitroxyl ions in NO treated Mn and FeSODs, which produce enzyme modifications and inactivation, was demonstrated. Dinitrosyl iron complex (DNIC) initiated iron ion catalyzed NO dismutation into NO^+ , resulting in the synthesis of S-nitrosothiols (RSNO) and nitrite, and into HNO/NO^- to produce hydroxylamine was demonstrated. Hydroxylamine was detected in NO treated solutions of iron ions in the presence of cysteine, but not glutathione. The addition of urate, a major "free" iron-binding agent in humans, to solutions of GSH and iron ions and the subsequent treatment of these solutions with NO increased the synthesis of GSNO and resulted in the formation of hydroxylamine. This caused a loss of urate and yielded a novel nitrosative/nitration product. GSH attenuated the urate decomposition to such a degree that it could be reflected as the function of GSH:urate. NO treatment of a neutral solution containing proteins and iron ions in the presence of urate, but not in its absence, resulted in hydroxylamine formation and protein S-nitrosation. The consequences of NO exposure *in vitro* were tested on cerebrospinal fluid (CSF), system containing "free" iron and constituents such as protein -SH groups, ascorbate and urate which represent ligands and/or scavengers of both NO^+ and HNO/NO^- species. The results demonstrate that "free" iron in CSF can catalyze NO dismutation as evidenced from the formation of both RSNO and hydroxylamine in CSF exposed to NO *in vitro* which was inhibited upon addition of iron ion chelator o-phenanthroline. NO treatment caused loss of CSF ascorbate and urate. Urate and ascorbate levels were found to affect both "free" iron ion catalyzed NO dismutation as well as the reactions of protein -SH groups with NO^+ and HNO/NO^- species. Results described in this work suggest that metal/assisted NO dismutation into NO^+ and HNO/NO^- species in biological systems may be feasible and possibly physiologically relevant.

Keywords: Nitric oxide, Superoxide dismutase, NO dismutation, Reactive NO species (RNOS), Dinitrosyl iron complex (DNIC), cerebrospinal fluid (CSF), nitrosothiols (RSNO)

SPISAK ČEŠĆE KORIŠĆENIH SKRAĆENICA*

ALS - amiotrofična lateralna skleroza
AsCH - askorbinska kiselina
BSA - goveđi serum albumin
CSF - cerebrospinalna tečnost (likvor)
Cu/ZnSOD - bakar/cink superoksid dismutaza
DNIC - dinitrozil-gvožđe kompleksi
DTNB - 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)
EDRF - endotelni opuštajući faktor
eNOS - endotelna NO sintaza
EPR - elektron paramagnetna rezonanca
FALS - familijarna amiotrofična lateralna skleroza
FeSOD - gvožđe superoksid dismutaza
GSH - redukovani glutation
GSNO - S-nitrozo glutation
GSSG - oksidovani glutation
iNOS - inducibilna NO sintaza
IRP - gvožđe vezujući protein
M-NO - metal-nitrozil kompleksi
MNIC - mono-nitrozil-gvožđe kompleksi
MnSOD - mangan superoksid dismutaza
NEM - N-etil-maleimid
NMDA - N-metil-D-aspartat
nNOS - neuronalna NO sintaza
NOS - NO sintaza
NTYR - 3-nitrotirozin
PAGE - poliakrilamid gel elektroforeza
RBC - eritrociti
RNOS - reaktivne vrste azot monoksida
ROS - reaktivne kiseonične vrste
RSNO - nitrozotioli
SALS - sporadična amiotrofična lateralna skleroza
SDS - natrijum-dodecilsulfat
SOD - superoksid dismutaza
Tris - tris(hidroksimetil)aminometan
UA - mokraćna kiselina

* Spisak skraćenica, korišćenih u ovom radu, poredan je po abecednom redu.

SADRŽAJ

1 UVOD	1
<hr/>	
2 OPŠTI DEO	6
2.1 Poreklo NO kojem su izloženi živi sistemi	7
2.1.1 Biosinteza NO	7
2.1.2 Ne-enzimsko nastajanje azot monoksida	9
2.2 Fiziološke i patofiziološke uloge NO	10
2.2.1 Fiziološke uloge NO	11
2.2.2 Uloge NO u patofiziološkim procesima	13
2.3 Biohemijski mehanizmi dejstva NO	15
2.3.1 Reakcije NO sa centrima prelaznih metala u biološkim sistemima	16
2.3.1.1 Reakcije NO sa proteinima koji sadrže hem	17
2.3.1.2 Reakcija NO sa gvoždem koje nije u hemu: dinitrozil kompleksi gvožđa	18
2.3.1.3 MnSOD: osvrt na strukturu, funkciju i potencijalnu ulogu u metabolizmu NO	22
2.3.2 S-nitrozilovanje	26
2.3.3 Nitrovanje tirozina <i>in vivo</i>	29
2.4 Hemijski mehanizmi dejstva NO: reaktivne vrste NO (RNOS)	32
2.4.1 Reakcija NO sa O ₂ : NO _x	33
2.4.2 Reakcija NO sa O ₂ ⁻ : peroksinitrit	35
2.4.3 Redoks-srodnici NO: NO ⁺ i NO ⁻ vrste	37
2.4.3.1 (Potencijalni) mehanizmi nastajanja NO ⁺ i NO ⁻ vrsta u biološkim sistemima	38
2.4.3.2 Reakcije NO ⁺ vrste relevantne za biološke sisteme	40
2.4.3.3 Biološki relevantne reakcije HNO/NO ⁻ vrste	45
2.4.4 Biološki relevantni mehanizmi nitrovanja tirozina	48
<hr/>	
3 NAŠI RADOVI	52
3.1 MnSOD i FeSOD, ali ne Cu/ZnSOD katalizuju dismutaciju NO u NO ⁺ i NO ⁻ vrste	54
3.1.1 NO izaziva ireverzibilnu inaktivaciju MnSOD i FeSOD, ali ne i Cu/ZnSOD	55
3.1.2 MnSOD i FeSOD katalizuju konverziju (dismutaciju) NO u NO ⁺ i NO ⁻ vrste	56
3.1.3 Inaktivacija MnSOD (<i>E.coli</i>) i FeSOD posledica je ekstenzivnih modifikacija molekula enzima	58
3.2 Dismutacija NO katalizovana jonima gvožđa	65
3.2.1 Dismutacija NO katalizovana jonima gvožđa u prisustvu cisteina, GSH i proteinskih -SH grupa	65
3.2.2 Efekat urata na dismutaciju NO katalizovanu jonima gožđa	67
3.2.3 Dismutacija NO katalizovana jonima gvožđa u prisustvu aminokiselina	72
3.2.4 Mehanizmi dismutacije NO katalizovane jonima gvožđa	74
3.3 "Slobodno" gvožđe u cerebrospinalnoj tečnosti (CSF) katalizuje dismutaciju NO u NO ⁺ i NO ⁻ vrste	76
3.3.1 Analiza sadržaja proteina, -SH grupa, urata i askorbata u CSF zdravih osoba i osoba obolelih od amiotrofične lateralne skleroze (SALS)	76

3.3.2 Dismutacija NO u CSF uzorcima inkubiranim <i>ex vivo</i> sa NO	77
4 EKSPERIMENTALNI DEO	82
4.1 Hemikalije i reagensi korišćeni u ovom radu	82
4.2 Pripremanje apoMnSOD (<i>E.coli</i>)	82
4.3 Odvajanje hema od globina	82
4.4 Uzorci cerebrospinalne tečnosti	83
4.5 Pripremanje rastvora Fe ²⁺ i liganada	83
4.6 Inkubiranje uzoraka sa NO	83
4.7 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza	85
4.8 Određivanje nitrita	86
4.9 Određivanje hidroksilamina	86
4.10 Određivanje SH-grupa Ellmanovom metodom	87
4.11 Određivanje S-nitrozotiola	87
4.12 Određivanje mokraćne kiseline	87
4.13 Određivanje askorbinske kiseline	88
4.14 Određivanje 3-nitrotirozina spektrofotometrijski	88
4.15 Detektovanje ditirozina	88
4.16 Određivanje amino grupa	89
4.17 Određivanje proteina Bradfordovom metodom	89
4.18 MS i IC	89
4.19 Elektroforetske tehnike	90
5 DISKUSIJA	92
6 CITIRANA LITERATURA	99
7 BIOGRAFIJA	135

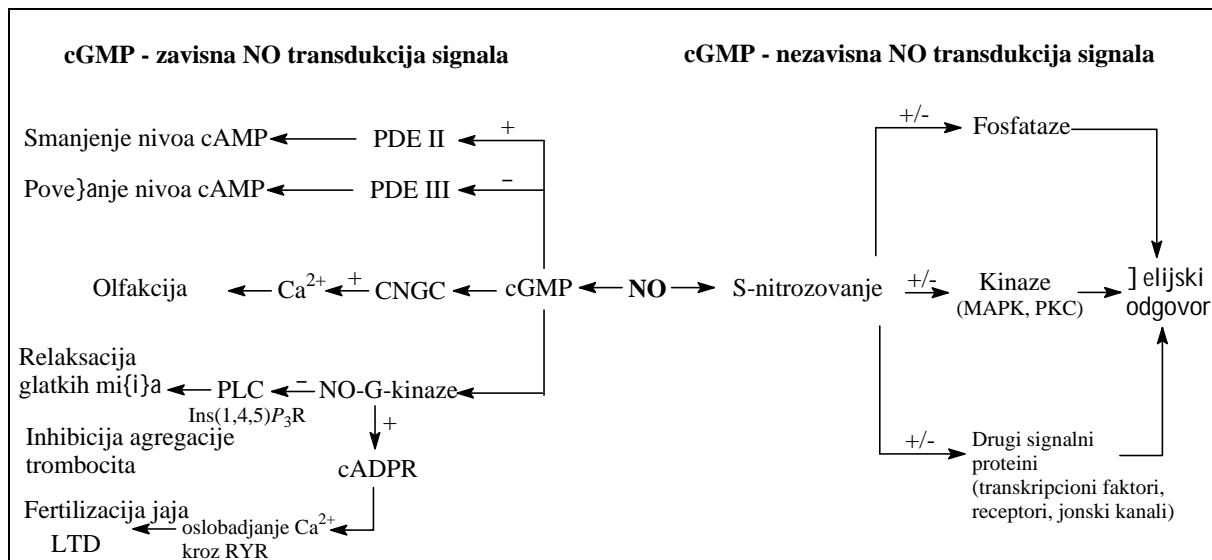
1 UVOD

Život zavisi od intra- i interćelijske komunikacije. Prema dosadašnjim saznanjima ova komunikacija se obavlja uz učešće jona i organskih molekula kao što su amini, organske kiseline, nukleozidi i nukleotidi, steroidi, polipeptidi i proteini. Ovi signalni molekuli se prenose putem kanala ili pora, a ostvaruju svoje dejstvo interakcijama sa specifičnim receptorima u ćelijskim membranama. Poslednjih dvadesetak godina ova saznanja su dopunjena revolucionarnim otkrićima da mali, visoko difuzibilni gas, dobro poznati hemijski zagađivač, NO, predstavlja signalni molekul u vertebratima i invertibratima, te da svoje mnogobrojne efekte NO ostvaruje hemijskim reakcijama u kojima učestvuje u određenom biološkom okruženju.

NO ima krucijalnu ulogu u homeostatskoj regulaciji kardio-vaskularnog, nervnog i imunog sistema (Ignarro, 1989b; Moncada et al., 1991; Culotta & Koshland, 1992). Pored fizioloških, NO je uključen i u niz patofizioloških procesa. Za neke bolesti kao što su hipertenzija, angina pectoris i impotencija karakterističan je manjak NO, dok se druge kao npr, zapaljenjski procesi i neurodegenerativne bolesti povezuju sa povećanom produkcijom NO. Zbog toga se smatra da donori, odnosno inhibitori sinteze NO imaju veliku potencijalnu farmakološku primenu (Moncada et al., 1991; Gross & Wolin, 1995; Schroeder & Kuo, 1995; Eiserich et al., 1998).

U ćelijama životinja, biohemijski mehanizmi dejstva NO su odvojeni kao zavisni ili nezavisni od cGMP (Slika 1) (Hausladen & Stamler, 1998).

cGMP zavisni put signalizacije je iniciran NO-indukovanom aktivacijom rastvorne guanilat ciklaze reakcijom NO sa gvožđem iz hema u aktivnom centru enzima (Stamler, 1994). Ovo rezultuje u sintezi sekundarnog glasnika, cGMP, koji je uključen u relaksaciju glatkih mišića, inhibiciju agregacije trombocita i u senzornom vizuelnom sistemu (Schmidt & Walter, 1994). cGMP postiže svoje dejstvo direktnim interakcijama sa ciljnim proteinima kao što su: cGMP-zavisne protein kinaze, ciklični nukleotidni kanali i fosfodiesteraze (Slika 1) (Beck et al., 1999).



Slika 1. Signalni putevi NO u ćelijama životinja: Aktivacija guanilat ciklaze povećava nivo cGMP, što se najviše odražava na aktivnost tri klase proteina: fosfodiesteraze (PDE), cikličnog nukleotidnog kanala (CNGC) i cGMP-zavisne protein kinaze (NO-G-kinaze). PDE se javlja u dva cGMP-zavisna tipa: tip II (PDE II) i tip III (PDE III). cGMP-aktiviran PDE II povećava hidrolizu cAMP. Međutim, cGMP povećava nivo cAMP inhibicijom PDE III. cGMP-zavisni CNGC izaziva influks Ca²⁺ u signalnim putevima senzornog sistema, uključujući i olfakciju. NO-G-kinaze posreduju dejstvo NO u glatkim mišićima i trombocitima inhibicijom agonist-indukovanog povećanja koncentracije Ca²⁺. Ovo se postiže inhibicijom fosfolipaze C (PLC) i inozitol 1,4,5-trifosfat-zavisnog Ca²⁺ kanala [Ins(1,4,5)P₃R]. NO-G-kinaze mogu, takođe, kontrolisati kaskadu signalne transdukcije u kojoj cADP riboza (cADPR) aktivira rianodin-senzitivne kalcijumove kanale (RYR). Influks Ca²⁺ rezultuje u fiziološkim funkcijama, kao što je fertilizacija jaja i dugoročna depresija (LTD-long term depression) sinaptičke transmisije. cGMP-nezavisni putevi, koji su manje proučeni, posredovani su S-nitrozovanjem signalnih proteina uključujući transkripcione faktore, receptore i jonske kanale. Fosfataze, protein kinaze uključujući mitogen-aktivirajuću protein kinazu (MAP) i protein kinazu C (PKC) su takođe ciljni molekuli za NO. NO indukuje različite MAP kinaze aktiviranjem faktora kao što je mali GTP-vezujući protein p21^{ras}. S-nitrozovanje MAP kinaza izaziva aktivaciju ili inhibiciju enzima. Ovi signalni putevi mogu dovesti do specifičnih ćelijskih odgovora, uključujući apoptozu (Hausladen & Stamler, 1998).

cGMP-nezavisni NO signalni putevi se zasnivaju na regulaciji aktivnosti signalnih proteina, uključujući transkripcione faktore, receptore i jonske kanale, S-nitrozovanjem ostataka cisteina strateški postavljenih u njihovom aktivnim ili alosternim mestima (Slika 1) (Stamler et al., 1992a; Stamler, 1994; Broillet, 1999; Stamler et al., 2001). NO aktivira p21^{ras} S-nitrozovanjem, što dovodi do modulacije MAP kinazne kaskade (Lander et al., 1996). S-nitrozovanje MAP kinaza izaziva aktivaciju ili inhibiciju enzima. Ovi signalni putevi mogu dovesti do specifičnih ćelijskih odgovora, uključujući apoptozu (Hausladen & Stamler, 1998). S-nitrozotioili pored toga predstavljaju način za odstranjivanje viška NO i za njegovo čuvanje i transport u biološkim sistemima.

Sve veću pažnju istraživača privlači nitrovanje ostataka tirozina u proteinima koje izazivaju reaktivne vrste nastale u uslovima povećane produkcije NO. Nitrovanje ostataka tirozina može da izazove inaktivaciju proteina, ali može da ima i regulatornu funkciju slično fosforilaciji (Eiserich et al., 1998).

Po važećem modelu, azot monoksid slobodno difunduje u biološkoj sredini dok ne izreaguje sa nekom od svojih meta. U ovim reakcijama mogu da nastanu vrste reaktivnije od samog NO (RNOS) (Moncada et al., 1991; Lancaster, 1994; Chen et al., 1998; Niketić et al., 1998). U biološkoj sredini NO može da se oksiduje u vrste sa (većim ili manjim) karakterom nitrozonijum katjona (NO^+), ili da se redukuje u nitroksilni anjon (NO^-) (Stamler et al., 1992). Nitroksilni anjon se pod fiziološkim uslovima delimično protonuje (Bartberger et al., 2001), tako da se ova vrsta obeležava sa HNO/NO^- . NO^+ i HNO/NO^- se nazivaju redoks-srodnicima NO i odavno se smatra da obe vrste, koje su znatno reaktivnije od samog NO, treba uzeti u obzir pri razmatranju bioloških funkcija NO (Stamler et al., 1992). Tako, transfer NO^+ na -SH grupe proteina izaziva reakciju S-nitrozovanja, a transfer NO^+ na ostatke tirozina dovodi do nastajanja 3-nitrozotirozina, koji može da se oksiduje u 3-nitrotirozin (Eiserich et al., 1998). Primenom sintetičkog donora NO^- , Angeli-jeve soli, primećeni su u ex vivo eksperimentima specifični, kako korisni tako i štetni, efekti nitroksila (Kubes et al., 1991; Ma et al., 1999; Booth et al., 2000; Mason et al., 2000; Miranda, et al., 2001; Paolocci et al., 2001; Feelisch, 2003; Pagliaro et al., 2003). Ovo očigledno nameće potrebu izučavanja biološki relevantnih mehanizama nastajanja i reakcija NO^+ i HNO/NO^- vrsta, što je bio i predmet rada ove doktorske teze.

NO^+ , NO i NO^- se mogu posmatrati i kao analozi redoks formi kiseonika: O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, odnosno O_2^{2-} (Stamler et al., 1992b). Međutim, za razliku od superoksid anjon radikala ($\text{O}_2^{\cdot-}$) koji ima sposobnost dismutacije, pri čemu nastaju O_2 i $\text{O}_2^{2-}(\text{H}_2\text{O}_2)$, NO sam ne podleže reakciji dismutacije (na primer Kanner, 1996). Azot monoksid pokazuje jak afinitet za jone prelaznih metala, pri čemu nastaju metal-nitrozil kompleksi. Azot monoksid kompleksiran za metalni jon može biti (ređe) neutralan ili pak, u zavisnosti od toga da li se u datom kompleksu NO ponaša kao donor ili akceptor elektrona u odnosu na metalni jon, pokazivati (veći ili manji) karakter nitrozonijum (NO^+), odnosno nitroksilnog (NO^-) jona (McCleverty, 1979).

Činjenica da je agregiranje, nitrovanje i inaktivacija MnSOD nađena u raznim oboljenjima za koja je karakterističan oksidativni stres i povećana produkcija NO ukazuje da je ovaj enzim meta za RNOS. Pretpostavili smo da bi superoksid dismutaze mogle da pokazuju sposobnost vezivanja NO, te da bi NO vezan za metalni centar u enzimu mogao imati (u zavisnosti od redoks stanja metalnog centra) NO^+ i/ili NO^- karakter. Nastala(e) reaktivne vrste bi mogle *in situ* reagovati sa aminokiselinskim ostacima što će za posledicu imati inaktivaciju enzima. Zbog toga smo u ovom radu ispitivali sposobnost sve tri klase SOD: Cu/ZnSOD, MnSOD, FeSOD (*E.coli*) i FeSOD (*P.leiognathi*) da izvrše transformaciju NO, u NO^+ i/ili NO^- vrste, a potom smo na primeru MnSOD (*E.coli*) detaljnije izučavali prirodu hemijskih modifikacija enzima izazvanih generisanim reaktivnim vrstama. Došli smo do potpuno novog saznanja da MnSOD i FeSOD, za razliku od Cu/ZnSOD, katalizuju transformaciju NO u NO^+ i NO^- vrste ($2\text{NO} \rightarrow \text{NO}^+ + \text{NO}^-$) i predložili naziv dismutacija NO za ovu metal-posredovanu redoks transformaciju azot monoksida.

Zbog značaja NO^+ i HNO/ NO^- vrsta za NO-posredovane procese tragali smo za drugim metalnim centrima koji bi mogli da katalizuju dismutaciju NO u biološkim sistemima. Pošli smo od pretpostavke da je "slobodno" gvožđe (joni Fe^{2+} i Fe^{3+} u biološkim sistemima kompleksirani u nestabilne komplekse male molekulske mase ili labilno vezani za proteine) najpodesnije za ova istraživanja.

Dobro je utvrđeno da "slobodno" gvožđe reaguje sa NO u biološkim sistemima, pri čemu nastaju dinitrozil-gvožđe kompleksi (DNIC), tipa $(\text{NO}^+)_2\text{Fe}(\text{I})\text{L}_2$. NO grupe u DNIC male molekulske mase imaju karakter nitrozonijum (NO^+) jona, tako da se ovi kompleksi smatraju važnim *in vivo* S-nitrozilujućim agensima (na primer Vanin 1998). S obzirom da mehanizam nastajanja DNIC obuhvata i redukciju NO u HNO/ NO^- (na primer Vanin 1998) pretpostavili smo da tragovi gvožđa u hemijskim, odnosno "slobodno" gvožđe u biološkim sistemima mogu da katalizuju reakciju dismutacije NO.

U ovom radu smo proširili ranija istraživanja u kojima je DNIC inicirana transformacija NO u NO^+ demonstrirana nastajanjem RSNO u neutralnim rastvorima NO, tiola male molekulske mase (cistein, GSH) i katalitičkih količina Fe(II) (Vanin et al., 1997; Vanin, 1998; Vanin et al., 2002) na nastajanje hidroksilamina (karakterističnog proizvoda HNO/ NO^- u reakciji sa tiolima) (Arnelle & Stamler, 1996). Pored toga ispitivali smo efekte biološki relevantnih anjonskih liganada, kao što su proteinski tioli, mokraćna kiselina i

aminokiseline, na dismutaciju NO katalizovanu jonima gvožđa. Aminokiseline su široko rasprostranjene u biološkim sistemima, a mokraćna kiselina, koja je anjon na fiziološkom pH (i zbog toga potencijalni ligand za DNIC!), je jedan od najvažnijih liganada za "slobodno" gvožđe (Davies et al., 1986; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Potencijalni biološki značaj metal posredovane dismutacije NO proverili smo u *ex vivo* eksperimentima u kojima smo koristili cerebrospinalnu tečnost (CSF) zdravih osoba i osoba obolelih od sporadičnog oblika amiotrofične lateralne skleroze (SALS). CSF sadrži "slobodno" gvožđe, MnSOD, tragove GSH i znatne količine niskomolekulskih anjonskih konstituenata kao što su aminokiseline i mokraćna kiselina (Lentner, 1981). Nivo antioksidanasa (proteinske SH grupe, urat i askorbat, koji su efikasni hvatači NO^+ i HNO/NO^- vrsta) se razlikuje kod pacijenata obolelih od neurodegenerativnih oboljenja, što može da utiče kako na stepen tako i na efekte dismutacije NO katalizovane "slobodnim" gvožđem.

2 OPŠTI DEO

Nitroglicerina, kojeg je sintetizovao Ascanio Sobrero, Alfred Nobel je upotrebio za proizvodnju dinamita. U Nobelovoj fabrici dinamita, kasnih 1860-ih godina primećeno je i dejstvo nitroglicerina u sprečavanju *angina pectoris*. Primećene su dve interesantne pojave: prva, radnici u fabrici su, još prvog radnog dana, osećali jaku glavobolju koja je iščezavala preko vikenda, i druga, radnici koji su imali *angina pectoris* (među njima i sam Alfred Nobel) osećali su olakšanje tokom radne nedelje, a bol u grudima se vraćao za vreme vikenda. Oba efekta potiču od vazodilatacionog efekta nitroglicerina, i bila su zapažena od strane tadašnjih fiziologa. Ali, kakav je mehanizam ovog fiziološkog efekta tako moćnog eksploziva devetnaestog veka? Odgovor na ovo pitanje je trebalo da sačeka više od 130 godina! Naime, kasnih 1970-ih i ranih 1980-ih godina je definitivno utvrđeno da azot monoksid (NO) izaziva vazodilataciju (Arnold et al., 1977; Ignarro et al., 1981; Moncada et al., 1991), a ubrzo je pokazano da vazodilatacioni efekat nitroglicerina potiče od azot monoksida (Ignarro, 1989a)! Ova rana zapažanja su kulminirala narednih deset godina otkrićima da mnoge ćelije sisara sintetizuju NO, te da je NO uključen u niz fizioloških procesa, kao što su regulacija krvnog pritiska, neurotransmisija i agregiranje trombocita. Pored fizioloških funkcija NO je uključen i u niz patofizioloških procesa. Za neke bolesti kao što su hipertenzija, *angina pectoris* i impotencija karakterističan je manjak NO, dok se druge kao npr, zapaljenjski procesi, neurodegenerativne bolesti, povezuju sa povećanom produkcijom NO. Zbog toga se smatra da donori, odnosno inhibitori sinteze NO imaju veliku potencijalnu farmakološku primenu (Moncada et al., 1991; Gross & Wolin, 1995; Schroeder & Kuo, 1995; Eiserich et al., 1998). Dostignuća u oblasti istraživanja NO dovode do toga da je NO proglašen za molekul godine u *Science* magazinu (Koshland, D.E., Jr. *Science* 1992, 258, 1861). Nobelova nagrada iz oblasti fiziologije i medicine je 1998. g., oko 130 g. od Nobelovog otkrića dinamita, dodeljena za rad "Azot monoksid kao signalni molekul kardiovaskularnog sistema".

Uprkos ovim dostignućima, tačan molekularni mehanizam kojim se NO oslobađa iz nitroglicerina ostao je sve do skoro nepoznat. Chen i saradnici (2002) su pokazali da aldehid-dehidrogenaza iz mitohondrija deluje i kao nitroglicerina-reduktaza, koja pri dejstvu na nitroglicerina oslobađa 1,2-gliceril-dinitrat i nitrit, koji može dalje da se u biološkoj sredini redukuje do azot monoksida.

Nasuprot uobičajenih signalnih molekula, koji svoje dejstvo ostvaruju samo vezivanjem za specifični receptor, NO ostvaruje svoje mnogobrojne efekte preko niza hemijskih reakcija. NO je mali, relativno stabilni slobodno-radikaliski gas koji lako difunduje u ćelije i ćelijske membrane gde reaguje sa svojim molekulskim metama. U vodenoj sredini, u prisustvu kiseonika, njegov poluživot je oko 4 minuta, dok je u biološkim sistemima manje stabilan sa poluživotom do 30 sekundi (Lincoln et al., 1997). Reakcije koje se dešavaju u određenom biološkom okruženju zavise od koncentracije NO i od finih varijacija u sastavu intra- i ekstra-ćelijske sredine (Wink et al., 1996).

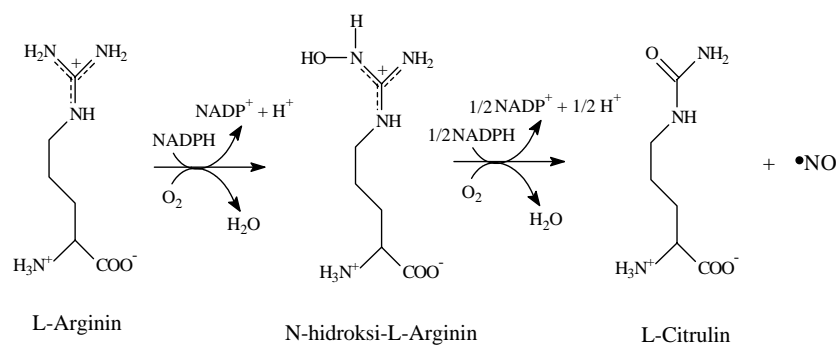
U ovom odeljku dat je kratak osvrt na nastajanje NO u biološkim sistemima, njegove fiziološke i patofiziološke efekte, kao i biohemijske mehanizme njegovog dejstva. Detaljnije će biti reči o hemijskim reakcijama relevantnim za razumevanje bioloških funkcija NO.

2.1 Poreklo NO kojem su izloženi živi sistemi

Ćelije sisara su izložene azot monoksidu endogenog i egzogenog porekla. Endogeni NO nastaje enzimskim i ne-enzimskim reakcijama. Enzimsko nastajanje NO katalizovano je NO-sintazom (NOS), a ne-enzimskim putem NO nastaje iz nitrita u kiseljoj sredini. Pod egzogenim NO podrazumeva se NO prisutan u vazduhu kao zagađivač, na primer iz dima cigareta (Eiserich et al., 1998).

2.1.1 Biosinteza NO

Biosinteza NO je katalizovana klasom enzima poznatim kao NO-sintaze (NOS), koje katalizuju oksidaciju guanidino grupe L-arginina u NO i L-citrulin pomoću kiseonika i NADPH (Slika 2).



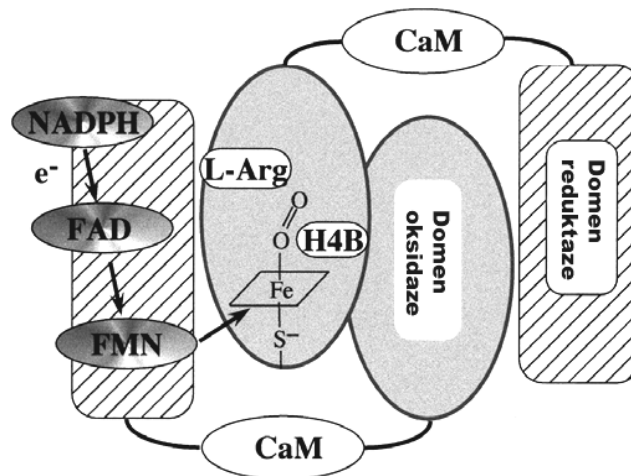
Slika 2. Reakcija katalizovana NO-sintazom (Eiserich et al., 1998).

NOS se javlja u tri izoforme, od kojih su dve, neuronalna NOS (nNOS) i endotelna NOS (eNOS) konstitutivne, a jedna inducibilna (iNOS), indukovana inflamatornim citokinima ili ishemičnim stimulima. Konstitutivne NOS proizvode male koncentracije (nM), za razliku od iNOS koja sintetizuje mikromolarne koncentracije azot monoksida. "Steady state" koncentracija NO u biološkim sistemima kreće se u intervalu 20 nM do 2 μ M (Moncada et al., 1991; McAndrew et al., 1997).

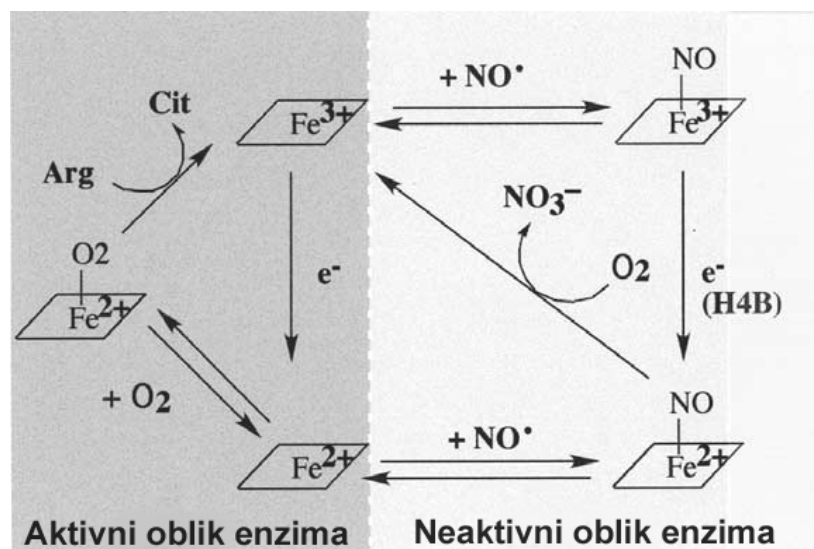
Najmanje tri odvojena gena kodiraju NO sintaze, koji imaju 50-60% homologu sekvencu nukleotida (Nathan, 1992). Geni su locirani na hromozomu 12 (nNOS: 150 kb, 29 eksona), 7 (eNOS: 21-22 kb, 26 eksona) i 17 (iNOS: 37 kb, 26 eksona) (Forstermann & Kleinert, 1995). NOS se javljaju kao membranske i rastvorne izoforme. Tako na primer, ćelije endotela sadrže obe, membranski vezanu i rastvornu izoformu enzima. Jedna od osnovnih razlika između konstitutivnih i inducibilnih izoformi NOS je u mehanizmu regulacije aktivnosti. Konstitutivne izoforme su Ca^{2+} i kalmodulin (CaM) zavisne tako da mogu biti regulisane nivoom intraćelijskog Ca^{2+} . Inducibilna NOS iz makrofaga takođe sadrži CaM. Međutim CaM u ovoj izoformi je tako čvrsto vezan da se smatra enzimskom subjedinicom i stoga enzim nije podložan regulaciji kalcijumom (Fukuto & Mayer, 1996).

Pošto sve izoforme NOS katalizuju istu reakciju, nije iznenađujuće da sve pokazuju slične zahteve u odnosu na kofaktore i prostetične grupe. Obe, cNOS i iNOS zahtevaju NADPH, O_2 i tetrahidrobiopterin (H4B), a sadrže FAD i FMN. Sve NOS sadrže hem i pokazuju sličnost sa dobro poznatom familijom hemoproteina, citohromima P450. Kao i kod citohroma P450, aksijalni tiolatni ligand iz molekula NOS učestvuje u vezivanju hema. Aktivni oblik NOS je homodimer sastavljen od monomera molekulskih masa 130-155 kDa. Inaktivni monomerni oblik zadržava sposobnost vezivanja CaM, FAD i FMN, ali ne sadrži hem i H4B. Aktivni, dimerni protein sadrži sve navedene komponente, a hem, H4B i arginin promotiraju dimerizaciju, što ukazuje da oni pored uloge u katalizi imaju i ulogu u stabilizaciji aktivnog proteina (Klatt et al., 1996). Šematski prikaz strukture monomera NOS dat je na slici 3.

Aktivnost NOS je kontrolisana i negativnom povratnom spregom sa azot monoksidom (Slika 4) (Alderton et al., 2001). Smatra se da se veći deo NOS u biološkim sistemima nalazi kao stabilan kompleks u kojem je NO vezan za hem u molekulu enzima (Abu-Soud et al., 2000; Adak et al., 2000).



Slika 3. Šematski prikaz strukture monomera NOS. U C-terminalnom delu molekula enzima nalazi se domen NOS-reduktaze (koji sadrži mesta za vezivanje CaM, FAD, FMN i NADPH) i domen NOS oksidaze. U N-terminalnom delu molekula enzima nalazi se hem i mesto za vezivanje tetrahidrobiopterina. CaM-vezujuće mesto je locirano između ova dva domena (Sagami et al., 2002).



Slika 4. Pretpostavljena šema kontrole aktivnosti NOS negativnom povratnom spregom sa NO (Sagami et al., 2002).

Pod posebnim uslovima, kao što je nedostatak arginina ili tetrahidrobiopterina, ili u prisustvu adriamicina, NOS mogu da redukuju O_2 do $O_2^{\cdot-}$, što može da ima za posledicu generisanje peroksinitrita (Odeljak 2.4.2) (Xia & Zweier, 1997).

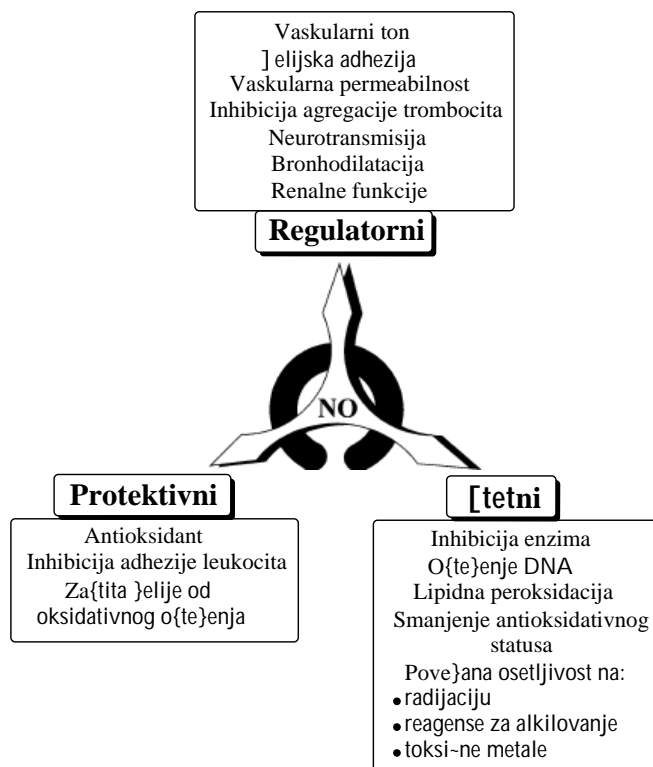
2.1.2 Ne-enzimsko nastajanje azot monoksida

Azot monoksid može nastati *in vivo* direktnom redukcijom nitrita u kiseljoj sredini. Ovaj proces je od značaja u želucu, u kojem je pH

nisko (2,5 - 4,5 za vreme digestije), a koncentracija nitrita visoka (do 1 mM) (McKnight et al., 1997). Azot monoksid nastaje iz nitrita u ishemijski srca što se pretpostavlja da dovodi do oštećenje miokarda i gubitka kontraktilne funkcije srca (Zweier et al., 1995). Azot monoksid nastao iz nitrita može učestvovati u inflamatornim reakcijama, nezavisno od aktivacije NOS (Eiserich et al., 1998).

2.2 Fiziološke i patofiziološke uloge NO

Otkriće endogene sinteze NO u biološkim sistemima dovelo je do pitanja: "Koja je uloga ovog slobodnog radikala u raznim biološkim procesima?". Iznenadujuće, ovaj dvoatomni slobodni radikal, kako je pokazano, ima krucijalnu ulogu u homeostatskoj regulaciji kardiovaskularnog, nervnog i imunog sistema, dok pri povećanoj produkciji NO izaziva toksične efekte (Slika 5). Toksičnost NO se reflektuje u iniciranju hroničnih inflamatornih bolesti, septičnog i hemoragičnog šoka i niz autoimunih bolesti (Ignarro, 1989b; Moncada et al., 1991; Culotta & Koshland, 1992; Loscalzo & Welch, 1995; Nathan, 1997; Grisham et al., 1998; Hierholzer et al., 1998; Palombella et al., 1998).



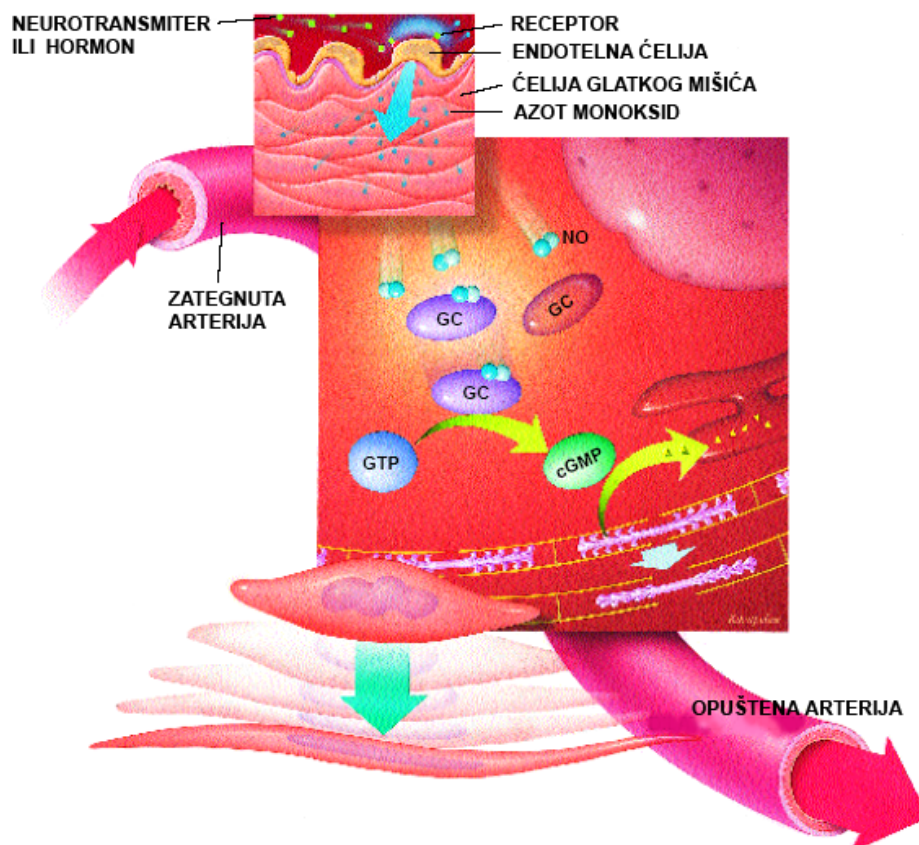
Slika 5. Primeri regulatornih, protektivnih i štetnih bioloških efekata azot monoksida (Wink & Mitchell, 1998a).

2.2.1 Fiziološke uloge NO

U ovom odeljku ukratko ćemo se osvrnuti na osnovne fiziološke uloge NO u kardiovaskularnom, imunom i nervnom sistemu.

Uloge NO u vaskularnom sistemu

Furchgott & Zawadzki (1980) su prvi pokazali konstrikciono dejstvo acetilholina na vaskularne glatke mišiće. Faktor odgovoran za acetilholin-stimulisanu relaksaciju je nazvan opuštajući faktor nastao iz endotela (engl. "Endotel Derived Relaxing Factor" - EDRF). Mnogobrojna kasnija istraživanja su pokazala da endotel arterija oslobađa NO, te da je EDRF ustvari azot monoksid (Ignarro, 1989a; Moncada & Higgs, 1993; Arnal et al., 1999). Mehanizam vazodilatatornog dejstva azot monoksida prikazan je na slici 6 (Moncada et al., 1991; Cannon, 1998).



Slika 6. Vazodilatatorno dejstvo NO: vezivanje neurotransmitera ili hormona za receptore na endotelnim ćelijama arterije izaziva sintezu azot monoksida. NO iz endotela arterija difunduje do ćelija glatkih mišića, vezuje se za guanilat ciklazu, aktivira je, što dovodi do sinteze cGMP. Posle kaskade ćelijskih reakcija (žuto-zelene strelice) ćelije glatkih mišića se opuštaju, što olakšava protok krvi.

Azot monoksid sprečava adheziju trombocita i leukocita za endotel krvnih sudova, inhibira agregaciju trombocita i indukuje disocijaciju agregiranih trombocita (Radomski et al., 1996). Visoke koncentracije azot monoksida inhibiraju proliferaciju ćelija glatkih mišića i mogu indukovati apoptozu (Chung et al., 2001). Nedostatak azot monoksida izaziva ubrzanu aterogenezu u životinja (Cayatte et al., 1994; Naruse et al., 1994; Huang et al., 1996).

Uloge NO u imunom sistemu

Jedan od glavnih izvora inducibilne produkcije NO su makrofage. Povećan nivo azot monoksida prati infekcije i inflamatorne bolesti (Cross et al., 1994), autoimune procese (Cross et al., 1994; Tilton et al., 1994), tumore i transplantaciju antigena (Lejeune et al., 1994; Ioannidis et al., 1995). Azot monoksid je efektor citotoksičnih molekula odgovornih za makrofagama-posredovanu citotoksičnost (Hibbs et al., 1988). Prekomerna produkcija azot monoksida dovodi do "down" regulacije sistemskog imuniteta u nosiocima tumora, i u životinja sa autoimunim i inflamatornim bolestima (Cowden et al., 1998; Hegardt et al., 2000). Kako makrofage mogu modulirati ćelijsku proliferaciju mitogenih ili antigen-stimulisanih limfocita, NO se smatra za imunoregulatorni molekul u ovim sistemima (Mills, 1991; van der Veen et al., 2000).

U modelima transplantacije bubrega, povećana koncentracija NO je detektovana za vreme odbacivanja bubrega (Ioannidis et al., 1995; Worrall et al., 1996). Citokinom aktivirane makrofage odbačenih bubrega se smatraju glavnim izvorom azot monoksida (Langrehr et al., 1993). Na ulogu azot monoksida u transplantaciji ukazuje činjenica da reakcije odbacivanja mogu biti ublažene tretiranjem bubrega inhibitorima iNOS ili NO sakupljačima (Worrall et al., 1995; Roza et al., 2000).

Uloge NO u nervnom sistemu

Eksperimentalni rezultati ukazuju da NO ima ulogu u nekim vrstama učenja, kao što je prostorno učenje. Tako su Ohno i saradnici (1993) pokazali da kod pacova kojima je intrahipokampalno ubrizgan inhibitor NOS, N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), dolazi do poremećaja pamćenja. Böhme i saradnici (1993) su kod pacova

tretiranih N-nitro-L-argininom (L-NARG) zapazili deficit u pamćenju prostornih relacija i mirisa (Hölscher, et al., 1996).

Uloga nNOS u perifernom ili centralnom nervnom sistemu u mehanizmu bola nije detaljno okarakterisana, ali na ulogu NO u ovim procesima ukazuje činjenica da bradikinin indukuje vaskularni bol koji slabi u prisustvu inhibitora nNOS, ili u prisustvu nespecifičnih inhibitora guanilat ciklaze (Holthusen & Ding, 1997).

2.2.2 Uloge NO u patofiziološkim procesima

Azot monoksid se povezuje sa nizom patoloških stanja. Može se reći da danas svaka grana medicine istražuje ulogu NO u svakom tkivu i organu (Wink et al., 1996). Za neka patološka stanja, kao na primer kod kardiovaskularnih poremećaja, karakteristična je smanjena produkcija NO, dok je povećana kod bolesti kao što su artritis, kancer, dijabetes, razni neurološki poremećaji i neurodegenerativna oboljenja, kao što su Parkinsonova, Alchajmerova bolest i amiotrofična lateralna skleroza (Lipton, 1999; Urushitani & Shimohama, 2001; Leong et al., 2002).

Poznato je da svaki kardiovaskularni faktor rizika - hipertenzija, diabetes, hiper-lipidemija, pušenje - može dovesti do smanjenja bazalne ili stimulisane NO posredovane vazodilatacije (Vallance & Chan, 2001). Mehanizmi redukcije produkcije azot monoksida u kardiovaskularnim bolestima nisu sasvim jasni. Pretpostavlja se da do ovog dolazi usled nedostataka kofaktora eNOS, tetrahidro-biopterina, i/ili usled povećanja koncentracije nekog od endogenih inhibitora NOS (Katusic, 2001). Do smanjenja nivoa NO u krvnim sudovima može doći i zbog oštećenja endotela u uslovima oksidativnog stresa (Cai & Harrison, 2000).

Smanjenje aktivnosti iNOS u imunom sistemu dovodi do povećanja osetljivosti sistema na infekciju, a može i da štiti ćelije od negativnih efekata pojedinih tipova inflamatornih bolesti (MacMicking et al., 1995; Wei et al., 1995).

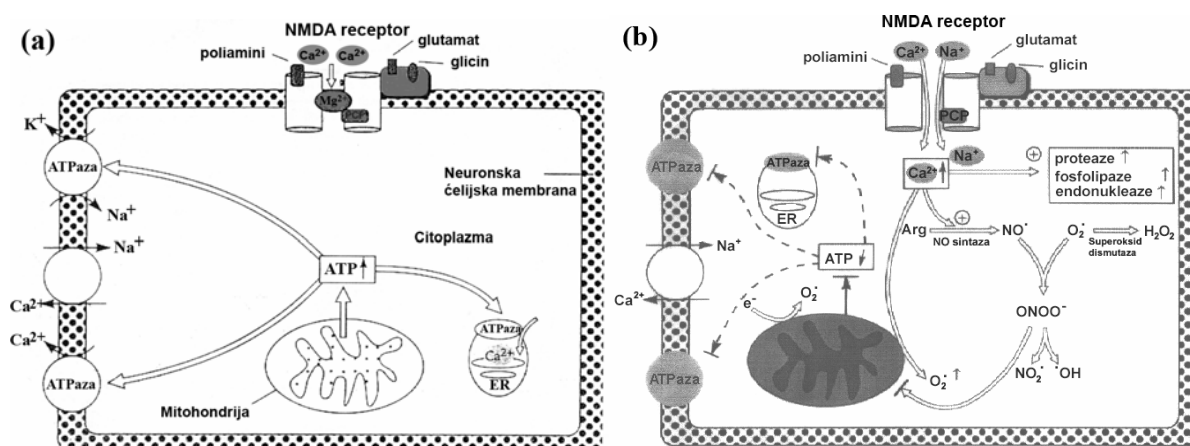
Najviše dokaza za ulogu nNOS u patofiziologiji neuroloških oboljenja prikupljeno je za poremećaje funkcija perifernog nervnog sistema (Vanderwinden et al., 1992). Tako je primećeno da je produkcija azot monoksida smanjena u perifernim neuronima dijabetičnih pacijenata, što pretpostavlja se, doprinosi gastrointestinalnoj, erektilnoj i

vaskularnoj disfunkciji kod ovih pacijenata (Vallance, 2003). Smanjena aktivnost nNOS, usled genetskih promena u strukturi, primećena je kod infantilne stenozе pilorisa (Chung et al., 1996).

Postoje dokazi o indukciji iNOS u pacijenata sa sepsom (Annane et al., 2000). Tako, indukcija iNOS u vaskularnom sistemu predstavlja osnovni mehanizam vaskularnog kolapsa u septičnom šoku (Vallance & Moncada, 1993; Rees, 1995). Indukcija iNOS predstavlja važan patogeni mehanizam u reumatoidnom artritisu, kao i u astmi (Barnes, 1995), oštećenjima kože (Bruch-Gerharz et al., 1998), i u nekim tipovima degenerativnih inflamatornih bolesti CNS. Indukcija iNOS kod čoveka je važan odbrambeni mehanizam u malariji (Kun et al., 2001), a verovatno i u drugim infekcijama određenih organa, kao što su na primer infekcije genitourinarnog trakta (Vallance, 2003).

Uloga NO u neurodegenerativnim bolestima

Patogeneza neurodegenerativnih bolesti, kao što su Parkinsonova, Alchajmerova, multipla skleroza i amiotrofična lateralna skleroza, uključuje i poremećaj funkcije mitohondrija i oksidativni stres (Stewart & Heales, 2003). Sve je više dokaza koji ukazuju na ulogu ekscitotoksičnosti, koja nastaje kao posledica preterane aktivnosti NMDA-receptora u mehanizmima ćelijske smrti i kod akutnih i kod hroničnih neuroloških bolesti (Shulz et al., 1995; Nelson et al., 2003). Aktivacija NMDA receptora dovodi do povećane koncentracije intraćelijskog kalcijuma, što ima za posledicu aktiviranje nNOS (Odeljak 2.1.1). Nastali NO reaguje sa ćelijskim konstituentima (Odeljak 2.3 i 2.4) što može da dovede do inhibicije enzima, oštećenja DNK, smanjenja nivoa GSH, te do nastajanja izuzetno reaktivnog peroksinitrita. U neurodegenerativnim bolestima ekscitotoksičnost se razvija sporo, čak tokom nekoliko godina. Spora ekscitotoksičnost može nastati kao posledica defekta u energetskom metabolizmu, usled poremećaja funkcije mitohondrija. Nemogućnost očuvanja nivoa ATP-a u ćeliji može dovesti do delimične depolarizacije membrane neurona koja ne može da se repolarizuje nakon aktivacije receptora. Ovo dovodi do odvajanja voltažno-zavisnog Mg^{2+} bloka NMDA receptora i neprekidne aktivacije receptora prisutnim glutatomom, što ima za posledicu povećanje nivoa kalcijuma u ćeliji. Povećani nivo kalcijuma u ćeliji može izazvati niz štetnih procesa u ćeliji, uključujući i aktivaciju nNOS (Slika 7) (Shulz et al., 1995; Lodish et al., 1999; Nelson et al., 2003).



Slika 7. NMDA receptor zavisna kaskada ćelijske smrti. (a) ATP koji nastaje u mitohondrijama koristi se u jonskim pumpama koje proizvode i održavaju napon i gradijent jona u membrani neurona, što održava bazalni potencijal. Koncentracija kalcijuma u citoplazmi se održava na nekoliko puta nižem nivou u odnosu na koncentraciju izvan ćelije pomoću ATP-aza, koje mehanizmom aktivnog transporta izbacuju kalcijum u ekstraćelijski prostor ili u intraćelijske organele koje čuvaju kalcijum, kao što je endoplazmatični retikulum (ER). (b) Ekscitotoksičnost može nastati kao posledica defekta u energetskeg metabolizmu. Nedostatak ATP-a dovodi do depolarizacije membrane, posle čega sledi odvajanje voltažno-zavisnog Mg²⁺ bloka NMDA receptora što dovodi do influkse Ca²⁺ i Na⁺. Povećanje koncentracije kalcijuma izaziva aktivaciju kalcijum-zavisnih enzima uključujući i nNOS, što dovodi do povećane sinteze NO. NO može reagovati sa superoksid anjon radikalom pri čemu nastaje peroksinitrit (ONOO⁻). Peroksinitrit može reagovati sa nizom biomolekula, može produkovati nitronijum jone koji mogu nitrovati tirozin, a može pri svom raspadanju dati i reaktivni hidroksilni (OH[•]) radikal (Odeljak 2.4.2) (Schulz et al., 1995b).

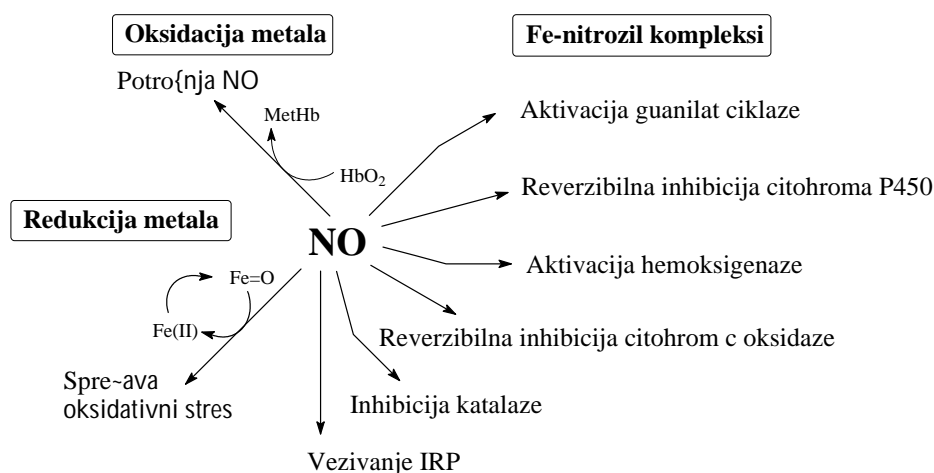
2.3 Biohemijski mehanizmi dejstva NO

Po važećem modelu azot monoksid slobodno difunduje u biološkoj sredini dok ne izreaguje sa nekom od svojih meta (Moncada et al., 1991; Lancaster, 1994; Chen et al., 1998). Reakcije NO sa centrima prelaznih metala predstavljaju jedan od osnovnih mehanizama dejstva NO. Reakcijom sa hemom u guanilat ciklazi NO aktivira ovaj enzim, što ima za posledicu aktiviranje ovog enzima i sintezu cikličnog GMP. NO može da reaguje i sa drugim hemoproteinima, kao i sa jonima gvožđa i drugim prelaznim metalima koji se nalaze u aktivnim centrima proteina, kao i sa takozvanim "slobodnim" gvožđem. Rasprostranjeni biohemijski mehanizam dejstva NO predstavlja S-nitrozovanje (RSNO) SH grupa u određenim proteinima što reguliše njihovu aktivnost. Sve je više dokaza koji ukazuju da se S-nitrozovanje po značaju može porediti sa regulatornim mehanizmom fosforilacije proteina. S-nitrozotiolni pored toga predstavljaju način za odstranjivanje viška NO i za njegovo čuvanje i transport u biološkim sistemima. U uslovima povećane produkcije NO dolazi do nitrovanja ostataka tirozina u proteinima i slobodnog tirozina. Tako, povećani nivo nitrotirozina predstavlja dokaz o povećanoj

produkciji NO u datoj patofiziologiji, a doprinos nitrovanja određenih proteina datim patofiziološkim stanjima intenzivno se izučava.

2.3.1 Reakcije NO sa centrima prelaznih metala u biološkim sistemima

Reakcije azot monoksida sa centrima prelaznih metala u biološkim sistemima predstavljaju centralne mehanizme biološkog dejstva NO. Gvožđe je najzastupljeniji metal u biološkim sistemima (Halliwell & Gutteridge, 1999). Reakcije NO sa gvožđem u hemoproteinima intenzivno su izučavane. Takođe je utvrđeno da u biološkim sistemima NO reaguje sa proteinima u kojima gvožđe nije vezano u obliku hema, kao i sa takozvanim "slobodnim" gvožđem. Primeri biohemijskih efekata reakcije NO sa centrima koji sadrže gvožđe u biološkim sistemima dati su na slici 8. Reakcije NO sa proteinima koji u aktivnom centru sadrže druge jone prelaznih metala, i koji takođe predstavljaju potencijalne mete za NO, mnogo su manje izučavane.



Slika 8. Primeri biohemijskih efekata reakcije NO sa centrima koji sadrže gvožđe u biološkim sistemima (Radi, 1996).

U ovom odeljku prvo ćemo ukratko prikazati reakcije NO sa centrima koji sadrže gvožđe, pri čemu ćemo se posebno osvrnuti na "slobodno" gvožđe i njegove reakcije sa NO, jer je to bio jedan od predmeta izučavanja u ovom radu. Potom ćemo se ukratko osvrnuti na mangan superoksid dismutazu (MnSOD), koja takođe predstavlja potencijalnu metu za NO, što je bio još jedan od predmeta istraživanja u ovom radu.

2.3.1.1 Reakcije NO sa proteinima koji sadrže hem

Azot monoksid ima jedinstvenu osobinu da brzo reaguje sa oba, Fe^{2+} i Fe^{3+} oblika hemoproteina (Wink & Mitchell, 1998a). Reakcija NO sa Fe^{2+} u hemu je brža ($k=10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) od reakcije sa Fe^{3+} oblikom ($k=10^2-10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Sharma et al., 1987). Jednom nagrađen, hem-nitrozil kompleks sporo disosuje, pri čemu je disocijacija Fe^{3+} -hem nitrozil kompleksa brža od disocijacije Fe^{2+} -hem kompleksa (Traylor & Sharma, 1992). NO reaguje brže sa hemoproteinima kao što su hemoglobin, mioglobin i katalaza, u kojima je šesto koordinaciono mesto u hemu slobodno, u odnosu na hemoproteine, kao što je citohrom c, u kojima su zauzeta sva koordinaciona mesta i kod kojih vezivanje NO zahteva oslobađanje jednog liganda. Zbog svega navedenog smatra se da su intraćelijski hemoproteini jedna od primarnih meta za NO *in vivo*.

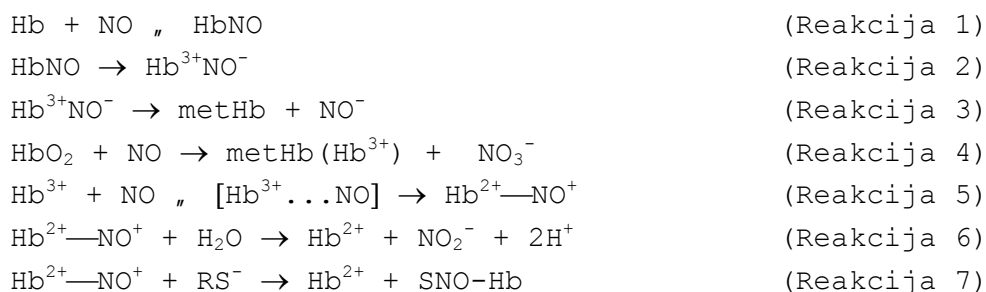
Od hemoproteina čije su reakcije sa NO izučavane na prvom mestu treba pomenuti guanilat ciklazu, ključni enzim u ispoljavanju biološke funkcije NO (Odeljak 2.2.1). Guanilat ciklaza može da se izoluje u obliku sa i bez hema, ali samo oblik koji sadrži hem vezuje NO i poseduje sposobnost da katalizuje sintezu cGMP iz GTP, koji dalje deluje na ciljne molekule: cGMP-zavisne protein kinaze, ciklične nukleotidne kanale i fosfodiesteraze (Ignarro, 1990; Moncada et al., 1991; Beck et al., 1999).

Azot monoksid se reversibilno vezuje za hem u katalazi i tako inhibira njenu aktivnost (Brown, 1995). Azot monoksid reaguje sa citohrom P450 i citohrom c oksidazom (Wink et al., 1993; Wink & Mitchell, 1998a). Reverzibilno vezivanje azot monoksida za hem u citohrom P450 sprečava vezivanje kiseonika i monooksigenaznu aktivnost enzima (Wink et al., 1993; Stadler et al., 1994). Sličan inhibitorni mehanizam nastaje vezivanjem NO za šesto koordinativno mesto hema u citohrom c oksidazi (Wink et al., 1993; Stadler et al., 1994), što (pri malom parcijalnom pritisku kiseonika) ima za posledicu inhibiranje transporta elektrona u mitohondrijama (Cassina & Radi, 1996).

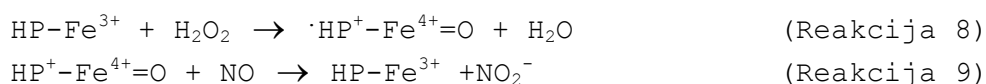
Detaljno poznavanje odnosa strukture i funkcije hemoglobina i mioglobina učinili su ova dva molekula idealnim model-sistemima za izučavanje reakcije NO sa hemoproteinima. Hemoglobin (Hb), oksihemoglobin (HbO_2) i methemoglobin (metHb) pokazuju različite afinitete i reaktivnosti u odnosu na NO. Azot monoksid reaguje sa redukovanim hemoglobinom 5-10 brže od kiseonika, a u odsustvu

kiseonika afinitet NO za hemoglobin je 1500 puta veći od afiniteta CO (Sharma et al., 1987; Kelm & Yoshida, 1996).

Reakcijom NO sa Hb (pod striktno anaerobnim uslovima), nastaje HbNO (Reakcija 1). HbNO može da pređe u metHb, pri čemu se NO redukuje u nitroksil (NO^-) (Reakcije 2 i 3). Reakcijom NO sa HbO_2 nastaje metHb i nitrat (Reakcija 4). Ove reakcije se odvijaju u eritrocitima, a udeo svake od njih zavisiće od odnosa oksihb i Hb. Reakcijom NO sa methemoglobinom (Hb^{3+}), dolazi do redukcije Fe^{3+} iz metHb u Fe^{2+} , te do oksidacije NO u nitrozonijum jon (NO^+) (Reakcija 5). Hidrolizom ovog kompleksa nastaje nitrit (Reakcija 6), a transferom NO^+ na SH grupu iz ostatka cisteina β -93 nastaje S-nitrozotiol SNO-Hb (Reakcija 7) (Jia et al., 1996; Kelm & Yoshida, 1996).



Reakcijom metHb, metMb i nekih citohroma sa vodonik peroksidom nastaje feril π katjon radikal (HP-Fe^{3+}) (Reakcija 8). Azot monoksid može da redukuje ovaj radikal (Reakcija 9), što predstavlja jedan od mehanizama anti-oksidativne zaštite NO (Kanner et al., 1991; Wink & Mitchell, 1998a).



2.3.1.2 Reakcija NO sa gvožđem koje nije u hemu: dinitrozil kompleksi gvožđa

Pored hemoproteina, u biološkim sistemima se nalaze i proteini koji sadrže jone gvožđa čvrsto vezane u aktivnom centru u obliku kompleksa u kojima učestvuju bočni ostaci cisteina i histidina (Lancaster & Hibbs, 1990; Pellat et al., 1990; Drapier et al., 1991; Crichton & Ward, 1992). Za razliku od ovog, čvrsto vezanog gvožđa, jedan (mali) deo (3-5%) jona gvožđa u biološkim sistemima se može ekstrahovati pomoću helatnih agenasa i zato se naziva "slobodno" gvožđe (Halliwell & Gutteridge, 1999; Kruszewski, 2003). Na osnovu

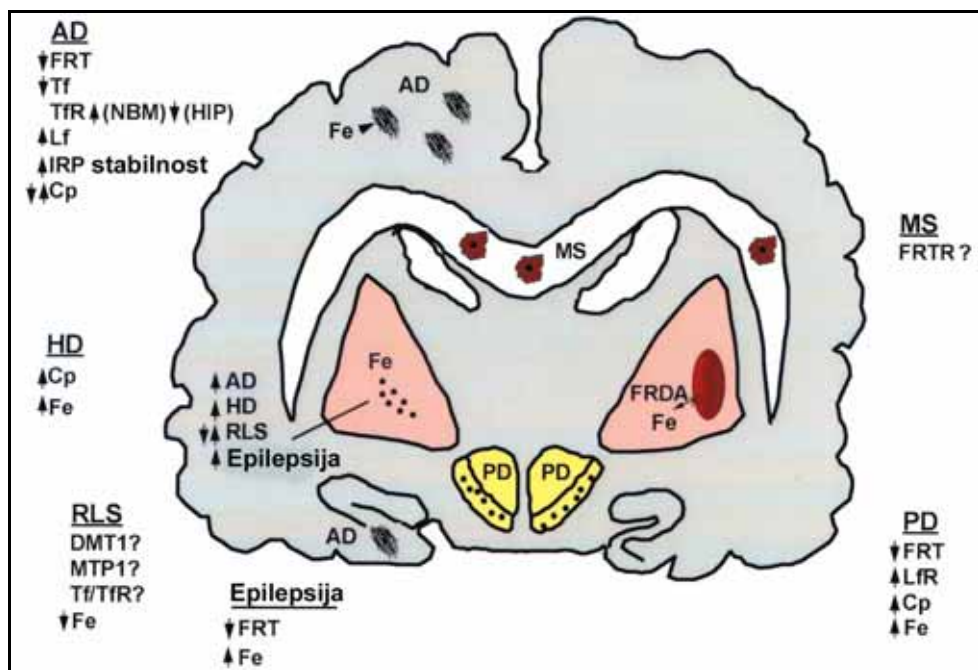
karakterističnih EPR spektara pokazano je da NO reaguje sa gvožđem u proteinima i sa "slobodnim" gvožđem u biološkim sistemima dajući dinitrozil (DNIC) komplekse (od engl. *dinitrosyl iron complex*). U ovom odeljku ćemo se ukratko osvrnuti, prvo na "slobodno" gvožđe u biološkim sistemima, a potom na biohemijske aspekte DNIC, dok će o hemijskim aspektima ovih kompleksa biti više reči u Odeljku 2.4.3.1.

"Slobodno" gvožđe u biološkim sistemima

"Slobodno" gvožđe obuhvata jone Fe^{2+} i Fe^{3+} koji se nalaze u nestabilnim kompleksima sa ligandima male molekulske mase, ili su labilno vezani za proteine (Kakhlon & Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2002). Smatra se da je mokraćna kiselina jedan od najvažnijih liganada za "slobodno" gvožđe u biološkim sistemima (Davies et al., 1986; Halliwell & Gutteridge, 1999). Vrednosti za "slobodno" gvožđe u pojedinim ćelijama, organelama i telesnim tečnostima date su u tabeli 1. Nivo "slobodnog" gvožđa se povećava u nekim oboljenjima, kao i u uslovima oksidativnog stresa (Halliwell & Gutteridge, 1999). Na slici 9 su prikazane promene u koncentraciji gvožđa u mozgu pacijenata obolelih od raznih neuroloških i neurodegenerativnih oboljenja.

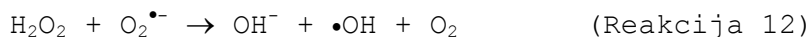
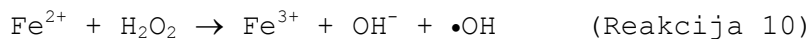
Tabela 1. Sadržaj "slobodnog" gvožđa u pojedinim ćelijama, organelama i telesnim tečnostima.

	"Slobodno" gvožđe (μM)	Referenca
Mijeloidne ćelije	0,9 - 2,1	Epsztejn et al., 1997
Humani limfociti	0,71 \pm 0,85	Gackowski et al., 2002
Hepatociti pacova	5,0 \pm 2,0	Petrat et al., 2001
Jedro hepatocita pacova	6,6 \pm 2,9	Petrat et al., 2001
Jedro endotelnih ćelija pacova	11,8 \pm 3,9	Lai et al., 1996
Mitohondrije hepatocita pacova	4,8 \pm 2,3	Petrat et al., 2001
Mitohondrije endotelnih ćelija pacova	9,2 \pm 2,7	Petrat et al., 2001
Endozomi/Lizozomi	15,8 \pm 4,1	Lipinski et al., 2000
Humani znoj	4,6 \pm 3,0	Gutteridge et al., 1985
Pljuvačka	6,61 \pm 2,35	Skurk et al., 1974
Želudačni sok	2,75 \pm 1,24	Wynter & Williams, 1974
Žuč	15 \pm 11	Green et al., 1968
Sinovijalna tečnost	5,19 \pm 5,12	Niedermeier & Griggs, 1971
Cerebrospinalna tečnost	0,8 \pm 0,4	Bleijenberg et al., 1971



Slika 9. Šematski prikaz mozga sa regionima gde postoji promena u koncentraciji gvožđa i proteina koji sadrže gvožđe u raznim neurološkim i neurodegenerativnim bolestima. Skraćenice: AD (Alchajmerova bolest), Cr (Ceruloplazmin), DMT1 (divalentni metal transporter 1), FRDA (Fridrihiva ataksia), FRT (Feritin), FRTR (Feritin receptor), HD (Huntingtonova bolest), IRP (gvožđe regulatorni proteini), Lf (Laktoferin), LfR (Laktoferin receptor), MS (Multipla skleroza), MTP1 (metal transporter protein), PD (Parkinsonova bolest), RLS (Restlesov sindrom), Tf (Transferin), TfR (Transferin receptor) (Thompson et al., 2001).

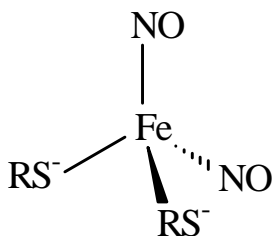
"Slobodno" gvožđe predstavlja izvor jona gvožđa za Fentonovu reakciju (Halliwell & Gutteridge, 1999): reakcijom sa H_2O_2 Fe^{2+} katalizuje nastajanje vrlo reaktivnog hidroksil radikala (Reakcija 10). Oksidovani metal se redukuje ćelijskim reduktivnim ekvivalentima, kao što je superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), (Reakcija 11). Ukupna reakcija, koja se naziva Haber-Weiss reakcija (Reakcija 12), odigrava se i bez prisustva jona gvožđa, ali znatno sporije.



Hidroksilni radikal reaguje sa ćelijskim komponentama (DNK, RNK, proteini), što dovodi do njihovog oštećenja (Henle et al., 1996; McCord 1998; Emerit et al., 2001). Centralni nervni sistem je naročito pogodan za oštećenja izazvana reaktivnim kiseoničnim vrstama (Hazel & Williams, 1990; Benzi & Moretti, 1995; Cooper, 1997). Mnoga istraživanja ukazuju na značaj oksidativnih oštećenja u neurodegenerativnim bolestima, kao i na ulogu redoks-aktivnog gvožđa u ovim procesima (Sayre et al., 1999).

Dinitrozil kompleksi gvožđa (DNIC) u biološkim sistemima

Dinitrozil kompleksi gvožđa tipa $\text{Fe(I)(NO)}_2(\text{RS}^-)_2$ (Slika 10) detektovani su primenom EPR tehnike u uslovima povećane produkcije NO u mnogim biološkim sistemima kao što su: makrofage, tumori, ćelije jetre, ćelije glatkih mišića i pankreasa (Vithayathil et al., 1965; Henry et al., 1991; Henry & Singel, 1996; Shergill et al., 1996; Singel & Lancaster, 1996; Henry et al., 1997; Kim et al., 2000). Tiolni ligandi u ovim kompleksima potiču iz SH grupa proteina, što je zaključeno na osnovu sličnosti ovih EPR spektara sa EPR spektrima paramagnetičnih DNIC sa tiolnim ligandima male molekulske mase (cistein, GSH), dobijenih u zamrznutom stanju. Pored SH grupa i ostaci histidina u proteinima mogu da učestvuju kao ligandi u DNIC kompleksima (Singel & Lancaster, 1996).



Slika 10. Struktura paramagnetičnog DNIC sa tiolima, $\text{Fe(I)(NO)}_2(\text{RS}^-)_2$ kompleksa.

Pored DNIC sa proteinima koji sadrže gvožđe u aktivnom mestu, u biološkim sistemima su detektovani i DNIC sa "slobodnim" gvožđem (Gorbunov et al., 1997; Sergent et al., 1997; Kim et al., 2000; Kagan et al., 2001; Vanin et al., 2001) i tiolima male molekulske mase (Vanin, 1998). U nekim biološkim sistemima "slobodno" gvožđe predstavlja glavni izvor DNIC kompleksa (Kim et al., 2000; Alencar et al., 2003).

Detektovanje DNIC u biološkim sistemima može da služi kao monitor produkcije azot monoksida, posebno u uslovima njegove povećane produkcije, do koje dolazi nakon izlaganja biološkog sistema određenim stimulansima (Singel & Lancaster, 1996). Međutim, na osnovu činjenice da se DNIC kompleksi tako često javljaju u biološkim sistemima izloženim NO, može se pretpostaviti da oni mogu imati i značajne biološke funkcije. Pomenućemo neke od njih.

DNIC vezani za proteine su mnogo stabilniji od DNIC male molekulske mase (Odeljak 2.4.3.1). Tako je predloženo da NO, koji nastaje ili deluje u vaskularnim ćelijama, može da se stabilizuje i čuva u obliku proteinskog DNIC, iz kojeg dejstvom intra- i ekstraćelijskih

tiola oslobađa u obliku DNIC male molekulske mase (Mulsch et al., 1991; Mulsch, 1994; Muller et al., 1996; Vanin, 1998; Muller et al., 2002).

NO grupe u DNIC male molekulske mase imaju karakter nitrozonijum (NO^+) jona koji mogu da S-nitroziluju tiolna jedinjenja, pri čemu nastaju S-nitrozotiooli (RSNO) (Odeljak 2.3.2). Predloženo je da međusobna transformacija DNIC kompleksa i RSNO, koja je regulisana nivoom gvožđa, tiola i NO, omogućuje transport NO u ćelijama i tkivima (Vanin, 1998). Najnovija istraživanja pokazuju da DNIC nastali iz "slobodnog" gvožđa imaju sposobnost da izvrše S-nitrozovanje određenih proteina, kao što su kaspaze, što inhibira NO-posredovanu apoptozu (Kim et al., 2000).

Nastajanje DNIC kompleksa sa "slobodnim" gvoždem sprečava katalitičke prooksidativne reakcije "slobodnog" gvožđa, što predstavlja jedan od anti-oksidativnih mehanizama NO (Gorbunov et al., 1997; Sergent et al., 1997; Kagan et al., 2001; Vanin et al., 2001).

2.3.1.3 MnSOD: osvrt na strukturu, funkciju i potencijalnu ulogu u metabolizmu NO

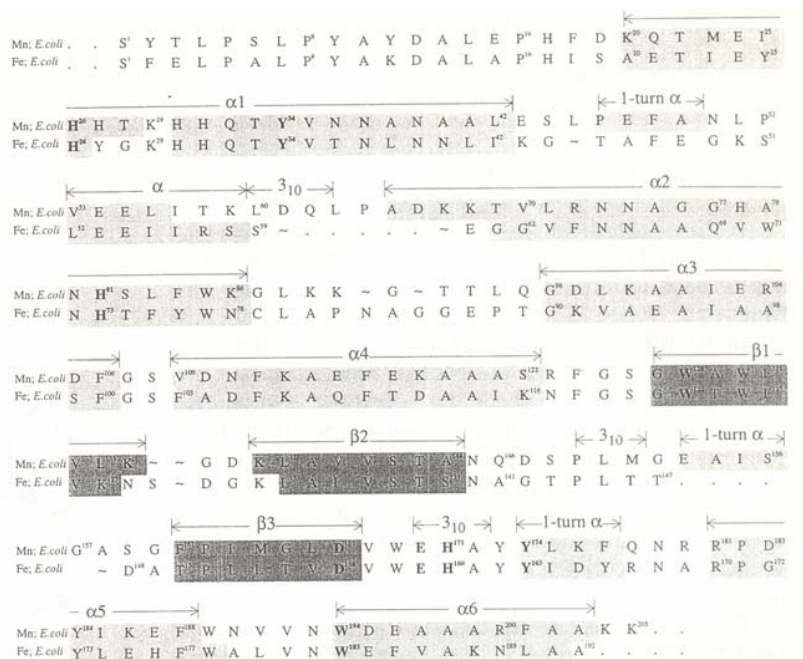
Superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nastaje kao sporedni proizvod u normalnom aerobnom metabolizmu, a njegova produkcija može biti povećana u raznim patološkim stanjima. Uloga enzima superoksid dismutaze (SOD), je da katalizuje disproporcionisanje superoksid anjon radikala u kiseonik i vodonik peroksid (Reakcija 13) (Fridovich, 1983; Fridovich, 1986).



Postoje tri osnovna tipa superoksid dismutaza: Cu/Zn-superoksid dismutaza, koja se primarno javlja u eukariotama, FeSOD koja se javlja u prokariotama i MnSOD koja se nalazi u prokariotama i u mitohondrijama eukariota (Beyer et al., 1991). Najveći deo superoksid anjon radikala nastaje u mitohondrijama, tako da MnSOD ima ključnu ulogu u detoksifikaciji ćelije od ove reaktivne vrste (Turrens et al., 1982; Boveris, 1984). Značaj MnSOD se vidi iz eksperimenata sa pacovima u kojima je pokazano da je MnSOD, za razliku od Cu/ZnSOD, neophodna za život. Nedostatak Cu/ZnSOD je izazivao poremećaje samo u slučaju traumatskih oštećenja, dok u

odsustvu MnSOD pacovi nisu mogli da prežive duže od tri nedelje (Li et al., 1995; Reaume et al., 1996). U eksperimentima sa pacovima je takođe pokazano da smanjena aktivnost MnSOD dovodi do patoloških promena u nizu organa, kao što je oštećenje miokarda, masna jetra i anemija, kao i do lipidne peroksidacije i oštećenja mitohondrija (Melov et al., 1999).

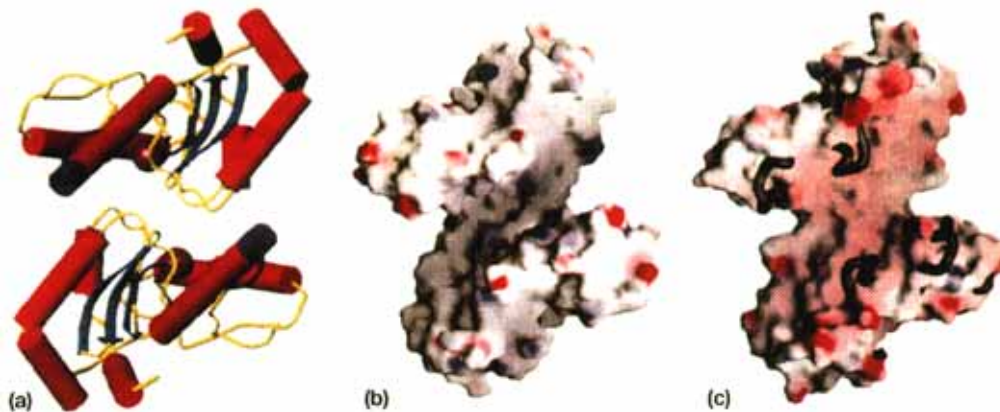
FeSOD (*E.coli*) je konstitutivni enzim, dok je ekspresija MnSOD (*E.coli*) inducibilna i nastaje kao odgovor na oksidativni stres (Hopkin et al., 1992). MnSOD iz raznih organizama, kao i MnSOD i FeSOD iz prokariota su strukturni homolozi, sasvim različite strukture od enzima Cu/ZnSOD (Tainer et al., 1982). MnSOD i FeSOD iz *E.coli* pokazuju 45% identičnu aminokiselinsku sekvencu (Slika 11). FeSOD (*P.leiognathi*) pokazuje 74% identičnu sekvencu sa FeSOD (*E.coli*), a 40% sa MnSOD (*E.coli*) (Parker & Blake, 1988). Enzim je stabilan u intervalu pH od 6 do 10, isto kao i FeSOD (*E.coli*) (Lavelle et al., 1977).



Slika 11. Poređenje sekvenci MnSOD (*E.coli*) i FeSOD (*E.coli*). Konzervativni delovi sekvence su zatamnjeni (Edwards et al., 1998).

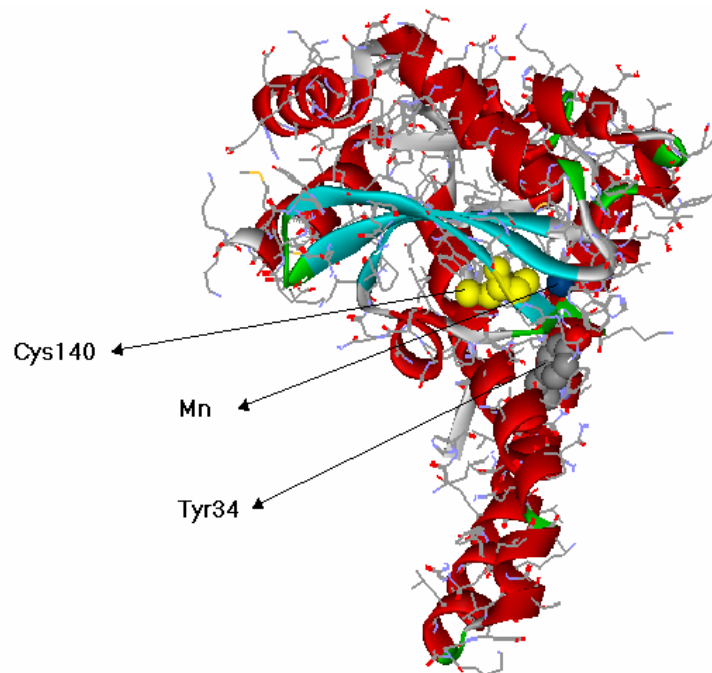
MnSOD i FeSOD (*E.coli*) su homodimeri slične trodimenzionalne strukture (Slika 12). Relativna molekulska masa subjedinice iznosi 21100 Da (FeSOD) i 22900 Da (MnSOD). Značajna razlika u strukturi između MnSOD i FeSOD (*E.coli*) može se zapaziti u brazdi između monomera (Slika 12). Površina ove brazde u MnSOD je komplementarna sa površinom dvostrukog heliksa DNK. Konstanta vezivanja MnSOD za

dezoksioligonukleotide veća je ~ 200 puta od konstante vezivanja za FeSOD. Zato se pretpostavlja da je funkcija MnSOD da štiti DNK u *E.coli* od oksidativnih oštećenja (Edwards et al., 1998).



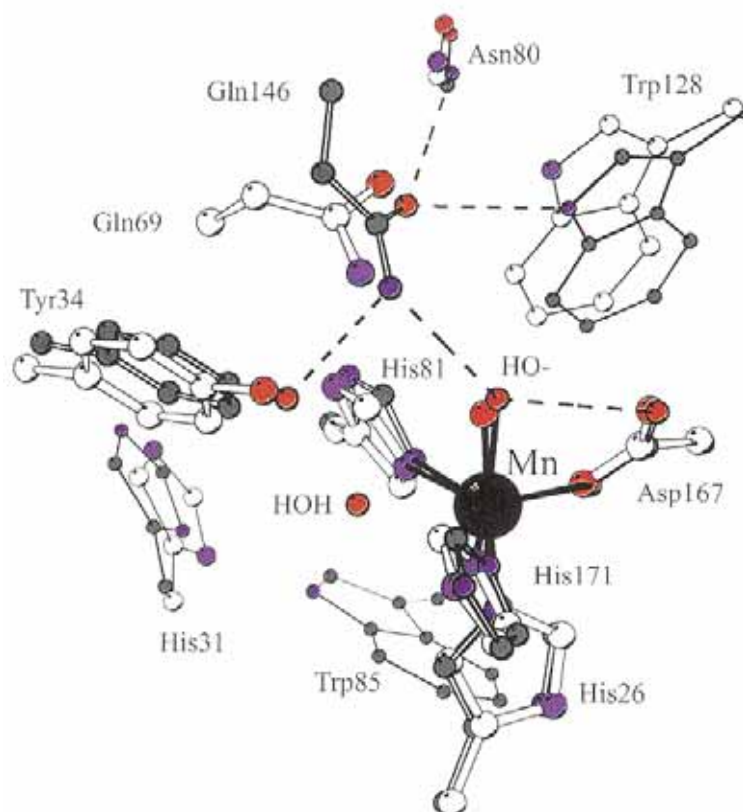
Slika 12. Poređenje površina i interakcija između *E.coli* FeSOD i MnSOD. (a) Sekundarna struktura MnSOD sa orijentacijom subjedinica. Četiri ekstra regiona u odnosu na FeSOD su obojena tamno plavom bojom. (b) model ispunjenih sfera MnSOD. (c) model ispunjenih sfera FeSOD preklopljen sa modelom MnSOD. Četiri ekstra regiona prisutnih u MnSOD (obojena crno) su prikazana kao α niz ispupčen na svakoj strani brazde dimera (Edwards et al., 1998).

Humana MnSOD je homotetramer (96 KDa). Struktura jedne subjedinice prikazana je na slici 13. Tetramerna forma stabilizuje konformaciju heliksa koji sadrže histidinske ostatke (His26 i His74) koji se nalaze u blizini aktivnog mesta enzima (Slika 14). Disocijacija u dimere čini ove helikse mobilnijim, pri čemu se narušava geometrija liganada i smanjuje aktivnost enzima (Borgstahl et al., 1996).



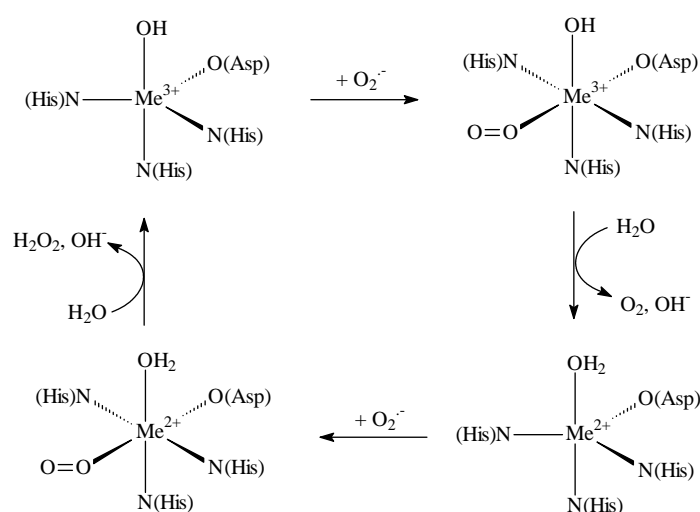
Slika 13. Trodimenziona struktura subjedinice humane MnSOD iz mitohondrija. Aminokiselinski ostatak Cys140 obojen je žuto, Tyr34 sivo, a jon mangana ljubičasto (Slika je dobijena PC programom "DS Viewer Pro 5" od podataka iz baze "SwissPDB").

MnSOD i FeSOD imaju slična aktivna mesta, u kojima je metalni jon koordinovan sa bočnim ostacima histidina i asparaginske kiseline (3 His i 1 Asp), u obliku trigonalne bipiramide (Slika 14).



Slika 14. Prikaz aktivnog centra MnSOD (*E.coli*) i FeSOD (*E.coli*). Struktura FeSOD (*E.coli*) je nacrtana belim, a struktura MnSOD (*E.coli*) tamnim linijama. Atomi kiseonika su obojeni crvenom, a azota plavom bojom (Edwards et al., 1998).

Katalitički mehanizam dismutacije superoksid anjon radikala (Slika 15) uključuje smenjivanje oksidacionog stanja metalnog jona između 3+ i 2+ stanja (Lavelle et al., 1977; McAdam et al., 1977).



Slika 15. Mehanizam dismutacije O_2^- enzima MnSOD i FeSOD (Lah et al., 1995). $Me^{2+,3+}$ označava $Fe^{2+,3+}$ ili $Mn^{2+,3+}$.

Sve je više dokaza koji ukazuju na prisustvo NO u mitohondrijama. Mitohondrije se nalaze 1-2 mikrona udaljene od ćelija endotela, tako da se može pretpostaviti da NO, koji nastaje u ćelijama endotela (Odeljak 2.2.1), može da difunduje do mitohondrija. Pored toga, imunohemijskim tehnikama detektovana je NOS u mitohondrijama (mtNOS). Smatra se da NO, koji nastaje kao rezultat aktivnosti mtNOS, modulira metabolizam i proizvodnju slobodnih radikala u mitohondrijama (MacMillan-Crow & Crow, 2001).

U uslovima povećane produkcije NO pokazano je da NO reaguje sa nizom enzima iz respiratornog lanca koji sadrže gvožđe u aktivnom mestu, dajući DNIC komplekse, što ima za posledicu smanjenje njihove aktivnosti (Henry & Singel, 1996). *In vitro* ispitivanja na humanoj rekombinantnoj MnSOD su pokazala da NO izaziva neznatno smanjenje njene aktivnosti, dok peroksinitrit koji može da nastane u reakciji NO i superoksid anjon radikala (Odeljak 2.4.2) izaziva nitrovanje i oksidaciju (u ditirozin) ostataka tirozina (Odeljak 2.4.4), što ima za posledicu agregiranje i inaktiviranje enzima (MacMillan-Crow et al., 1998). Primećeno je da se najbrže nitruje ostatak Tyr34 koji se nalazi u blizini aktivnog centra enzima (5Å udaljen od jona mangana). Slični efekti peroksinitrita primećeni su i u odnosu na *E.coli* MnSOD (Ischiropoulos et al., 1992; Yamakura et al., 1998; Quijano et al., 2001).

Agregacija, nitrovanje i inaktivacija MnSOD nađena je u raznim oboljenjima za koja je karakterističan oksidativni stres i povećana produkcija NO (MacMillan-Crow & Cruthirds, 2001). Smanjenje aktivnosti MnSOD može narušiti energetske metabolizam u mitohondrijama (Radi et al., 1994) i inicirati apoptotičnu ćelijsku smrt (Ghafourifar et al., 1999; Friedlander, 2003). Na osnovu napred opisanih rezultata *in vitro* eksperimenata, pretpostavlja se da peroksinitrit izaziva navedene modifikacije i pri *in vivo* uslovima (MacMillan-Crow & Cruthirds, 2001).

2.3.2 S-nitrozilovanje

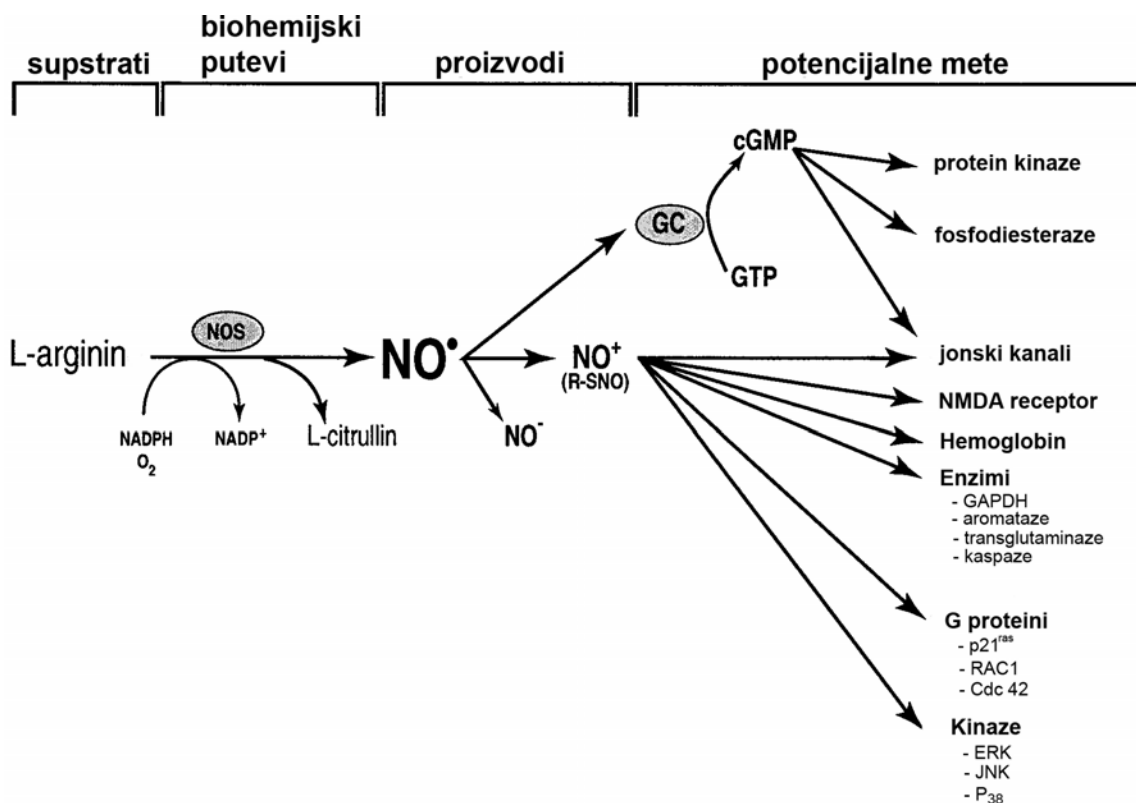
S-nitrozilovanje ili S-nitrozovanje predstavlja hemijsku reakciju transfera NO⁺ ekvivalenta (Odeljak 2.4.3.2) na slobodne -SH grupe u molekulima proteina ili tiola male molekulske mase, pri čemu nastaju nitrozotiol (RSNO). Sinteza i svojstva nitrozotiola, reakcije koje vode do nastajanja NO⁺ vrsta, kao i reakcije u kojima NO grupa

prelazi sa jednih na druge tiole (transnitrozovanje) intenzivno se izučavaju (Odeljak 2.4.3.2).

Kako se postiže specifičnost S-nitrozilovanja proteina nije još uvek sasvim jasno. Na osnovu pretraživanja velike baze podataka predložen je konzensus motiv XYCZ, gde je X: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn ili Gln, Y: Lys, Arg, His, Asp ili Glu, a Z: Asp ili Glu (Stamler et al., 1997). Specifičnost S-nitrozilovanja proteina može se postići i subćelijskom lokacijom NOS, koje mogu biti u blizini potencijalne mete, kao i lokalnom hemijskom okolinom datog proteina (na primer lokalna koncentracija NO i molekula, kao što je $O_2^{\cdot-}$, koji mogu da reaguju sa NO dajući RNOS, prisustvo hemoproteina i drugih centara prelaznih metala) (Davis et al., 2001).

S-nitrozilovanje i denitrozovanje može da indukuje promenu konformacije molekula proteina i/ili pristup supstratu, što se smatra za osnov regulatornog mehanizma ove kovalentne modifikacije (Stamler, 1994; Eiserich et al., 1998; Stamler et al., 2001).

Smatra se da je S-nitrozilovanje široko rasprostranjena post-translaciona modifikacija, te da ima niz zajedničkih osobina sa fosforilacijom (Broillet, 1999). Fosforilacija predstavlja kovalentno vezivanje fosfata za aminokiselinske ostatke serina, treonina ili tirozina, dok S-nitrozilovanje predstavlja kovalentno vezivanje NO za SH grupe proteina. S-nitrozovanje određenih SH grupa u molekulu proteina može predstavljati redoks signal, ili može, reakcijom trans-nitrozovanja, doći do transfera NO na -SH grupe drugih proteina u datom signalnom putu. Proteini čija se aktivnost reguliše ovim modifikacijama mogu u oba slučaja biti prekidači, ili komponente kompleksnih signalnih puteva. To mogu biti enzimi, G proteini, transkripcioni faktori, transporter i jonski kanali (Slika 16).

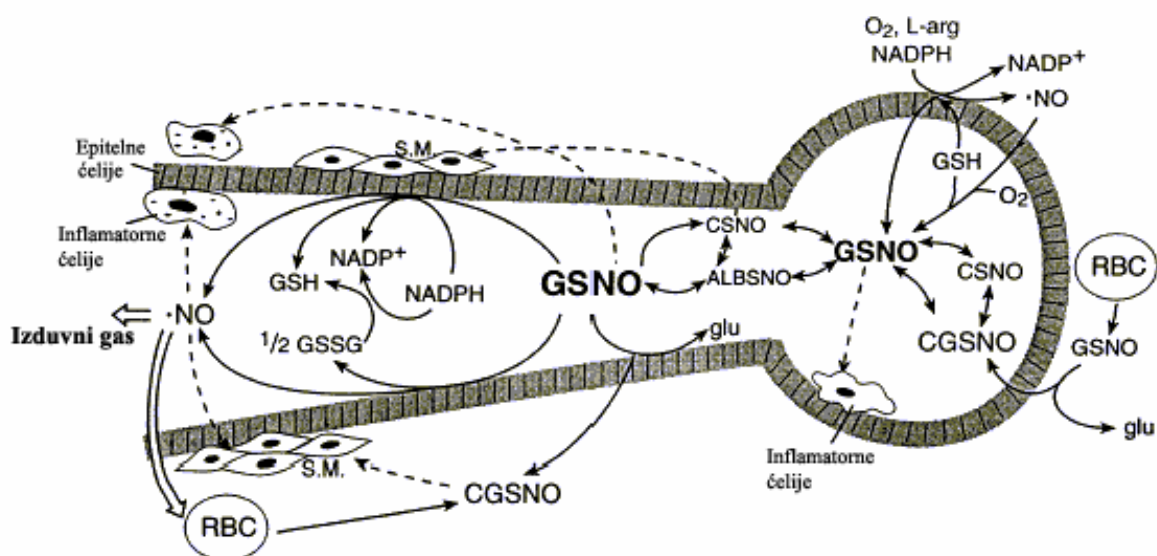


Slika 16. Primeri proteina čija je aktivnost regulisana S-nitrozilovanjem. Jednom nastala nitrozilujuća (NO^+) vrsta može da aktivira S-nitrozilovanjem niz proteina, bilo direktno, ili trans-nitrozilovanjem, pomoću nastalih nitrozotiola (RSNO) (Broillet, 1999).

Pomenimo da S-nitrozilovanje određenih -SH grupa u NMDA receptoru smanjuje aktivnost receptora, što ima protektivnu ulogu u NMDA-indukovanoj citotoksičnosti (Odeljak 2.2.2) (Lipton et al., 1993). S-nitrozovanje kaspaze smanjuje aktivnost enzima i sprečava apoptotičnu smrt ćelije (Khan et al., 1997; Kim et al., 1997; Mannick et al., 1997). S druge strane, S-nitrozilovanje kompleksa I u mitohondrijama inhibira ćelijsko disanje (Clementi et al., 1998). S-nitrozilovanjem se reguliše i aktivnost kalcijumovih kanala (Campbell et al., 1996; Hu et al., 1997; Stoyanovsky et al., 1997; Xu et al., 1998). Mali GTP-vezujući protein p21^{ras} se takođe aktivira S-nitrozilovanjem, što dovodi do modulacije MAP kinazne kaskade (Lander et al., 1996) i ćelijskog specifičnog odgovora apoptoze (Beck et al., 1999). S-nitrozilovanje učestvuje u transdukciji signala i u prokariotama. Tako, analogno oksidativnom stresu, nitrozativni stres u *E.coli* aktivira S-nitrozilovanjem transkripcionog faktora OxyR, (Hausladen et al., 1996).

Najviše zastupljeni S-nitrozilovani protein do sada detektovan je S-nitrozoalbumin u plazmi sisara. Ukupna koncentracija RSNO u plazmi iznosi oko 1 μM , nasuprot koncentraciji slobodnog NO koja iznosi približno samo oko 3 nM. S-nitrozoalbumin iznosi oko 85% od ovog

pula. Pored S-nitrozoalbumina i S-nitrozilovani tioli male molekulske mase (Cys-NO i GSNO) su takođe detektovani *in vivo* (mikromolarne koncentracije GSNO su nađene u humanoj bronhijalnoj tečnosti). Smatra se da S-nitrozotiole male molekulske mase imaju važnu funkciju u NO-zavisnim fiziološkim procesima, naročito u vaskularnom sistemu. Pokazano je da veći broj S-nitrozotiole, uključujući i GSNO mogu da izazovu vazodilataciju, kao i da spreče agregaciju trombocita (Broillet, 1999). Smatra se da S-nitrozoalbumin ima funkciju u čuvanju azot monoksida, dok S-nitrozotiole male molekulske mase imaju važnu ulogu u njegovom transportu (Slika 17).



Slika 17. Pretpostavljeni metabolizam GSNO u alveolama (Gaston, 1999).

2.3.3 Nitrovanje tirozina *in vivo*

Ohshima i saradnici (1990a) su prvi detektovali u humanom urinu slobodni 3-nitrotirozin (NTYR) i njegov dezaminovani/dekarboksilovani metabolit 3-nitro-4-hidroksifenilacetat. Interesantno je napomenuti da je humana MnSOD prvi protein u kojem je detektovano nitrovanje tirozina *in vivo* (Odeljak 2.3.1.3). Primenom HPLC i metoda masene spektrometrije, kao i imunohemijskih tehnika baziranih na specifičnim antitelima (Ohshima et al., 1990a; Beckman et al., 1994; Ye et al., 1996) nađena je povećana koncentracija 3-nitrotirozina vezanog kod proteinima, kao i slobodnog 3-nitrotirozina u inflamatornih, infektivnih i degenerativnih procesa, u kojima dolazi do oksidativnog stresa i povećane produkcije azot monoksida (Tabele 2, 3) (Ischiropoulos, 1998). Nitrovanje tirozina izazivaju određene reaktivne vrste NO koje nastaju u ovim uslovima (Odeljak 2.4.4). Pretpostavlja se da

slobodni 3-nitrotirozin nastaje proteolitičkom degradacijom nitrovanih proteina, i/ili nitrovanjem slobodnog tirozina (Odeljak 2.4.4).

Tabela 2. Detekcija proteinskog 3-nitrotirozina u humanim i animalnim modelima bolesti.

Humane bolesti	Referenca
Ateroskleroza	Buttery et al., 1996
Astma	Saleh et al., 1998
Idiopatična pulmonarna fibroza	Saleh et al., 1997
Amiotrofična lateralna skleroza	Abe et al., 1995; Bruijn et al., 1997
Multipla skleroza	Basarga et al., 1995
Alchajmerova bolest	Good et al., 1996; Smith et al., 1997
Inflamatorne bolesti	Singer et al., 1996
Inflamacija miokarda	Kooy et al., 1997
<i>Helicobacterium pylori</i> gastritis	Ford et al., 1997
Sinovijalna tečnost pacijenata sa artritisom	Kaur & Halliwell, 1994
Miozitis	Yang et al., 1996
Nekrotični enterokolitis	Mannick et al., 1996
Parkinsonova bolest	Good et al., 1996
Gastrični kancer	Goto et al., 1999
Plazma proteini pušača	Petruzzelli et al., 1997
Hronični hepatitis	Cuzzocrea et al., 1998a
Model pacova	
Zymosan indukovana inflamacija	Cuzzocrea et al., 1998b
Gvožđe indukovani ezofagalni adenokarcinom	Goldstein et al., 1998
Ateroskleroza	Takagi et al., 1998
Azbestna toksičnost	Choe et al., 1998; Tanaka et al., 1997
Deficijencija tiamina	Calingasan et al., 1998
Carrageenan indukovana inflamacija	Salvemini et al., 1996; Cuzzocrea et al., 1998
Hepatična ishemija/reperfuzija	Liu et al., 1997
Endotoksin indukovana kontraktilna disfunkcija skeletnih mišića	El-Dwairi et al., 1998
Cerebralna ishemija/reperfuzija	Forman et al., 1998
Antimijeloperoksidaze asociirani glomerulonefritis	Wada et al., 1998
Fokalna ishemija	Coeroli et al., 1998; Fukuyama et al., 1998
Miokardijalna ishemija/reperfuzija	Bachmaier et al., 1997; Zingarelli et al., 1997
Miokardijalna inflamacija	Bachmaier et al., 1997; Ishiyama et al., 1997
Post-ishemična cerebralna oštećenja	Tanaka et al., 1997
Post-ishemija srca	Wang and Zweier, 1996
Cerebralna vazospazma	Medele et al., 1996
Autoimuni encefalomijelitis	Van der Veen et al., 1997
Autoimuni uveitis	Wu et al., 1997
Cerebralna postishemična oštećenja	Tanaka et al., 1997
Renalna hipertenzija	Bosse & Bachmann, 1997
Hemoragični šok	Zingarelli et al., 1997
Retardacija rasta fetusa	Miller et al., 1996
Trovanje ugljen monoksidom	Ischiropoulos et al., 1996
Ishemična oštećenja pluća	Ischiropoulos et al., 1995
Endotoksin posredovano oštećenje aorte	Szabo et al., 1995
Akutna pulmonarna endotoksemia	Wizemann et al., 1994
Model miša	
Toksičnost acetaminofena	Hinson et al., 1998
MPTP indukovana neurodegeneracija	Matthews et al., 1997; Ara et al., 1998
Autoimuni encefalomijelitis	Cross et al., 1997; Crow et al., 1997
Hiperholesterolemijom indukovana ateroskleroza	Aji et al., 1997
Model RcsX tumora	Gal et al., 1997
Autoimuni diabetes	Suarez-Pinzon et al., 1997
Influenca virus indukovana pneumonia	Akaike et al., 1996
Malonat indukovano neurooštećenje	Schulz et al., 1996
ApoE deficijencija	Matthews & Beal, 1996
Neurotoksičnost 3-nitropropionske kiseline	Beal et al., 1995
MPTP indukovana neurotoksičnost	Schulz et al., 1995a
Model Zeca	
Ishemija/reperfuzija oštećenja	Tan et al., 1998
Nisko-frekventna stimulacija mišića	Klebl et al., 1998
Hiperholesterolemijom indukovana ateroskleroza	Moriel & Abdalla, 1997

Tabela 2. Nastavak tabele.

Ostali modeli životinja	
LPS indukovano akutno oštećenje pluća pasa	Numata et al., 1998
Citokin indukovano oštećenje miokarda pasa	Oyama et al., 1998
Ileitis svinja	Miller et al., 1995

Tabela 3. Detekcija slobodnog 3-nitrotirozina *in vivo*.

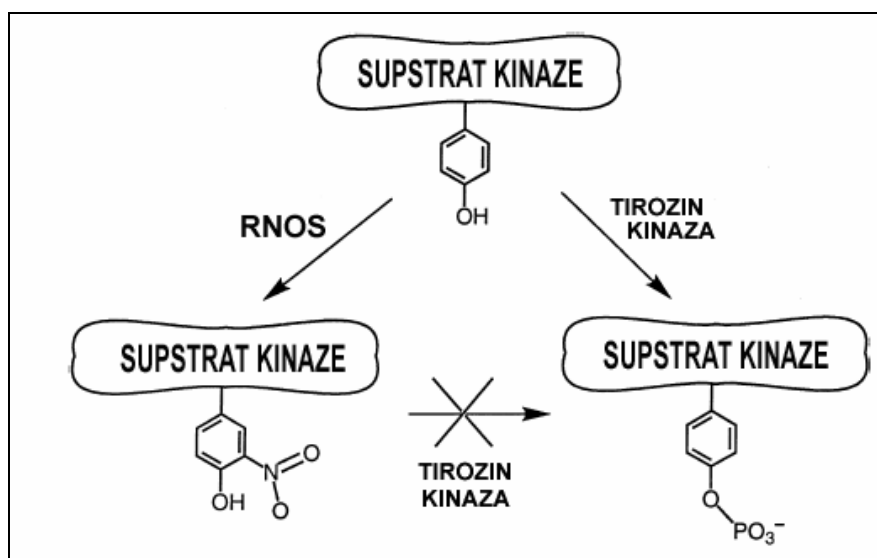
Patologija	Referenca
Humani reumatoidni artritis	Kaur & Halliwell, 1994
Humana amiotrofična lateralna skleroza	Beal et al., 1997
Mišji model amiotrofične lateralne skleroze	Brujin et al., 1997
Humana sepsa i sepsa sa renalnim oštećenjem	Fukuyama et al., 1997
Pacovski model transplantacije jetre	Skinner et al., 1997
Plazma u pacovskom modelu septičnog šoka	Kamisaki et al., 1997
Humani urin	Ohshima et al., 1990a

Proteini sadrže u proseku 4% tirozina, ali samo manji deo od proteina prisutnih u biološkim sistemima podleže reakciji nitrovanja tirozina. Tako je, na primer, humana MnSOD protein koji se primarno nitruje u mitohondrijama (Odeljak 2.3.1.3), a i jedini je protein u cerebrospinalnoj tečnosti u kojem je detektovano prisustvo ostatka nitrotirozina (Aoyama et al., 2000).

Specifičnost nitrovanja ostataka tirozina u proteinima ne može se u potpunosti objasniti. Faktori koji se navode su: zastupljenost datog proteina i sadržaj tirozina u njemu, blizina ostatka tirozina u odnosu na mesto nastajanja RNOS, susedni aminokiselinski ostaci koji mogu svojim interakcijama sa datim agensom za nitrovanje da utiču na lokalno povećanje njegove koncentracije i njegovo (povoljno) usmeravanje. Smatra se da i prisustvo specifične sekvence: Lys ili Arg-X-X-X-Tyr, Asp ili Glu-X-X-X-Tyr) takođe favorizuje nitrovanje ostataka tirozina (Ischiropoulos, 2003).

Konformacione promene i gubitak aktivnosti enzima usled nitrovanja ostataka tirozina primećene su u prvim eksperimentima hemijskih modifikacija ostataka tirozina u proteinima pomoću tetranitrometana (Sokolovsky et al., 1966; Riordan et al., 1967). Nitro grupa uvodi negativnu šaržu u molekul proteina, što može uticati na lokalnu konformaciju proteina i mogućnost građenja vodoničnih veza sa susednim aminokiselinskim ostacima u molekulu proteina (Ara et al., 1998). Takođe, ova reakcija značajno povećava jednoelektronski redukcionni potencijal (od ~ 0,85 do > 1,05 V), smanjuje pK_a tirozina sa 10 na 7, tako da je na fiziološkom pH oko 50% fenolne hidroksilne grupe 3-nitrotirozina deprotonovano (Eiserich et al., 1998). Zbog toga prisustvo 3-nitrotirozina u molekulu proteina može inhibirati vezivanje supstrata za enzime, ili narušiti protein-protein interakcije (Ara et al., 1998). *In vitro* studije pokazuju da

nitrovanje ostataka tirozina može inhibirati tirozin-kinazama posredovanu fosforilaciju ostataka tirozina, što će imati značajne efekte u transdukciji odgovarajućeg signala (Slika 18) (Gow et al., 1996; Kong et al., 1996; Mallozzi et al., 1997). Strukturne i jonske karakteristike 3-nitrotirozina, u poređenju sa fosfotirozinom ($\text{PO}_4\text{-Tyr}$), ukazuju da nitrovanje tirozina predstavlja mehanizam koji pre vodi do aktivacije, nego do inhibicije ćelijskih signalnih kaskada (Eiserich et al., 1998). Za razliku od efekata nitrovanja ostataka tirozina u proteinima o sudbini i potencijalnoj toksičnosti slobodnog 3-nitrotirozina za sada se ne može ništa reći.



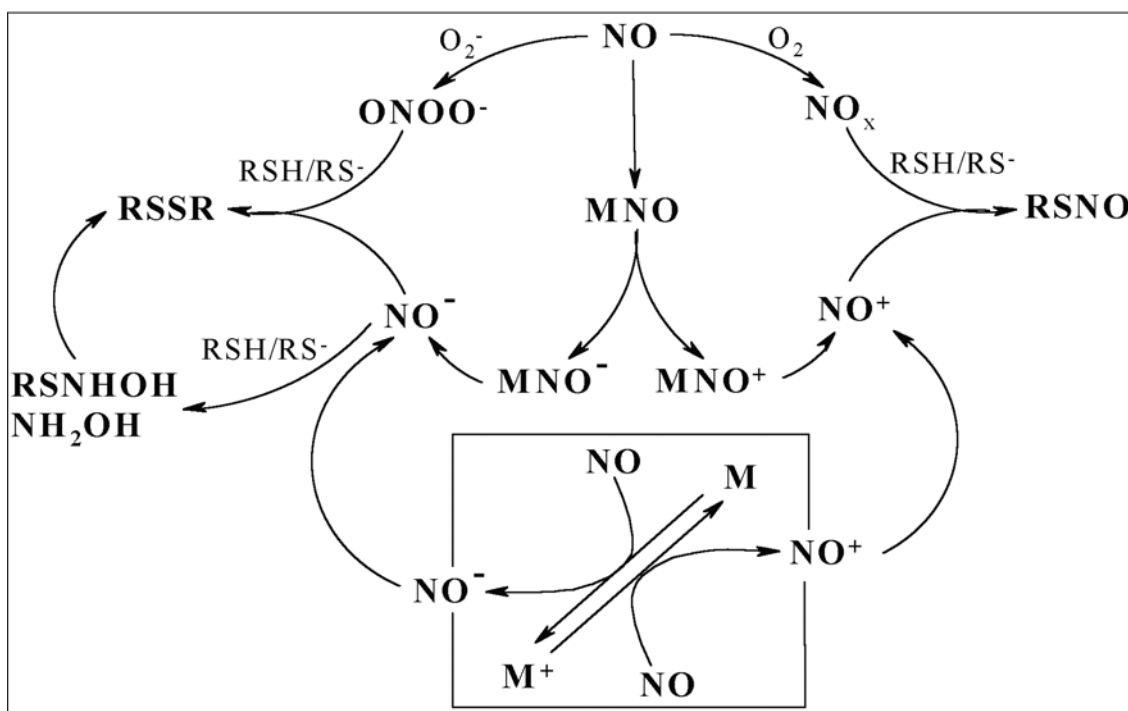
Slika 18. Inhibicija fosforilacije nitrovanjem ostataka tirozina (Eiserich et al., 1998).

Iako se smatra da je nitrovanje tirozina ireversibilna reakcija treba pomenuti da je u tkivu pacova detektovana aktivnost inducibilne "NO₂Tyr denitrase" (Kamisaki et al., 1998). Postojanje enzimskog mehanizma za nitrovanje i denitrovanje ostataka tirozina u proteinu značilo bi da ova kovalentna modifikacija može imati funkciju u transdukciji signala sličnu funkciji koju ima fosforilacija i defosforilacija ostataka tirozina.

2.4 Hemijski mehanizmi dejstva NO: reaktivne vrste NO (RNOS)

Po važećem modelu, azot monoksid slobodno difunduje u biološkoj sredini dok ne izreaguje sa nekom od svojih meta (Moncada et al., 1991; Lancaster, 1994; Chen et al., 1998). Pri (pato)fiziološkim koncentracijama azot monoksid reaguje u biološkim sistemima sa

centrima prelaznih metala (Odeljak 2.3.1), molekulskim kiseonikom i superoksid anjon radikalom ($O_2^{\cdot-}$) (Niketić et al., 1998; Patel et al., 1999) (Slika 19). Proizvodi reakcija, sa kiseonikom i superoksid anjon radikalom, viši oksidi azota (NO_x), odnosno peroksinitrit ($ONOO^-$), koji su znatno reaktivniji od samog NO, predstavljaju reaktivne NO vrste (RNOS). Azot monoksid kompleksiran za metalni jon može biti (ređe) neutralan ili pak, u zavisnosti od toga da li se u datom kompleksu NO ponaša kao donor ili akceptor elektrona u odnosu na metalni jon, pokazivati (veći ili manji) karakter nitrozonijum (NO^+), odnosno nitroksilnog (NO^-) jona (McCleverty, 1978) (Slika 19). Redoks srodnici azot monoksida, NO^+ i NO^- vrste, predstavljaju takođe RNOS. U ovom odeljku ćemo ukratko opisati nastajanje i hemijske reakcije navedenih reaktivnih vrsta NO, sa posebnim akcentom na hemijske mehanizme S-nitrozovanja i nitrovanja tirozina, što treba da omogući detaljnije razumevanje biohemijskih mehanizama, kao i fizioloških i patofizioloških efekata NO, koji su prikazani u prethodnim odeljcima.



Slika 19. Pregled osnovnih reakcija NO u biološkim sistemima. SH grupe iz proteina i niskomolekularnih tiola u biološkim sistemima su primarne mete za nastale RNOS (Niketić, et al., 1998).

2.4.1 Reakcija NO sa O_2 : NO_x

Autooksidacijom NO u gasnoj fazi i u nepolarnoj sredini nastaju NO_2 , N_2O_3 i N_2O_4 (Reakcije 14, 15 i 16) (Wink & Mitchell, 1998a).



Reakcijom NO/O₂ u vodenoj sredini nastaju proizvodi koji se razlikuju od onih u gasnoj fazi i koji nisu u potpunosti okarakterisani i koji se zato obeležavaju sa NO_x. Primarni proizvod autooksidacije NO u vodenoj sredini ima empirijsku formulu N₂O₃. Reakcija autooksidacije NO je reakcija drugog reda u odnosu na NO, što znači da će poluživot NO u vodenoj sredini, pod aerobnim uslovima, biti proporcionalan njegovoj koncentraciji. Na primer, pri početnoj koncentraciji od 1 μM, poluživot NO biće 800s, dok će pri koncentraciji od 100 μM isti iznositi 8s (Ford et al., 1993). Zbog toga NO neće u znatnijoj meri reagovati sa kiseonikom, pri fiziološkim uslovima u kojima je koncentracija NO niska i smanjuje se sa rastojanjem pri njegovoj difuziji od mesta nastanka. Međutim, u uslovima lokalnog povećanja koncentracije NO, nastajanje proizvoda autooksidacije će eksponencijalno rasti (Ford et al., 1993; Wink & Mitchell, 1998a).

Na konstantu brzine autooksidacije NO malo utiče pH, temperatura, (Nottingham & Sutter, 1989; Ford et al., 1993; Wink & Ford, 1995), kao i prisustvo redukcionih sredstava, kao što su GSH, askorbat ili ferocijanid (Wink et al., 1994; Goldstein & Czapski, 1995). To ukazuje da će brzina autooksidacije NO u biološkim sistemima zavisiti isključivo od koncentracije O₂ i NO. Kako je rastvorljivost NO i O₂ više nego 20 puta veća u lipidnim delovima ćelije nego u vodenoj sredini, može se očekivati da će se autooksidacija NO primarno odvijati u lipidnom dvosloju bioloških membrana. Zbog neznatnog prisustva vode u hidrofobnoj sredini i hidroliza NO_x biće smanjena, što će dodatno produžiti poluživot i reaktivnost NO_x. NO_x nastao u membranama primarno će reagovati sa bočnim aminokiselinskim ostacima membranskih proteina, ili proteina koji se nalaze u blizini membrane (Wink & Mitchell, 1998a).

Azot u N₂O₃ ima formalno oksidaciono stanje +3, i ovaj oksid se ponaša kao nosilac NO⁺ (nitrozonijum) jona, tako da može da vrši reakcije nitrozovanja (Odeljak 2.4.3). U vodenoj sredini brzo (poluživot N₂O₃ u vodenoj sredini iznosi 1 ms) hidrolizuje do nitrita (Reakcija 17) (Wink & Mitchell, 1998a). Kompetitivna reakcija je reakcija S-nitrozovanja tiola, pri čemu nastaju S-nitrozotiol (Reakcija 18). NO_x izaziva i reakcije N-nitrozovanja amina i tirozina, ali znatno sporije (Tabela 4). NO u prisustvu kiseonika može da izazove i nitrovanje tirozina (Odeljak 2.4.4) (Pfeiffer et al., 2001). NO_x

oksiduju dopamin i druge kateholamine. Askorbat je vrlo efikasan hvatač NO_x, čime štiti biomolekule od ove RNOS (Wink & Mitchell, 1998a).



Tabela 4. Selektivnost NO_x u odnosu na različite supstrate u vodenoj sredini (Wink et al., 1991; Wink et al., 1993b; Wink et al., 1994).

Supstrati	K_s/K_{H_2O} (M ⁻¹)
Ferocijanid	5 x 10 ²
Cistein	5 x 10 ³
Glutation	10 ⁴
Tirozin	25
Azid	10 ⁵
Alanin	< 5
Citozin	< 0,005
5-aminosalicilna kiselina ^a	2 x 10 ³
Dopamin ^b	1 x 10 ³

^a Praćeno spektrofotometrijski na 400 nm.

^b Praćeno spektrofotometrijski na 475 nm.

2.4.2 Reakcija NO sa O₂^{•-}: peroksinitrit

In vitro eksperimenti su pokazali da NO i O₂^{•-} reaguju brzo (konstanta brzine 7x10⁹ M⁻¹s⁻¹, tako da je reakcija kontrolisana difuzijom reaktanata), pri čemu nastaje izuzetno reaktivni proizvod, peroksinitrit (Reakcija 19) (Huie & Padmaja, 1993).



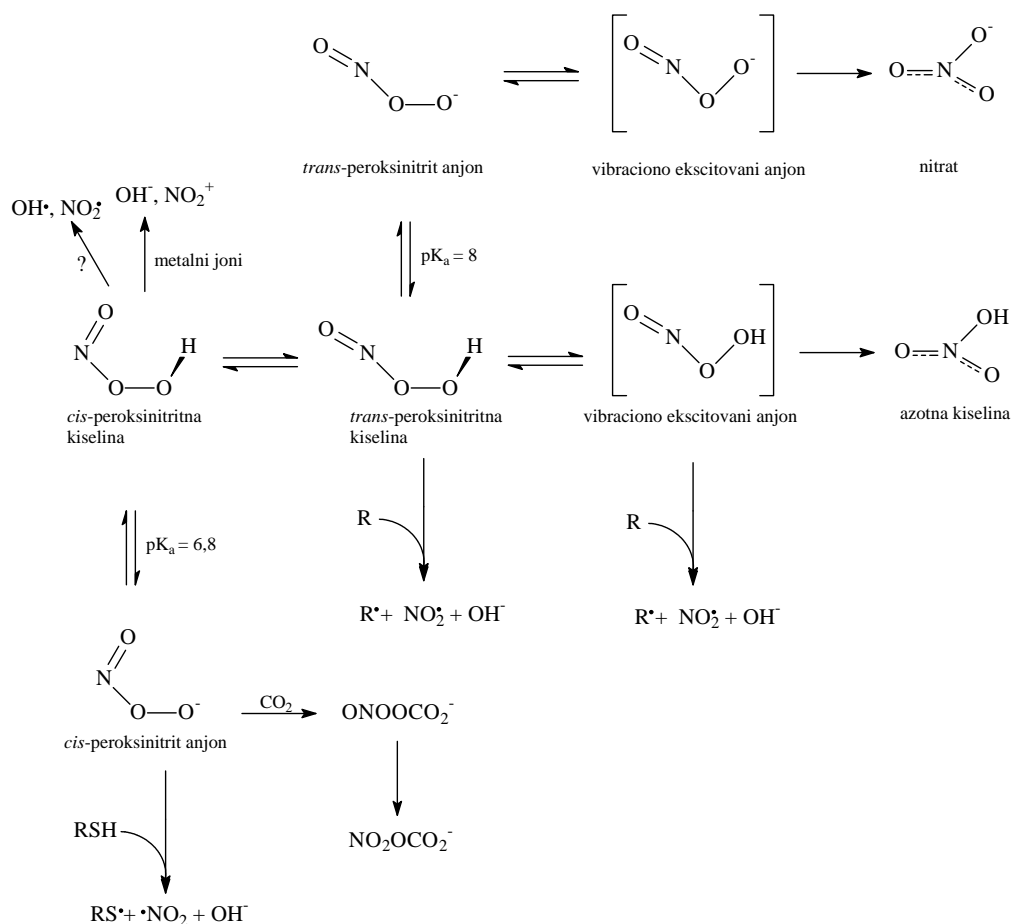
Direktni dokazi za nastajanje peroksinitrita *in vivo* za sada ne postoje, dok su indirektni dokazi kontradiktorni. Količina peroksinitrita koji bi mogao da nastane *in vivo* zavisice od koncentracije NO i superoksid anjon radikala, koje će opet zavisiti, s jedne strane od produkcije ovih radikala, a sa druge, od njihovih reakcija sa biološkim metama (Fukuto & Ignarro, 1997).

Polazeći od činjenice da su brzine reakcije O₂^{•-} sa SOD i NO slične, te da je reakcija NO sa superoksid anjon radikalom brža od reakcije NO sa hemoproteinima (k<10⁸ M⁻¹s⁻¹), zaključuje se da se NO može u biološkim sistemima takmičiti sa SOD za O₂^{•-}. S druge strane, (nanomolarna) koncentracija superoksid anjon radikala pod normalnim, nestresnim, fiziološkim uslovima (Tyler, 1975) je manja od koncentracije NO (20 nm do 2-4 μM) (Odeljak 2.1.1), dok je normalna koncentracija SOD u ćelijama 4-10 μM (Nikano et al., 1990). Iz ovoga proizilazi da bi za prelazak 50% superoksid anjon radikala u

peroksinitrit bio potreban fluks azot monoksida od 2-4 μM (Wink & Mitchell, 1998a), što znači da će pod normalnim fiziološkim uslovima koncentracija peroksinitrita biti neznatna. Nastajanje značajnijih količina peroksinitrita može se očekivati na mestima gde je lokalna koncentracija NO visoka (Lancaster, 1994), ili pak u regionima u kojima se SOD nalazi u manjim od mikromolarnih koncentracija (Wink & Mitchell, 1998a). Pretpostavlja se da bi najveća količina peroksinitrita u biološkim sistemima mogla da nastane u mitohondrijama. Superoksid anjon radikal nastaje u mitohondrijama kao rezultat aerobne respiracije, dok NO može da uđe u mitohondrije difuzijom iz ćelija endotela, ili da nastane kao rezultat aktivnosti mtNOS (Odeljak 2.3.1.3).

Ograničavajući faktor u nastajanju peroksinitrita je reakcija superoksid anjon radikala sa SOD, kao i reakcije NO sa biološkim metama, kao što je oksihemoglobin, u kojima nastaje nitrit, krajnji proizvod metabolizma NO (Odeljak 2.3.1.1).

Peroksinitritni anjon ONOO^- je prilično nereaktivan. Na fiziološkom pH ONOO^- se brzo protonuje do nestabilne i vrlo reaktivne peroksiazotaste kiseline (HO-O-N=O), koja se raspada preko niza reaktivnih intermedijera do nitrata i (manjim delom) do nitrita (Slika 20). Peroksinitritni anjon dodat ćelijama, tkivima ili telesnim tečnostima, brzo se protonuje do peroksiazotaste kiseline, što dovodi do oksidacije SH grupa i drugih antioksidanata, oksidacije lipida, cepanja lanaca DNK, nitrovanja i dezaminacije nukleinskih baza. Najviše izučavana reakcija peroksinitrita sa proteinima je reakcija nitrovanja ostataka tirozina (Odeljak 2.4.4). Nitrovanje ostataka tirozina *in vivo* se često uzima kao indikacija generisanja peroksinitrita, pod datim (pato)fiziološkim uslovima. Sve ove reakcije mogu imati potencijalno štetne posledice za biološke sisteme (Koppenol et al., 1992; Koppenol, 1998; Halliwell Gutteridge, 1999).



Slika 20. Transformacije i reakcije peroksinitrita. ONOOH se u manjoj meri cepa homolitički na OH^\bullet i NO_2^\bullet . Neki joni metala mogu katalizovati heterolitičko cepanje ONOOH na OH^- i NO_2^+ , što objašnjava zašto prisustvo ovih metalnih jona ubrzava reakcije nitrovanja peroksinitritom. Na pH 7,4 oko 20% ONOO⁻ će biti u obliku ONOOH (pKa = 6.8), koji se brzo raspada. Vrste koje mogu da izazovu oksidativna oštećenja obuhvataju *cis*-ONOO⁻ i *cis*-ONOOH (koji imaju ograničenu reaktivnost, npr. mogu oksidovati SH grupe) i *trans* izomere i ekscitovana stanja *trans* izomera, posebno ONOOH. Aktivirani, *trans*-ONOOH ima redukcionni potencijal blizak potencijalu OH^\bullet , tako da je jak oksidans. Neki dodati biomolekuli (uključujući i tirole) mogu da budu oksidovani ovim raznim reaktivnim vrstama peroksinitrita do radikala, pri čemu nastaje i NO_2 . Reakcijom CO_2 sa ONOO⁻ nastaje $\text{O}=\text{N}-\text{OOCO}_2^-$, za kojeg je predloženo da premeštanjem daje reaktivni nitrokarbonatni jon, koji je efikasniji nitrujući agens od samog peroksinitrita (Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.4.3 Redoks-srodnici NO: NO^+ i NO^- vrste

U biološkoj sredini NO može da se oksiduje u vrste sa (većim ili manjim) karakterom nitrozonijum katjona (NO^+), ili redukuje u nitroksilni anjon (NO^-), koji se pod fiziološkim uslovima delimično protonuje (Bartberger et al., 2001), tako da se ova vrsta obeležava sa HNO/NO^- . NO^+ i HNO/NO^- se nazivaju redoks-srodnicima NO i odavno se smatra da obe vrste, koje su znatno reaktivnije od samog NO, treba uzeti u obzir pri razmatranju bioloških funkcija NO. NO^+ , NO i NO^- se mogu posmatrati i kao analozi redoks formi kiseonika: O_2 , O_2^-

odnosno O_2^{2-} (Stamler et al., 1992b). Međutim, za razliku od superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$), koji ima sposobnost dismutacije, pri čemu nastaju O_2^- i O_2^{2-} (H_2O_2) (Odeljak 2.3.1.3), NO ne podleže reakciji dismutacije (na primer Kanner, 1996).

Mnogi donori NO koji se koriste u eksperimentima *in vitro*, kao što su tionitrati, S-nitrozotiol, nitrozil halogenidi, C-nitroso jedinjenja, organski nitriti i natrijum nitroprusid, pored azot monoksida oslobađaju i NO^+ . Nitrozonium jon nastaje i razlaganjem nitrita u kiseljoj sredini (Reakcija 20) (Feelisch & Stamler, 1996). Kao donori nitroksila u eksperimentima *in vitro* najčešće se koriste Angelijeva so ($HN_2O_3^-$; natrijum trioksidinitrat) (Reakcija 21) i Pilotijeva kiselina (N-hidroksibenzensulfonamid) (Reakcija 22) (Feelisch & Stamler, 1996).



2.4.3.1 (Potencijalni) mehanizmi nastajanja NO^+ i NO^- vrsta u biološkim sistemima

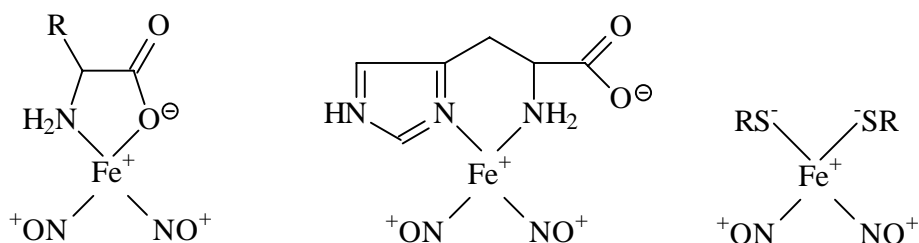
Mehanizmi konverzije NO u NO^+ i HNO/ NO^- vrste, relevantni za biološke sisteme, nisu u dovoljnoj meri razjašnjeni. Pod fiziološkim uslovima NO^+ može da se nađe u jedinjenjima, kao što su metal-nitrozil kompleksi (MNO), tionitriti (RSNO), nitrozamini ($RR'N-NO$) i viši oksidi azota (N_2O_3 , N_2O_4) (Wink et al., 1991; Stamler et al., 1992a, Hughes, 1999). Nitroksil može da nastane kao proizvod NOS-katalizovane oksidacije arginina (Fukuto et al., 1992), te pri oksidaciji azida lignin-peroksidazom (Tatarko & Bumpus, 1997).

Azot monoksid se može ili redukovati ili oksidovati u NO^- , odnosno NO^+ vrste, pomoću metalnih jona u biološkim sistemima (Stamler et al., 1992b; Radi, 1996; Sharpe & Cooper, 1998). Tako je pokazano da Cu/Zn superoksid dismutaza (Murphy i Seis 1991) i hemoproteini, kao što su hemoglobin (Odeljak 2.3.1.1; Reakcija 3) i citohrom c (Sharpe & Cooper, 1998), redukuju NO do NO^- . MetHb (Odeljak 2.3.1.1; Reakcija 5) i metmioglobin (Wade & Castro, 1990) oksiduju NO do NO^+ . Pri ugrađivanju NO u DNIC komplekse nastaju obe, NO^+ i NO^- vrste (videti naredni odeljak).

DNIC kompleksi i nastajanje NO^+ i NO^- vrsta

Videli smo da u biološkim sistemima NO gradi DNIC komplekse sa gvožđem vezanim u proteinima i sa takozvanim "slobodnim" gvožđem (Odeljak 2.3.1.2). U hemijskim eksperimentima je pokazano da DNIC kompleksi, tipa $(\text{NO}^+)_2\text{Fe}(\text{I})\text{L}_2$, nastaju pod anaerobnim uslovima u neutralnim rastvorima koji sadrže NO, dvovalentno gvožđe, i niz anjonskih liganada, uključujući aminokiseline, peptide i proteine (McDonald et al., 1965; Woolum et al., 1968). Sve α -aminokiseline se vezuju za jon gvožđa u DNIC kompleksima, preko karboksilne i amino grupe, a od bočnih ostataka u kompleksiranju učestvuje imidazol histidina i SH grupa iz cisteina (Slika 21) (Woolum et al., 1968). Tioli pokazuju veći afinitet za gvožđe u DNIC kompleksima u odnosu na druge ligande (McDonald et al., 1965). Od DNIC kompleksa sa tiolima najstabilniji su kompleksi sa proteinskim SH grupama, sledi DNIC sa redukovanim glutationom (GSH), a DNIC sa cisteinom je, slično DNIC kompleksima sa drugim aminokiselinama, nestabilan (McDonald et al., 1965; Mulsch et al., 1991).

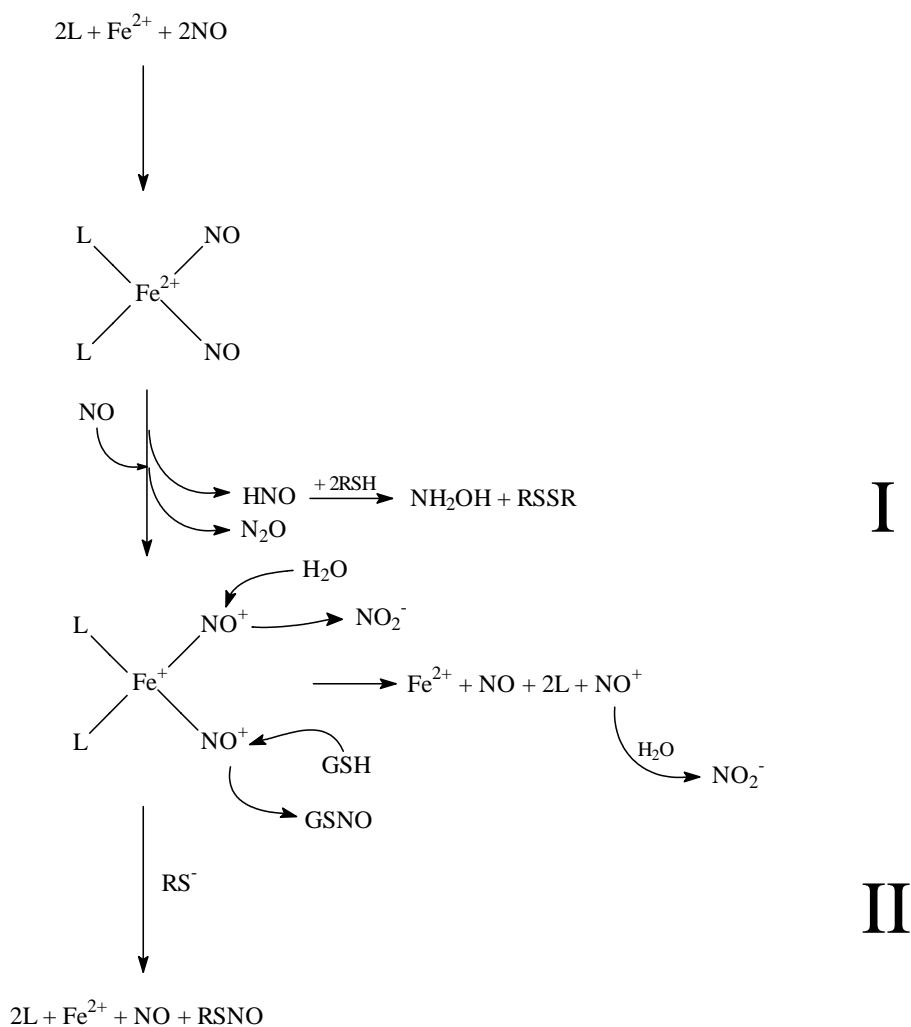
NO grupa u DNIC kompleksima malih molekulskih masa ima karakter nitrozonijum jona (Slika 22) (Vanin, 1998). U nizu radova je pokazana sposobnost DNIC kompleksa sa tiolima malih molekulskih masa (cistein, GSH) da izvrše reakcije S-nitrozovanja tiola male molekulske mase i proteinskih tiola (Slika 22) (Odeljak 2.4.3.2) (Mulsch et al., 1991, Boese et al., 1995, Vanin et al., 1996; Vanin et al., 1997, Vanin, 1998; Vanin et al., 2002). Kako su DNIC sa tiolima male molekulske mase nestabilni, u procesu njihovog raspadanja doći će do nastajanja nitrita i S-nitrozovanja tiola, koji je prisutan u višku u reakcionoj smeši (Slika 22) (Odeljak 2.4.3.2).



Slika 21. DNIC kompleks sa α -aminokiselinom, sa His i sa tiolima (Woolum et al., 1968).

U reakciji Fe(II), NO i anjonskih liganada male molekulske mase prvo nastaje neutralni, $\text{Fe}(\text{II})(\text{NO})_2\text{L}_2$ kompleks (Slika 22) (Pearsall & Bonner, 1982). Reakcijom NO sa ovim kompleksom dolazi do

disproporcionisanja NO, tj. do redukcije NO do NO⁻, koji zatim u procesu protonizacije, dimerizacije i dehidratacije (Odeljak 2.4.3.3) daje azotsuboksid (N₂O), te do oksidacije NO grupe u kompleksu u NO⁺ i prelaska Fe(II) u (formalno) Fe(I) stanje (Slika 22) (Vanin et al., 1997; Vanin, 1998). Međutim, kako tioli efikasno reaguju sa HNO/NO⁻ dajući hidroksilamin (Odeljak 2.4.3.3) (Slika 22), i ovaj proizvod se može očekivati u reakcionoj smeši.



Slika 22. Nastajanje i raspadanje DNIC kompleksa sa tiolima male molekulske mase (šema napravljena polazeći od sledećih radova: Pearsall & Bonner, 1982; Vanin et al., 1997, Vanin, 1998; Vanin et al., 2002).

2.4.3.2 Reakcije NO⁺ vrste relevantne za biološke sisteme

Nitrozonijum vrste izazivaju reakcije nitrozovanja sa O, S, N i C centrima. NO⁺ brzo hidrolizuje u vodenoj sredini do nitrita (poluživot nitrozonijum jona u vodi je 3×10^{-10} s (Ridd, 1979)), slede

po reaktivnosti tioli, amini i hidroksilne grupe iz alkohola (Keefer & Williams, 1996):



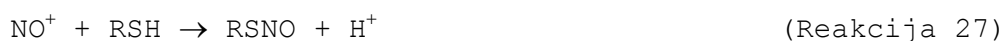
Od napred opisanih nosioca NO^+ grupe, NO_x i nitrozil kompleksi metMb i (u znatno manjoj meri) metHb mogu da izvrše sve navedene reakcije nitrozovanja (Odeljak, 2.4.1; Wade & Castro, 1990). Za NO^+ iz DNIC sa tiolima male molekulske mase (cistein, GSH) pokazano je da reaguje sa vodom i sa SH grupama iz proteina i tiola male molekulske mase (Slika 22) (Mulsch et al., 1991; Boese et al., 1995). Ukratko ćemo se osvrnuti na navedene reakcije nitrozovanja, koje mogu biti od značaja za NO-posredovane procese.

O-Nitrozovanje

S obzirom da je voda najzastupljeniji nukleofil u fiziološkoj sredini, ona podleže intenzivnom O-nitrozovanju, pri čemu (na neutralnom pH) nastaje nitrit (Reakcija 23) (Ignarro et al., 1993). O-nitrozovanjem alkohola nastaju stabilni nitritni estri (Reakcija 26) (Keefer & Williams, 1996). Nitritni estri se upotrebljavaju kao vazodilatatori (Mirvish et al., 1993). I askorbinska kiselina podleže reakciji O-nitrozovanja, što može da bude od fiziološkog značaja (Dahn et al., 1960).

S-Nitrozilovanje (nitrozovanje)

Nitriti, koji u kiseloj sredini daju NO^+ jone (Reakcija 20), S-nitroziluju tirole u visokom prinosu (Reakcija 27). Ova reakcija može da bude relevantna za nastajanje S-nitrozotiola u želucu (pH 2-4), ili u fagosomima (pH 3-6) (Eiserich et al., 1998). Oksidi azota, NO_x , koji nastaju autooksidacijom NO (Odeljak 2.4.1) i koji su nosioci NO^+ grupe, mogu takođe efikasno da izvrše S-nitrozilovanje tiola (Odeljak 2.4.1). Vanin (1998) predlaže da su DNIC kompleksi sa tiolima male molekulske mase najrelevantniji S-nitrozilujući agensi (Slika 22) pod fiziološkim uslovima.

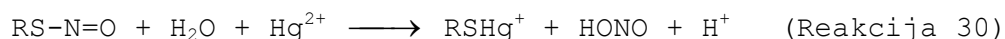


S-nitrozotiosioli su, sa izvesnim izuzecima, nestabilni u vodenoj sredini. Tako na primer, GSNO se raspada tokom nekoliko sati, dok se Cys-NO raspada u toku nekoliko minuta. Prisustvo jona metala, posebno Fe(II) jona znatno ubrzava raspadanje S-nitrozotiola (videti dalji tekst). Proteinski RSNO su, po pravilu, znatno stabilniji (u slučaju BSA više od 10 sati).

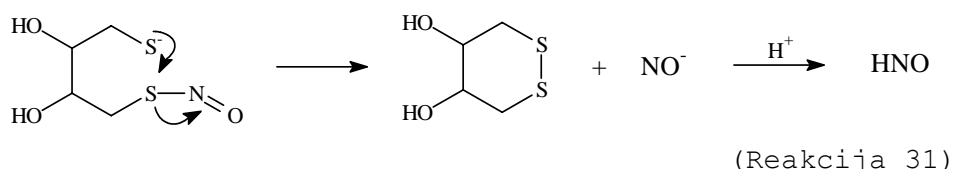
Kako se RSNO male molekulske mase, kao što je Cys-NO, ponašaju kao donori NO (na primer Feelisch & Stamler, 1996) do skora je bilo široko prihvaćeno da se S-N veza u S-nitrozotiolima cepa homolitički, uz oslobađanje NO i nastajanje tiil (RS·) radikala (Reakcija 28) (Arnelle & Stamler, 1995). Međutim, detaljna istraživanja su pokazala da se u vodenoj sredini cepanje S-N veze u RSNO male molekulske mase u najvećoj meri vrši heterolitički, uz oslobađanje RS⁻ i (u prisustvu na primer proteinskih tiola) transfera NO⁺ na SH grupe iz proteina (S-transnitrozovanje) (Reakcija 29).



Ovakvo ponašanje S-nitrozotiola potvrđuje (dominantno) NO⁺ karakter azot monoksida vezanog u RSNO, što predstavlja i osnov široko rasprostranjene Seville-ove metode za njihovo detektovanje i određivanje. Ova metoda se zasniva na određivanju nitrita oslobođenog u reakciji S-nitrozotiola sa jonima žive (Reakcija 30) (Stamler & Feelisch, 1996):



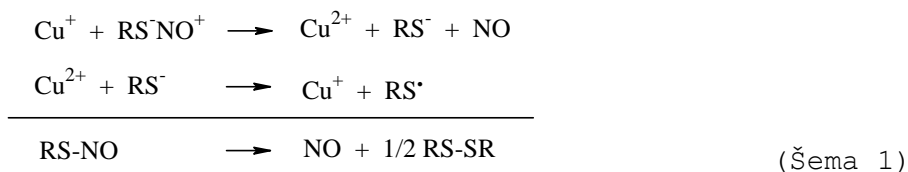
Do heterocikličnog cepanja S-N veze iz RSNO, u prisustvu slobodnih tiola, uz oslobađanje znatnih količina NO⁻, dolazi samo u slučaju da se S-nitrozotiol nalazi u vicinalnim ditiolima (Arnelle & Stamler, 1995):



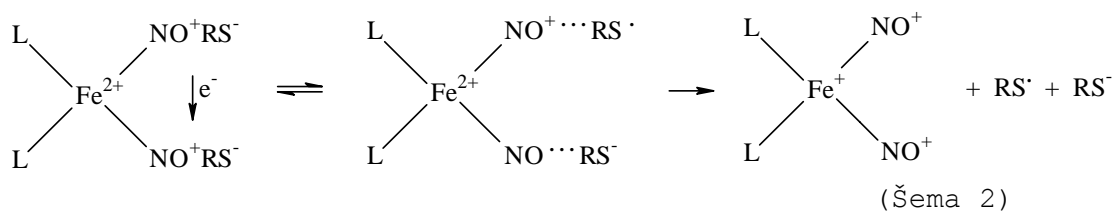
Iz napred navedenog proizilazi da se NO, u značajnijem prinosu, može osloboditi iz RSNO samo redukcijom (Reakcija 32) (Feelisch & Stamler, 1996):



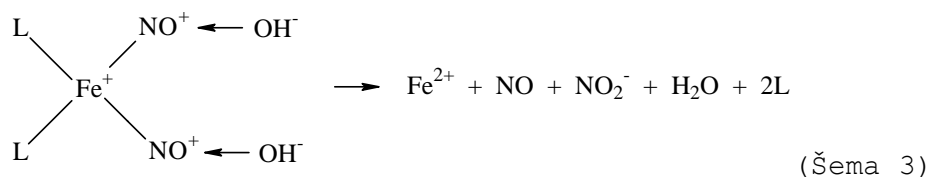
Na primeru najmanje stabilnog S-nitrosotiola, Cys-NO, pokazano je da tragovi jona bakra i gvožđa, prisutni u rastvoru, efikasno katalizuju ovu reakciju. Većina autora se slaže da se kataliza jonima bakra dešava po sledećoj šemi (Vanin et al., 2002):



U slučaju jona gvožđa pokazano je da je oslobađanje NO povezano sa nastajanjem DNIC kompleksa. U slučaju odsustva tiola, ne-tiolni anjoni (na primer fosfati) iz rastvora (L) učestvuju u građenju nestabilnih DNIC kompleksa (Odeljak 2.4.3.1). Po predloženoj šemi kompleks Fe(II) i ne-tiolnih liganada (L) direktno vezuje NO grupe iz RSNO, pri čemu dolazi do oksido-redukcije i nastajanja nestabilnog DNIC (Vanin et al., 2002):



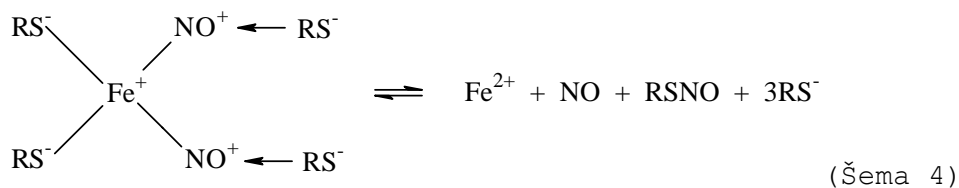
Nestabilni DNIC podleže hidrolizi prema sledećoj šemi:



Ukupna reakcija bi bila (Vanin et al., 2002):



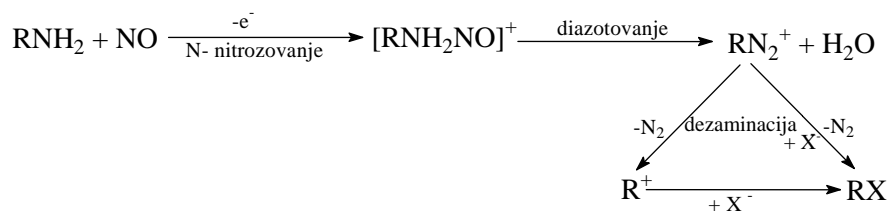
Mehanizam oslobađanja NO se razlikuje ukoliko su u rastvoru prisutni i slobodni tioli. Tiolna jedinjenja se ponašaju kao jaki kompetitori u odnosu na molekule vode (Odeljak 2.4.3.1), tako da pri ovim uslovima, pored oslobađanja, NO može da nastane i RSNO (Vanin et al., 2002):



Drugim rečima, u sistemu u kojem se nalaze RSNO, tioli i Fe(II) naći će se u ravnoteži DNIC sa tiolnim ligandima i RSNO (Vanin et al., 1997; Vanin 1998; Vanin et al., 2002).

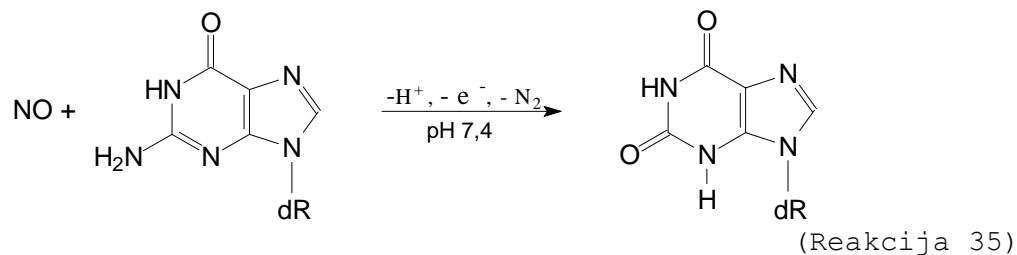
N-Nitrozovanje primarnih i sekundarnih amina

Reakcijom NO^+ sa sekundarnim aminima nastaju N-nitrozamini (Reakcija 25), koji su dobro poznati kao potentni karcinogeni (Lijinsky, 1992). Primarni amini takođe podležu N-nitrozovanju, ali je nastali proizvod nestabilan i raspada se u nekoliko koraka poznatih kao: "N-nitrozovanje, diazotovanje i dezaminacija" (Reakcija 34) (Ridd, 1961):



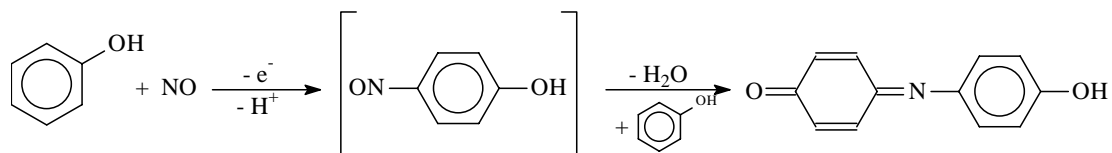
Proizvodi ovih reakcija: RN_2^+ , R^+ i RX su karcinogene alkilirajuće vrste (Hecht et al., 1994).

Reakcija NO^+ sa primarnim aminima može da bude relevantna *in vivo* zbog mutacija u molekulu DNK koje nastaju kao posledica dezaminacije baza. Tako, na primer, reakcijom NO^+ sa guaninom nastaje ksantin (Reakcija 35), koji se sparuje različito od guanina, tako da, ako se "greška" ne ispravi pre replikacije DNK, može doći do mutacije (Eritja et al., 1986):



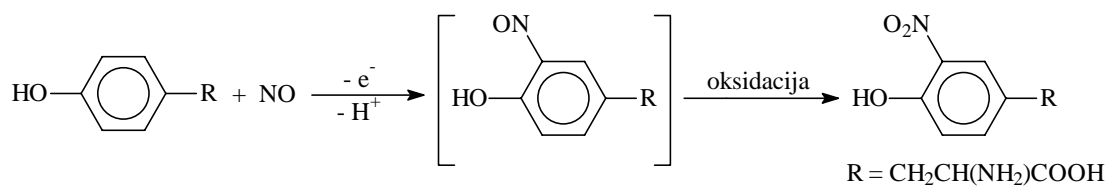
C-Nitrozovanje

Primer za C-nitrozovanje je Libermanova reakcija (Reakcija 36), koja predstavlja osnov analitičke metode za određivanje nitrita i fenola (Keefer & Williams, 1996):



(Reakcija 36)

U novije vreme posebnu pažnju privlači NO-posredovano nitrovanje tirozina u biološkim sistemima (Odeljak 2.3.3). Jedan od potencijalno biološki relevantnih mehanizama nitrovanja tirozina, koji je znatno manje ispitivan u odnosu na druge mehanizme (Odeljak 2.4.4), bila bi reakcija nitrozovanja prstena tirozina pomoću NO^+ vrsta, te oksidacija nastalog nitrozo u nitro derivat (Reakcija 37) (Eiserich et al., 1995):



(Reakcija 37)

2.4.3.3 Biološki relevantne reakcije HNO/NO^- vrste

Najnoviji radovi pokazuju da nitroksil, HNO , ima pK_a 7,2 (Bartberger et al., 2001; Sulc et al., 2004), tako da će se na neutralnom pH oko polovine prisutnog HNO naći u obliku nitroksilnog anjona NO^- . Zato se, kao što smo napred naveli, ova reaktivna vrsta obeležava sa HNO/NO^- . Nitroksilni anjon je kratko-živuća reaktivna vrsta. Neki autori procenjuju da je njegov poluživot u neutralnim rastvorima oko milisekunde (Hughes, 1999).

Reakcije HNO/NO^- su, u odnosu na reakcije NO^+ vrsta (videti prethodni odeljak), znatno manje izučavane. U vodenoj sredini NO^- podleže brznoj reakciji protonizacije, dimerizacije i dehidratacije u azotsuboksid, N_2O (Reakcija 38) (Hughes et al., 1999):



Kompetitivna reakcija ovoj je reakcija NO^- sa tiolima, u kojoj nastaje hidroksilamin i disulfid (Reakcija 39) (Arnelle & Stamler, 1996):



Usled svoje visoke intraćelijske koncentracije (1 - 10 mM), smatra se da će GSH biti glavna meta za ovu reakciju u biološkim sistemima (Nelli et al., 2000). Opšte je prihvaćeno da detektovanje N_2O i/ili hidroksilamina u ispitivanom sistemu predstavlja dokaz za nastajanje HNO/NO^- vrste (Arnelle & Stamler, 1996).

Nitroksil može da reaguje sa nizom blagih nukleofila, uključujući i amine (Reakcija 40) (Bartberger et al., 2001):



Pokazano je da NO^- reaguje sa nizom metalo-proteina (Reakcija 41) (Sulc et al., 2004):



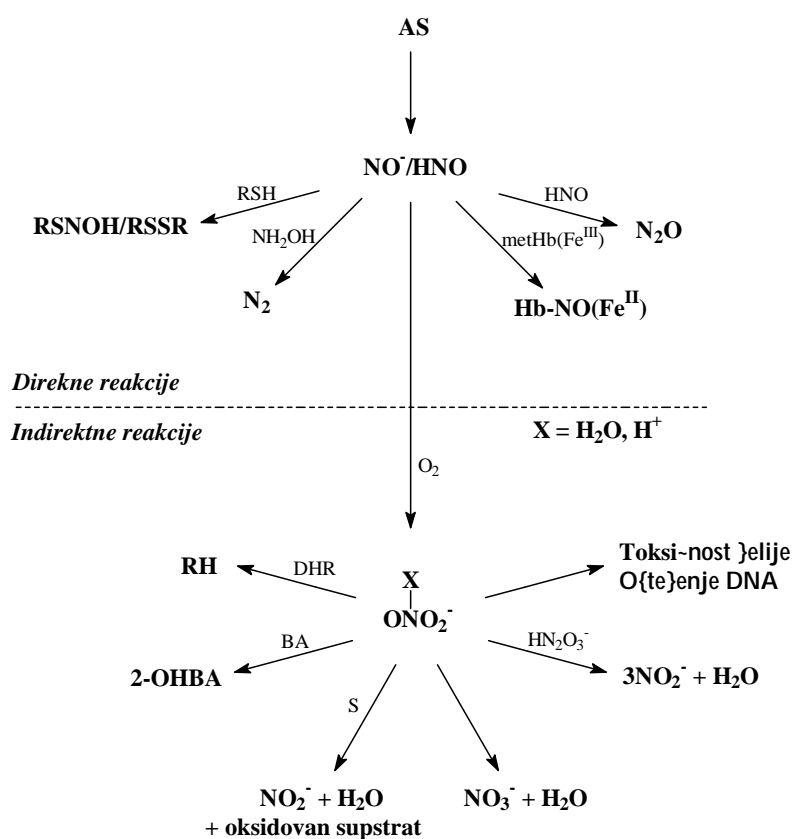
Nitroksil je predložen kao supstrat za Cu/ZnSOD (Liochev & Fridovich, 2002). Reakcija nitroksila i feri oblika hemoglobina i mioglobina direktno daje fero nitrozil adukt (Bazylnski & Hollocher, 1985).

Reakcijom nitroksilnog jona i kiseonika može da nastane peroksinitrit (Reakcija 42) (Beckman & Koppenol, 1996):



Ovo su potvrdili Sharpe & Cooper (1998) koji su pokazali da peroksinitrit nastaje u reakciji kiseonika sa NO^- , koji se oslobađa pri reakciji NO sa hemicitohromom c. Opšte je prihvaćeno da je glavni mehanizam za produkciju peroksinitrita u biološkim sistemima reakcija superoksid anjon radikala sa NO (Odeljak 2.4.2). Međutim, intraćelijska koncentracija superoksid anjon radikala je niska, dok je koncentracija kiseonika hiljadama puta veća od koncentracije superoksid anjon radikala, što bi ukazivalo da bi reakcija nitroksila i kiseonika mogla da bude značajan izvor peroksinitrita (Hughes, 1999).

Primenom Angeli-jeve soli (videti napred), primećeni su u *ex vivo* eksperimentima specifični efekti HNO/NO⁻ vrsta (Kubes et al., 1991; Ma et al., 1999; Booth et al., 2000; Mason et al., 2000; Paolocci et al., 2001; Feelisch, 2003; Pagliaro et al., 2003). Ovi efekti su pripisani *direktnim*, koji potiču od reakcija HNO/NO⁻ vrste i *indirektnim*, koji potiču od reaktivne(ih) vrsta koje nastaju u reakciji HNO/NO⁻ sa kiseonikom i za koje je pokazano da se razlikuju od peroksinitrita (Slika 23) (Miranda, et al., 2001).



Slika 23. Direktne i indirektno reakcije HNO/NO⁻. Skraćenice: AS - Angelijska so; BA - benzojska kiselina; 2-OHBA - 2-hidroksibenzojska kiselina; DHR - dihidrorodamin; RH - rodamin; S - supstrat (Miranda et al., 2001).

Kao jedan od najinteresantnijih, *direktnih* efekata NO⁻, koji ima potencijalno veliki farmakološki značaj, navodimo nedavno otkriće da donori NO⁻ izazivaju vaskularnu relaksaciju i pozitivnu srčanu inotropiju, stimulisanjem (pretpostavlja se reakcijom sa proteinskim tiolima) kalcitonin gen-srodnog peptida (CGRP) (Booth et al., 2000; Paolocci et al., 2001; Feelisch, 2003).

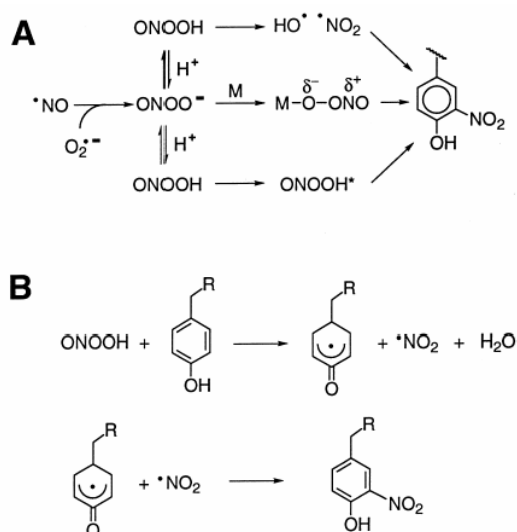
2.4.4 Biološki relevantni mehanizmi nitrovanja tirozina

Iako nastajanje 3-nitrotirozina u biološkim sistemima zavisi od povećane produkcije azot monoksida, NO nije vrsta koja može da izazove nitrovanje. Prvi, biološki relevantan mehanizam nitrovanja tirozina dao je Knowles sa saradnicima (1974) koji su pokazali da nitriti na pH 3 mogu da nitruju tirozin. Kasnije je pokazano da peroksinitrit izaziva nitrovanje ostatka tirozina 108 u Cu/ZnSOD (Ischiropoulos et al., 1992). Nitrovanje ostataka tirozina u SOD pomoću peroksinitrita intenzivno je izučavano (Odeljak 2.3.1.3).

3-Nitrotirozin nastaje u brznoj reakciji azot dioksida ($\text{NO}_2\cdot$) sa tirozil radikalom ($\text{Tyr}\cdot$) (Reakcija 43):



Azot dioksid, $\text{NO}_2\cdot$, može da nastane autooksidacijom azot monoksida, ili razlaganjem peroksinitrita (Eiserich et al., 1998). Najviše izučavani mehanizam nitrovanja tirozina, koji se smatra relevantnim za biološke uslove, je pomoću peroksinitrita. Kao što je prikazano na slici 24A, nitrovanje tirozina peroksinitritom može biti spontano ili katalizovano. Nekatalizovano nitrovanje peroksinitritom je posredovano radikalskim ili neradikalskim mehanizmom: ONOOH može da reaguje direktno preko vibraciono ekscitovanog konformera (ONOOH^*), ili pak podleže homolizi, pri čemu nastaju $\text{OH}\cdot$ i $\text{NO}_2\cdot$. Druga mogućnost je nastajanje $\text{NO}_2\cdot$ i $\text{Tyr}\cdot$ u polaznoj reakciji ONOOH (ili ONOOH^*) sa tirozinom. Kombinacijom ovih radikala nastaje 3-nitrotirozin i ditirozin (Slika 24B) (Eiserich et al., 1998).

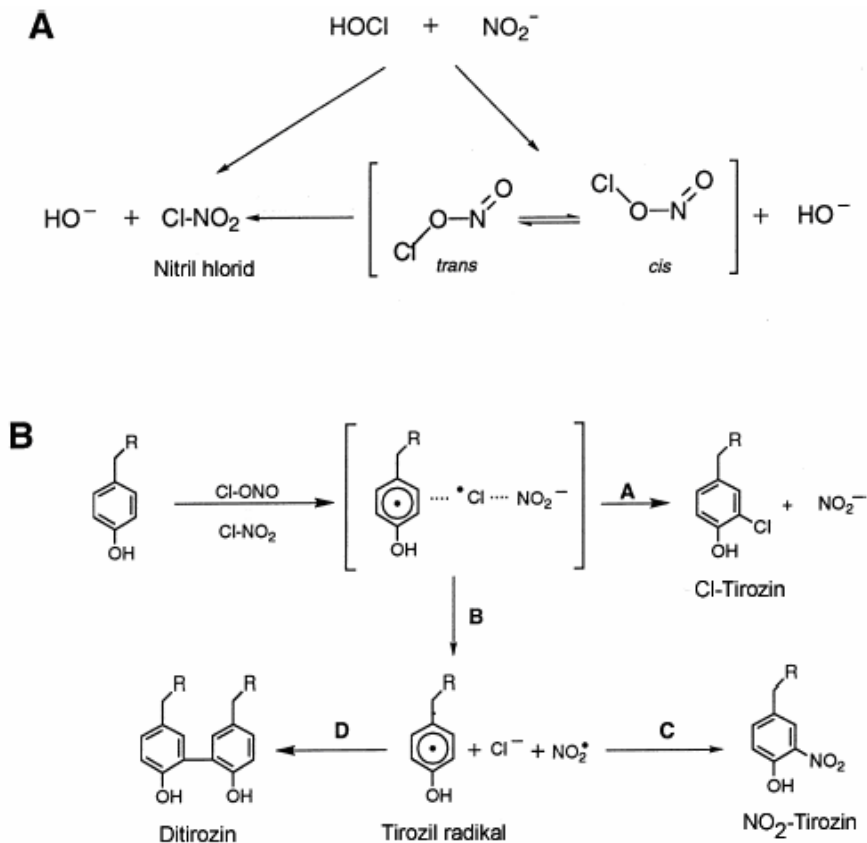


Slika 24. Mehanizmi nitrovanja tirozina pomoću peroksinitrita (Eiserich et al., 1998).

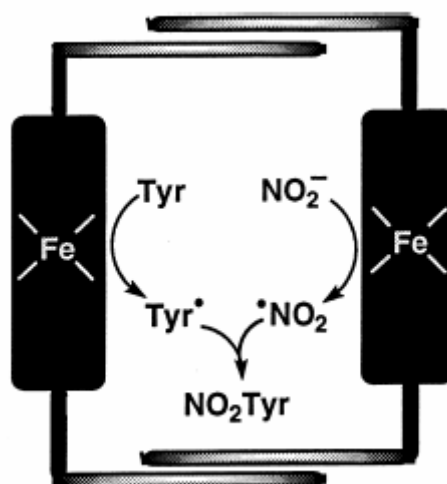
Interesantno je napomenuti da nitrovanje tirozina nastaje u visokom prinosu samo ukoliko se upotrebi sintetički peroksinitrit. Ukoliko se u eksperimentima koriste NO i superoksid anjon radikal (koji treba da nagrade peroksinitrit, Odeljak 2.4.2) primećeno je da ne dolazi do nitrovanja tirozina (Eiserich et al., 1998). Zbog toga se peroksinitrit, kao isključivi agens koji može da izazove nitrovanje tirozina pod biološkim uslovima, dovodi u pitanje, a istražuju se drugi reaktivni putevi koji mogu da generišu RNOS sposobne da izazovu nitrovanje tirozina. Od ovih mehanizama već smo pomenuli mehanizam nitrovanja tirozina koji se zasniva na oksidaciji nitrozo derivata, koji može da nastane reakcijom tirozina sa NO⁺ vrstama (Reakcija 37) (Odeljak 2.4.3.2). Osvrnucemo se na najnovije predložene mehanizme nitrovanja tirozina koji se zasnivaju na učešću nitrita, krajnjeg proizvoda metabolizma NO.

Mijeloperoksidaze (MPO) su nespecifične peroksidaze, koje uz pomoć H₂O₂ mogu da oksiduju širok spektar supstrata. Hipohlorit (HOCl), proizvod MPO-katalizovane oksidacije hlorida, je kritični oksidant koji nastaje u fagocitima pod uslovima inflamacije. Nedavne studije su pokazale da nitril hlorid (NO₂Cl), proizvod reakcije NO₂⁻ i HOCl, reaguje sa tirozinom, dajući tirozil radikal, 3-hlorotirozin, 3-nitrotirozin i ditirozin (Slika 25) (Eiserich et al., 1998).

Van der Vliet i saradnici (1997) su pokazali da mijeloperoksidaza može da oksiduje nitrit u prisustvu vodonik peroksida u NO₂[·]. Pri istim uslovima dolazi do oksidacije tirozina do Tyr[·], tako da ovi radikali međusobnim reakcijama daju 3-nitrotirozin i/ili ditirozin (Slika 26).



Slika 25. Nitrovanje, hlorovanje i oksidacija tirozina, reakcijom nitrita i hipohloraste kiseline. (A) Pretpostavljeni mehanizam nastajanja nitril hlorida u reakciji nitrita i hipohloraste kiseline. (B) Mehanizam modifikacije tirozina sa ClNO_2 . Polazna reakcija obuhvata transfer jednog elektrona i nastajanje tirozil radikala, radikala hlora i nitrita. Reakcijom A nastaje 3-hlorotirozin, a u reakciji B nastaju hlorid i tirozil radikal. Kombinacijom tirozil radikala i NO_2^\bullet nastaje 3-nitrotirozin (Reakcija C), dok kombinacijom dva tirozil radikala nastaje 3,3'-ditirozin (Reakcija D) (Eiserich et al., 1998).



Slika 26. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja 3-nitrotirozina katalizom pomoću hem-peroksidaza. Kooperativna oksidacija nitrita i tirozina, koja se odigrava na nezavisnim aktivnim centrima enzima, dovodi do stvaranja 3-nitrotirozina (Eiserich et al., 1998).

U prilog navedenim mehanizmima mogu se navesti visoke koncentracije nitrita u biološkim sistemima, koje zavise od aktivnosti NOS-a. Nitriti su detektovani u raznim ekstraćelijskim tečnostima kao što su plazma (0,5-3,6 μM), želudačni sok (0,4-60 μM), pljuvačka (30-210 μM), alveolarna epitelna tečnost (10-20 μM) (Van der Vliet et al., 1997; Eiserich et al., 1998). 3-Nitrotirozin i visok nivo MPO detektovani su u aterosklerotičnim lezijama (Beckman et al., 1994; Leeuwenburgh et al., 1997), reumatoidnom artritisu (Kaur and Halliwell, 1994) i akutnoj pulmonarnoj inflamaciji (Haddad et al., 1994; Saleh et al., 1998). U prilog MPO-zavisnom mehanizmu nitrovanja tirozina u neurološkim bolestima može se navesti zapažanje da su mikroglijalne ćelije u lezijama humane multiple skleroze imunoreaktivne na iNOS, 3-nitrotirozin i MPO (Bagasra et al., 1995; van der Veen et al., 1997). Pored toga, u aterosklerotičnim lezijama je detektovan i 3-hlorotirozin, specifični marker oksidacionog hlorovanja katalizovanog MPO (Hazen et al., 1997). Na smanjenje kapaciteta nitrovanja, mehanizmima zasnovanim na produkciji NO_2Cl , može uticati prisustvo GSH, amina i askorbata, koji reaguju sa NO_2Cl (Folkes et al., 1995), ili prisustvo oksihemoglobina, koji reaguje sa nitritima (Eiserich et al., 1998).

3 NAŠI RADOVI

Po važećem modelu, azot monoksid slobodno difunduje u biološkoj sredini dok ne izreaguje sa nekom od svojih meta (Odeljak 2.4). U ovim reakcijama NO može da pređe u svoje redoks-srodnike, nitrozonijum (NO^+) i nitroksil (HNO/NO^-) vrste, koje su znatno reaktivnije od samog NO. Smatra se da pri razmatranju bioloških funkcija NO, pored samog NO, treba uzeti u obzir i ove njegove redoks-srodnike (Odeljak 2.4.3). Ovo nameće potrebu izučavanja biološki relevantnih mehanizama nastajanja i reakcija NO^+ i HNO/NO^- vrsta, što je bio i predmet rada ove doktorske teze. Zbog svoje velike reaktivnosti ove vrste se ne mogu direktno detektovati, nego se njihova identifikacija vrši na osnovu karakterističnih proizvoda, kao što su nitriti i S-nitrosotiolii (proizvodi NO^+ sa vodom, odnosno tiolima) i hidroksilamin (proizvod reakcije HNO/NO^- sa tiolima) (Odeljak 2.4.3.2).

NO^+ , NO i NO^- se mogu posmatrati i kao analozi redoks formi kiseonika: O_2 , O_2^- i O_2^{2-} . Međutim, za razliku od superoksid anjon radikala (O_2^-) koji reakcijom dismutacije daje O_2 i O_2^{2-} (H_2O_2), NO sam ne podleže reakciji dismutacije. Azot monoksid pokazuje jak afinitet za jone prelaznih metala, pri čemu nastaju metal-nitrozil kompleksi. Azot monoksid, kompleksiran za metalni jon, može biti (ređe) neutralan ili pak, u zavisnosti od toga da li se u datom kompleksu NO ponaša kao donor ili akceptor elektrona u odnosu na metalni jon, pokazivati (veći ili manji) karakter nitrozonijum (NO^+) odnosno nitroksilnog (NO^-) jona (Odeljak 2.4) (Slika 19).

Činjenica da je agregiranje, nitrovanje i inaktivacija MnSOD nađena u raznim oboljenjima za koja je karakterističan oksidativni stres i povećana produkcija NO (Odeljak 2.3.1.3) ukazuje da je ovaj enzim meta za RNOS. Pretpostavili smo da bi superoksid dismutaze mogle da pokazuju sposobnost vezivanja NO, te da bi NO vezan za metalni centar u enzimu mogao imati (u zavisnosti od redoks stanja metalnog centra) NO^+ i/ili NO^- karakter. Nastala(e) reaktivne vrste bi mogle *in situ* reagovati sa aminokiselinskim ostacima, što će za posledicu imati inaktivaciju enzima. Zbog toga smo u ovom radu ispitivali sposobnost sve tri klase SOD: Cu/ZnSOD, MnSOD, FeSOD (*E.coli*) i FeSOD (*P.leiognathi*) da izvrše transformaciju NO, u NO^+ i/ili NO^- vrste, a potom smo na primeru MnSOD (*E.coli*) detaljnije izučavali prirodu hemijskih modifikacija enzima izazvanih generisanim reaktivnim vrstama. Došli smo do potpuno novog saznanja da MnSOD i

FeSOD, za razliku od Cu/ZnSOD, katalizuju transformaciju NO u NO⁺ i NO⁻ vrste (2NO → NO⁺ + NO⁻) i predložili naziv dismutacija NO za ovu metal-posredovanu redoks transformaciju azot monoksida.

Zbog značaja NO⁺ i HNO/NO⁻ vrsta za NO-posredovane procese (Odeljak 2.4.3) tragali smo za drugim metalnim centrima koji bi mogli da katalizuju dismutaciju NO u biološkim sistemima. Pošli smo od pretpostavke da je "slobodno" gvožđe (joni Fe²⁺ i Fe³⁺ u biološkim sistemima kompleksirani u nestabilne komplekse male molekulske mase, ili labilno vezani za proteine) najpodesnije za ova istraživanja.

Dobro je utvrđeno da "slobodno" gvožđe reaguje sa NO u biološkim sistemima, pri čemu nastaju dinitrozil kompleksi (DNIC), tipa (NO⁺)₂Fe(I)L₂. Hemijski eksperimenti su pokazali da DNIC nastaju u neutralnim rastvorima Fe(II), NO i niza anjonskih liganada (L), uključujući aminokiseline, peptide i proteine (Odeljak 2.4). U biološkim sistemima su detektovani DNIC sa tiolnim ligandima (Odeljak 2.3.1.2). NO grupe u DNIC male molekulske mase imaju karakter nitrozonijum (NO⁺) jona, što omogućuje reakciju S-nitrozilovanja. Pokazano je da tragovi gvožđa, prisutni u neutralnim rastvorima tiola male molekulske mase i azot monoksida, kao i "slobodno" gvožđe katalizuju DNIC-inicirano S-nitrozilovanje (Odeljak 2.3.1.2 i Odeljak 2.4). S obzirom da mehanizam nastajanja DNIC obuhvata i redukciju NO u HNO/NO⁻ (Odeljak 2.4), pretpostavili smo da tragovi gvožđa u hemijskim, odnosno "slobodno" gvožđe u biološkim sistemima mogu da katalizuju reakciju dismutacije NO.

U ovom radu smo proširili ranija istraživanja u kojima je DNIC inicirana transformacija NO u NO⁺ demonstrirana nastajanjem RSNO u neutralnim rastvorima NO, tiola male molekulske mase (cistein, GSH) i katalitičkih količina Fe(II) (Vanin et al., 1997; Vanin, 1998; Vanin et al., 2002) na nastajanje hidroksilamina (karakterističnog proizvoda HNO/NO⁻ u reakciji sa tiolima) (Odeljak 2.4.3.3). Pored toga ispitivali smo efekte biološki relevantnih anjonskih liganada, kao što su proteinski tioli, mokraćna kiselina i aminokiseline, na dismutaciju NO katalizovanu jonima gvožđa. Aminokiseline su široko rasprostranjene u biološkim sistemima, a mokraćna kiselina, koja je anjon na fiziološkom pH (i zbog toga potencijalni ligand za DNIC!), je jedan od najvažnijih liganada za "slobodno" gvožđe (Odeljak 2.3.1.2).

Potencijalni biološki značaj dobijenih rezultata proverili smo u *ex vivo* eksperimentima u kojima smo koristili cerebrospinalnu tečnost

(CSF) zdravih osoba i osoba obolelih od sporadičnog oblika amiotrofične lateralne skleroze (SALS). CSF sadrži "slobodno" gvožđe, MnSOD, tragove GSH i znatne količine niskomolekulskih anjonskih konstituenata, kao što su aminokiseline i mokraćna kiselina (Lentner, 1981), koji su potencijalni ligandi za DNIC. Azot monoksid se generiše u mozgu pod normalnim uslovima, a njegova produkcija je povećana u raznim neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i amiotrofičnu lateralnu sklerozu (Odeljak 2.2.2). Nađeno je da je MnSOD jedini nitrovani protein (Odeljak 2.3.1.3), dok su metaboliti azot monoksida, nitrit i 3-nitrotirozin, povećani u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata obolelih od neurodegenerativnih oboljenja, kao što je amiotrofična lateralna skleroza (SALS) (Odeljak 2.2.2). Zbog svega navedenog može se pretpostaviti da NO iz moždanog tkiva difunduje u CSF, gde podleže dismutaciji katalizovanoj "slobodnim" gvožđem i (eventualno) MnSOD, što doprinosi nastajanju navedenih metabolita NO. Nivo antioksidanasa (proteinske SH grupe, urat i askorbat koji su efikasni hvatači NO^+ i HNO/NO^- vrsta) se razlikuje kod pacijenata obolelih od neurodegenerativnih oboljenja (Odeljak 2.2.2), što može da utiče kako na stepen tako i na efekte dismutacije NO katalizovane "slobodnim" gvožđem. Zbog toga smo prvo analizirali navedene antioksidante u CSF uzorcima zdravih osoba i osoba obolelih od amiotrofične lateralne skleroze, a potom smo analizirali proizvode i efekte NO dismutacije u CSF uzorcima, nakon njihovog *ex vivo* inkubiranja sa azot monoksidom.

3.1 MnSOD (*E.coli*) i FeSOD, ali ne Cu/ZnSOD, katalizuju dismutaciju NO u NO^+ i NO^- vrste

U ovom radu su korišćeni uzorci Cu/ZnSOD (*Bovine*), MnSOD i FeSOD (*E.coli*) i FeSOD (*P.leiognathi*) (Odeljci 2.3.1.3 i 4.1), koji su tretirani azot monoksidom pod striktno anaerobnim uslovima. Sposobnost enzima da katalizuje transformaciju NO u NO^+ odnosno NO^- praćena je na osnovu određivanja karakterističnih proizvoda ovih reaktivnih vrsta: nitrita, proizvoda reakcije NO^+ sa vodom, i (u prisustvu dodatog cisteina) hidroksilamina, proizvoda reakcije HNO/NO^- sa tiolima (Odeljak 2.4.3.2 i 2.4.3.3). Modifikacije enzima su detektovane na osnovu elektroforetskih ispitivanja i određivanja bočnih ostataka pojedinih aminokiselina. Posebna pažnja je posvećena detektovanju nitrovanja ostataka tirozina u MnSOD tretiranoj azot monoksidom.

3.1.1 NO izaziva ireverzibilnu inaktivaciju MnSOD i FeSOD, ali ne i Cu/ZnSOD

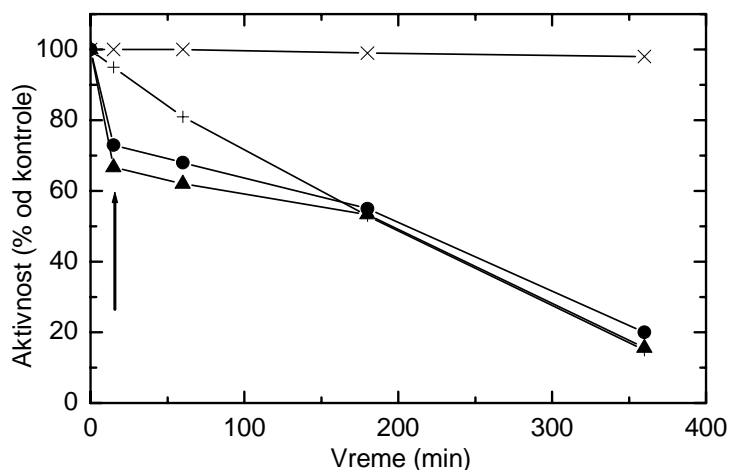
Deaerisani (argonom tretirani) rastvori enzima u fosfatnom puferu neutralnog pH, u koji je dodata 0,5 mM EDTA radi kompleksiranja jona gvožđa prisutnih kao onečišćenje u rastvoru (Odeljak 4.5), zasićeni su gasovitim NO (Odeljak 4.6) i inkubirani tokom različitih vremenskih intervala (15 min. do 6 sati) na sobnoj temperaturi. Nakon inkubiranja, višak NO je odstranjen propuštanjem argona kroz sistem, u sveže-tretiranim uzorcima je određivana aktivnost enzima (Odeljak 4.7), a preostali rastvori su zamrznuti (-20 °C) i korišćeni po potrebi u daljem radu.

Rezultati analize specifične aktivnosti (U/mg proteina) SOD nakon tretiranja enzima azot monoksidom u vremenskim intervalima od 15 minuta do 6 sati prikazani su u tabeli 5, a procentualno smanjenje aktivnosti pod istim uslovima paralelno je prikazano i na slici 27.

Tabela 5. Određivanje specifične aktivnosti SOD (U/mg proteina) nakon tretiranja uzoraka enzima azot monoksidom.

	+ NO (0')	+ NO (15')	+ NO (60')	+ NO (180')	+ NO (360')
FeSOD (<i>P.leiognathi</i>)	564 ± 25	412 ± 22	384 ± 20	310 ± 20	113 ± 13
FeSOD (<i>E.coli</i>)	415 ± 20	394 ± 17	336 ± 19	220 ± 12	62 ± 10
MnSOD (<i>E.coli</i>)	1930 ± 34	1287 ± 38	1197 ± 30	1029 ± 25	301 ± 16
Cu/ZnSOD (Goveđa)	5652 ± 52	5612 ± 36	5604 ± 27	5595 ± 23	5539 ± 18

Rastvori enzima (3-5 µM po monomeru) u 50 mM kalijum fosfatnom puferu pH 7,4 koji je sadržavao 0,5 mM EDTA su deaerisani provođenjem argona, a potom izloženi zasićenom rastvoru NO (oko 1,7 mM) (Bonner & Stedman, 1996). Nakon navedenih vremenskih intervala, višak NO je odstranjen propuštanjem argona kroz sistem i aktivnost u uzorcima određena je kao što je opisano u Eksperimentalnom delu (Odeljak 4.7). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SD$; n = 5.



Slika 27. Inaktivacija SOD u zavisnosti od vremena izlaganja NO: (●) FeSOD (*P. leiognathi*); (▲) MnSOD (*E. coli*); (+) FeSOD (*E. coli*); (x) goveđa Cu/ZnSOD. Strelicom je označeno vreme u kojem je zabeležen najveći pad aktivnosti enzima. Rastvori enzima (3-5 μM po monomeru) u 50 mM kalijum fosfatnom puferu pH 7,4 koji je sadržavao 0,5 mM EDTA su deaerisani provođenjem argona, a potom izloženi zasićenom rastvoru NO (oko 1,7 mM) (Bonner & Stedman, 1996). Nakon navedenih vremenskih intervala, višak NO je odstranjen propuštanjem argona kroz sistem i aktivnost u uzorcima određena je kao što je opisano u Eksperimentalnom delu (Odeljak 4.7).

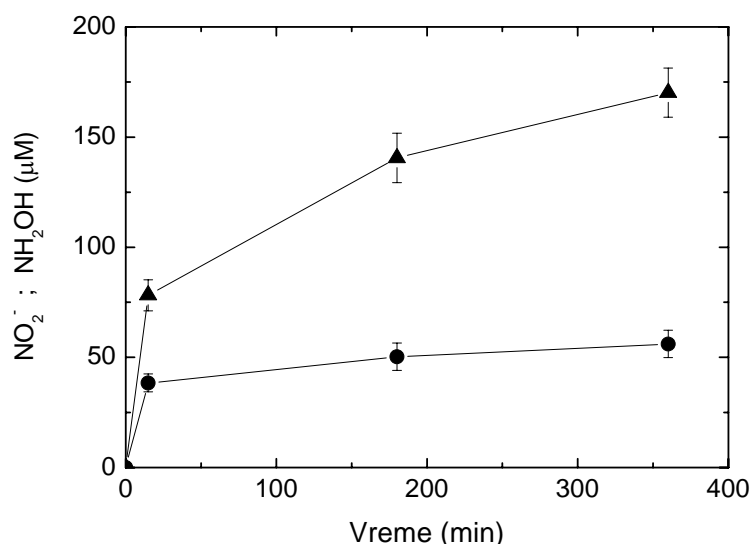
Aktivnost kontrolnih uzoraka, koji su umesto sa NO tretirani argonom pod istim uslovima, neznatno se smanjila: posle 6 sati aktivnost Cu/ZnSOD se smanjila za za 6%, a aktivnosti MnSOD i FeSOD za oko 10%. Iz tabele 5 i sa slike 27 vidi se da Cu/ZnSOD ne pokazuje značajnu promenu aktivnosti, čak i posle šest sati inkubiranja u zasićenom rastvoru NO (smanjenje aktivnosti je svega 2% u odnosu na kontrolni uzorak). Neosetljivost Cu/ZnSOD na NO se može objasniti time da enzimi sa jonima bakra u aktivnim centru ne vezuju NO (Wever et al., 1973).

Aktivnosti MnSOD (*E. coli*) i FeSOD (*P. leiognathi*) se znatno smanjila nakon inkubiranja sa NO: posle šest sati inkubiranja sa NO aktivnost ovih enzima je pala na oko 15% od kontrolne vrednosti. Aktivnosti enzima MnSOD (*E. coli*) i FeSOD (*P. leiognathi*), ali ne i FeSOD (*E. coli*) najbrže su opale (za oko 30%) tokom prvih 15 minuta tretiranja sa NO. Slični rezultati su dobijeni sa enzimskim preparatima koji su pokazivali različite specifične aktivnosti (na primer u slučaju MnSOD (*E. coli*), od 3120 do 960 U/mg).

3.1.2 MnSOD i FeSOD katalizuju konverziju (dismutaciju) NO u NO⁺ i NO⁻ vrste

Generisanje NO⁺ u uzorcima SOD tretiranim azot monoksidom je dokazano na osnovu nastajanja nitrita: proizvoda reakcije NO⁺ sa vodom

(Odeljak 2.4.3.2). Da je generisanje NO^+ praćeno stvaranjem NO^- vrste dokazano je određivanjem hidrosilamina u reakcionoj smeši u kojoj je pre izlaganja NO dodat cistein (Odeljak 2.4.3.3). Rezultati određivanja nitrita i hidrosilamina u rastvorima MnSOD tretiranih azot monoksidom prikazani su na slici 28.



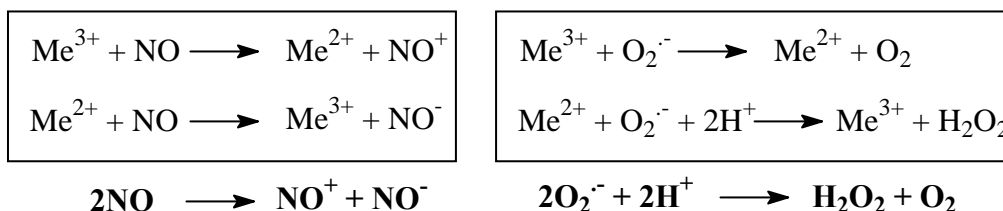
Slika 28. Produkcija nitrita (▲) i hidrosilamina (●) u MnSOD (*E.coli*) (5 μM po monomeru) tretiranoj sa NO (1,7 mM). Hidrosilamin je određivan u reakcionoj smeši u koju je dodat cistein (1 mM) pre izlaganja NO . Za eksperimentalne uslove videti legendu ispod slike 27. Rezultati su dati kao $\bar{X} \pm \text{SD}$; n=5.

Sa slike 28 se vidi da je brzina nastajanje ovih proizvoda najveća tokom prvih 15 minuta izlaganja uzoraka enzima azot monoksidu. Ovaj efekat se može objasniti pretpostavkom da se deo generisanih NO^+ i NO^- vrsta troši (u sporijim) reakcijama sa aminokiselinskim ostacima molekula enzima (Odeljak 3.1.3). Modifikacije bočnih ostataka aminokiselina objašnjavaju ireversibilnu prirodu inaktivacije SOD pod uticajem NO .

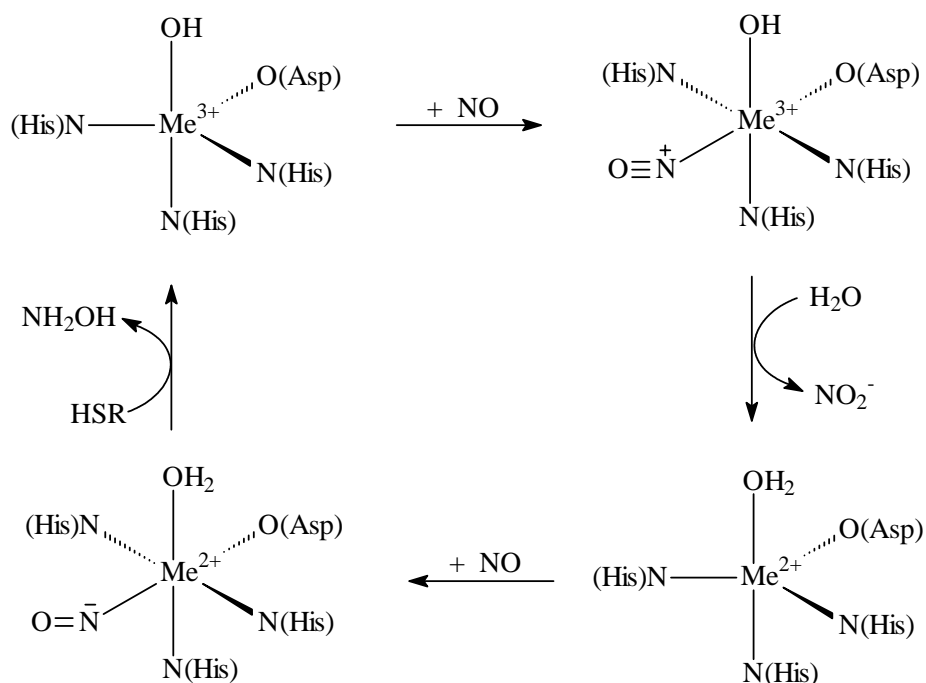
Poređenjem količine nastalih nitrita (do 200 μM) i hidrosilamina (do 50 μM) (Slika 28) sa količinom SOD u reakcionoj smeši (5 μM po monomeru) vidi se da je reakcija transformacije NO u NO^+ i NO^- vrste katalitičke prirode. Neophodnost prisustva metalnog centra u enzimu za redoks transformaciju NO potvrđena je eksperimentima u kojima je pod istim uslovima apoMnSOD (Niketić et al., 1999) izložena azot monoksidu. U ovim eksperimentima nisu detektovane ni značajne količine nitrita i hidrosilamina, niti modifikacije bočnih aminokiselinskih ostataka u enzimu (Odeljak 3.1.3).

Poznato je da, nasuprot $\text{O}_2^{\cdot-}$, sam NO ne pokazuje sposobnost dismutacije (Odeljak 2.4.3). Na osnovu svega izloženog proizilazi da

MnSOD (*E.coli*) i FeSOD katalizuje konverziju NO u NO⁺ i NO⁻ vrste. Pretpostavili smo katalitički mehanizam ove reakcije (šema 5, Slika 29) analogan sa katalitičkim mehanizmom dismutacije O₂⁻ (Slika 15, Odeljak 2.3.1.3). Zbog toga smo predložili naziv "dismutacija NO" za ovu metal-posredovanu katalitičku konverziju NO u NO⁺ i NO⁻ vrste (Niketić et al., 1998).



Šema 5. Dismutacije O₂⁻ u O₂ i H₂O₂ katalizovana jonima metala i analogna reakcija dismutacije NO u NO⁺ i NO⁻ vrste.



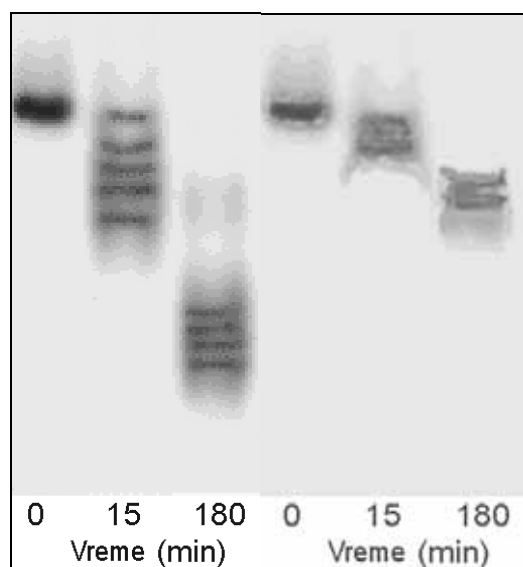
Slika 29. Pretpostavljeni mehanizam katalize dismutacije NO uz pomoć MnSOD (*E.coli*) i FeSOD.

3.1.3 Inaktivacija MnSOD (*E.coli*) i FeSOD posledica je ekstenzivnih modifikacija molekula enzima

Fragmentacija polipeptidnog niza i modifikacije amino grupa

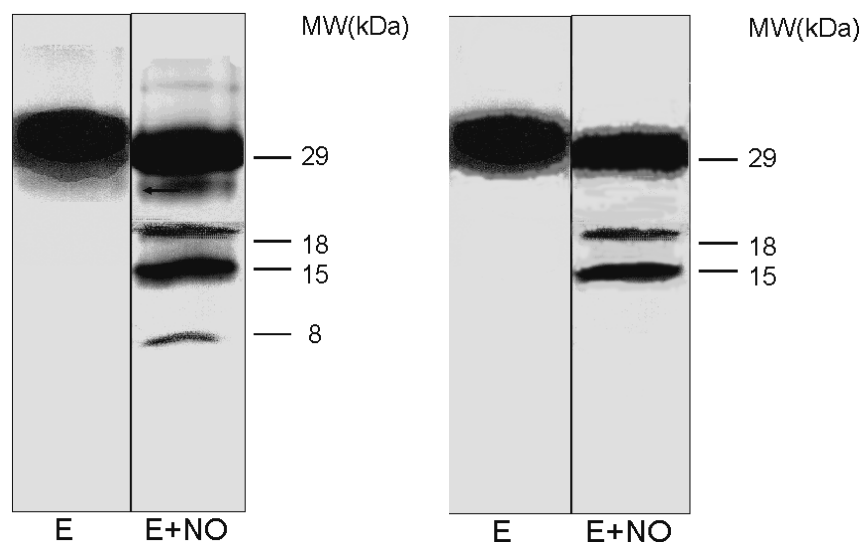
Elektroforegrami (PAGE i SDS-PAGE) uzoraka Cu/ZnSOD tretiranih azot monoksidom nisu se razlikovali od elektroforegrama kontrolnih uzoraka, što potvrđuje da pri izlaganju NO nije došlo do strukturnih

promena u molekulu Cu/ZnSOD. Međutim, elektroforetske analize pokazuju da reaktivne NO⁺ i NO⁻ vrste, generisane pri tretiranju MnSOD (*E.coli*) i FeSOD azot monoksidom, izazivaju ekstenzivne modifikacije molekula enzima. PAGE (na pH 8,8) tretiranih enzima pokazuje trake znatno većih pokretljivosti u odnosu na trake detektovane u kontrolnim uzorcima (Slika 30). Ovo se može objasniti reakcijom generisanih NO⁺ i NO⁻ vrsta sa amino grupama iz proteina (Odeljak 2.4.3). Analizom amino grupa (Odeljak 4.16) u MnSOD nađeno je $15,85 \pm 0,68$ po molekulu MnSOD monomera, što odgovara zbiru amino grupa iz slobodne N-terminalne α -amino grupe i 15 ostataka lizina u aminokiselinskoj sekvenci MnSOD (Slika 32). Posle tretiranja azot monoksidom broj slobodnih amino grupa je opao na $10,12 \pm 0,51$ po monomeru MnSOD.



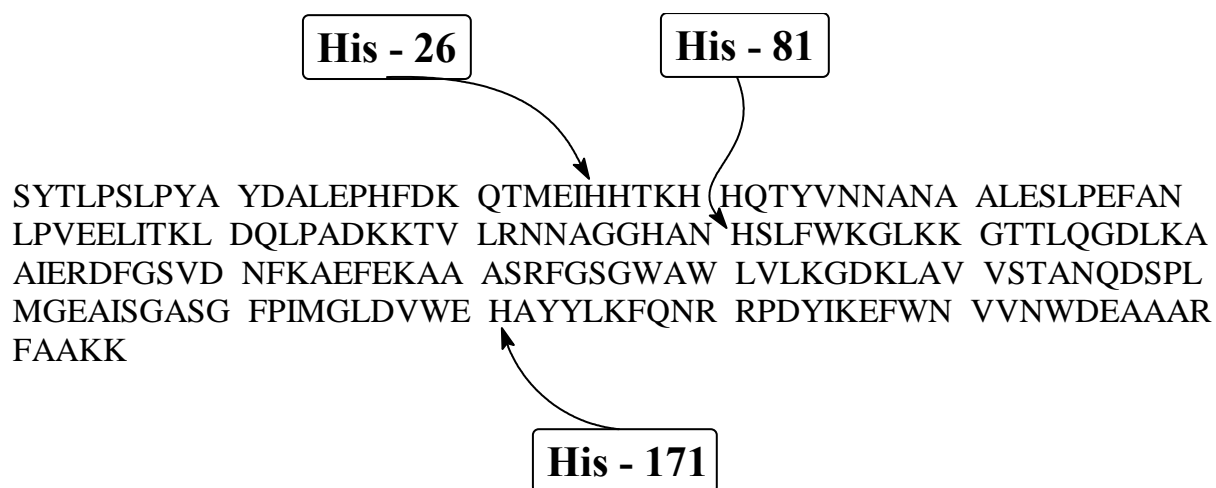
Slika 30. PAGE elektroforegram uzoraka MnSOD (*E.coli*) i FeSOD (*P.leiognathi*) izloženih NO (15 i 180 min) u poređenju sa kontrolom (0). Za eksperimentalne uslove videti legendu ispod tabele 5 i slike 27. Alikvoti uzoraka ($5 \mu\text{M}$ po monomeru) su nanešeni na ploču, a izazivanje je vršeno bojenjem sa srebrom (Odeljak 4.19).

SDS PAGE (20% gel) elektroforegram MnSOD (*E.coli*) i FeSOD (*P.leiognathi*) tretiranih azot monoksidom pokazuju, pored glavne trake koja odgovara SOD monomeru, prisustvo traka (20-30% od ukupnog enzima) koje odgovaraju polipeptidnim nizovima manjih (8-18 kDa) molekulskih masa (Slika 31). Prisustvo ovih traka nije zapaženo u FeSOD (*E.coli*) tretiranoj azot monoksidom.



slika 31. SDS-PAGE (20% gel) elektroforegram uzoraka MnSOD (*E.coli*) i FeSOD (*P.leiognathi*) izloženih NO (E+NO) u poređenju sa kontrolom koja nije tretirana sa NO (E). Uzorci enzima (5 μ M po monomeru) su inkubirani sa NO tokom 15 minuta, pod eksperimentalnim uslovima datim u legendi ispod tabele 5 i slike 27. Alikvoti (5 μ g proteina) su nanešeni na ploču, i bojenje je vršeno srebrom (Odeljak 4.19).

Na osnovu molekulskih masa fragmenata može se pretpostaviti da do fragmentacije molekula SOD dolazi na mestu histidinskih ostataka u aktivnom centru enzima (Odeljak 2.3.1.3). Izračunate molekulske mase fragmenata, koji bi nastali raskidanjem polipeptidnog niza na ostacima histidina u aktivnom mestu enzima (Slika 32) iznose od 20 do 3 kDa, što je u dobrom slaganju sa rezultatima SDS-PAGE sa slike 31. Fragmenti molekulske mase manje od 8 kDa nisu detektovani SDS-elektroforezom, verovatno usled njihovog malog prinosa i male mase.

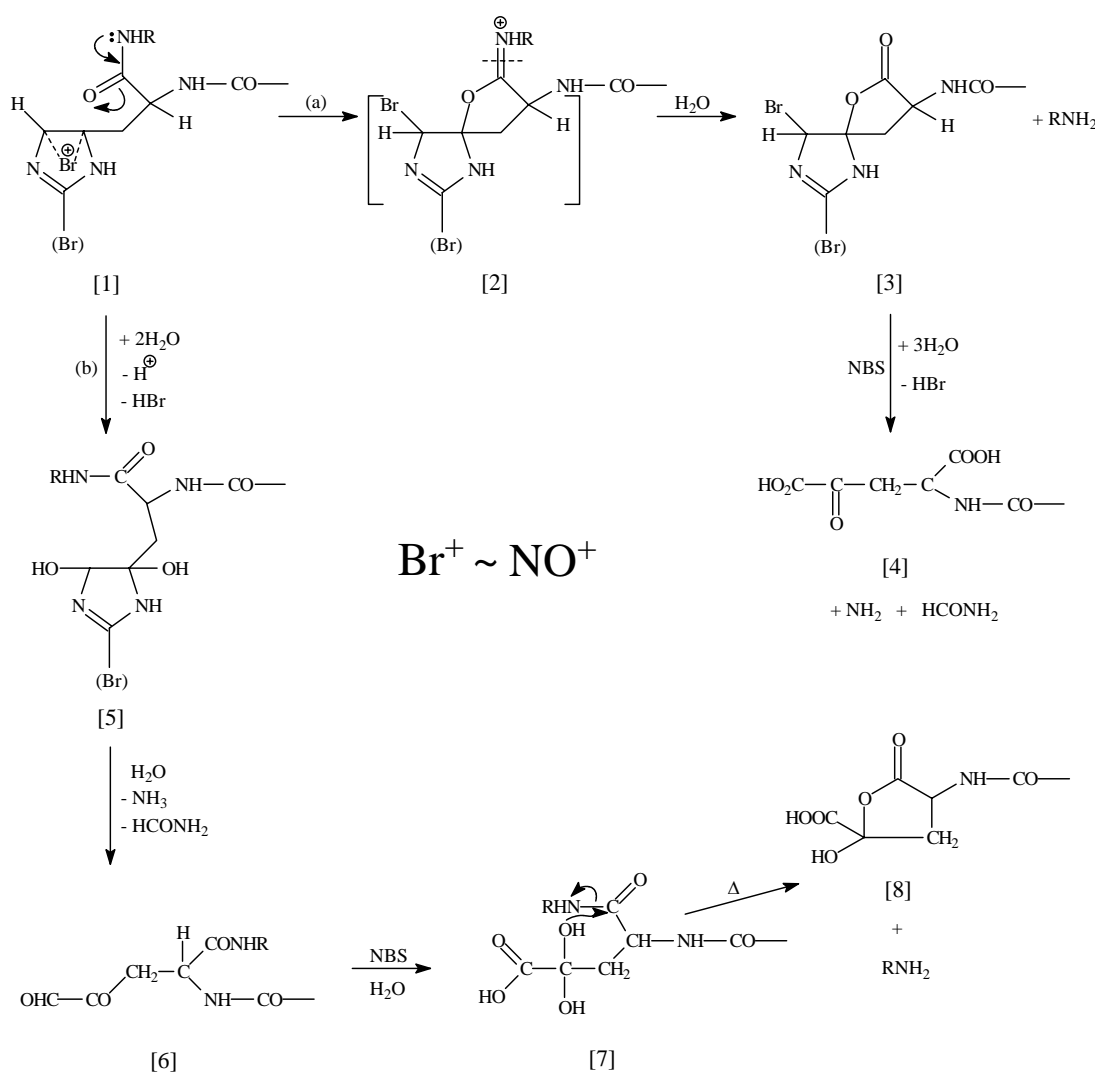


slika 32. Aminokiselinska sekvenca MnSOD (*E.coli*) sa obeleženim ostacima His koji se koordinuju za metal u aktivnom centru.

Fragmentacija polipeptidnog niza na ostacima histidina u aktivnom centru enzima može se objasniti dejstvom NO^+ po analogiji sa dobro

poznatom reakcijom fragmentacije polipeptidnog niza na ostacima histidina sa Br^+ (Slika 33) (Spande et al., 1970).

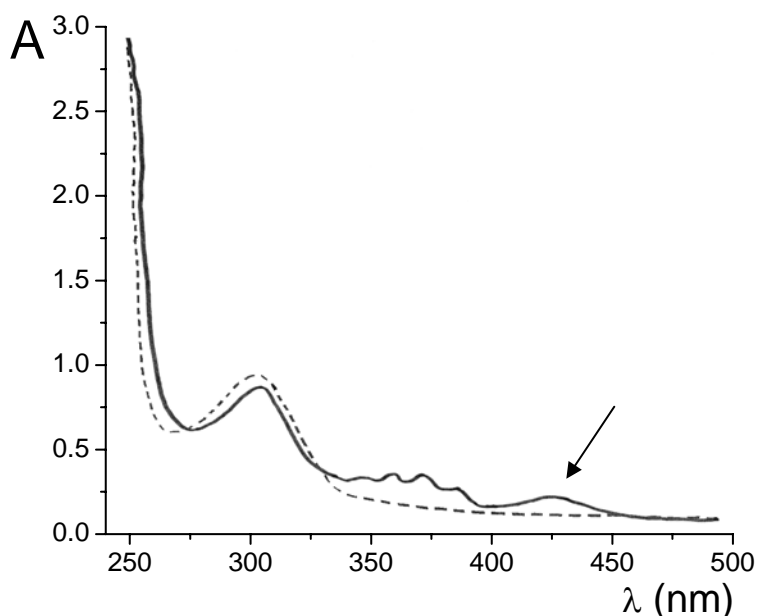
Činjenica da do fragmentacije polipeptidnog niza dolazi u MnSOD, ali ne u FeSOD (*E.coli*) je iznenađujuća, s obzirom na velike sličnosti u strukturi ova dva enzima (45% identične sekvence) i identičnost aktivnih mesta ova dva enzima (Odeljak 2.3.1.3). Očigledno ove razlike u ponašanju enzima potiču od finijih razlika u njihovim strukturama.



Slika 33. Fragmentacija polipeptidnog niza na ostacima histidina izazvana sa Br^+ (iz N-bromosukcinimida - NBS): (a) minorni put, [1] \rightarrow [4]; (b) glavni put [1], [5] \rightarrow [8] (Spande et al., 1970).

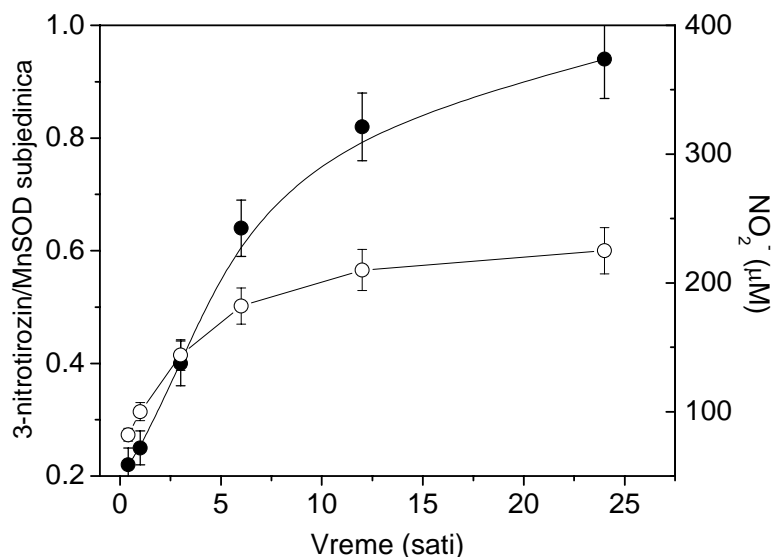
Nitrovanje i oksidacija ostataka tirozina u MnSOD (*E.coli*) tretiranoj azot monoksidom

Prisustvo ostataka 3-nitrotirozina detektovano je na osnovu karakterističnog maksimuma na 428 nm (u alkalnoj sredini) u apsorpcionom spektru MnSOD tretirane azot monoksidom (Slika 34) (Riordan & Vallee, 1972b). Ovo je potvrđeno i HPLC analizom hidrolizovanih uzoraka (Stojanović et al., 2005). Nitrovanje ostataka tirozina u MnSOD, u zavisnosti od vremena izloženosti azot monoksidu, prikazano je na slici 35. Na istoj slici je prikazano i određivanje nitrita u reakcionoj smeši, čije nastajanje prati nitrovanje enzima.



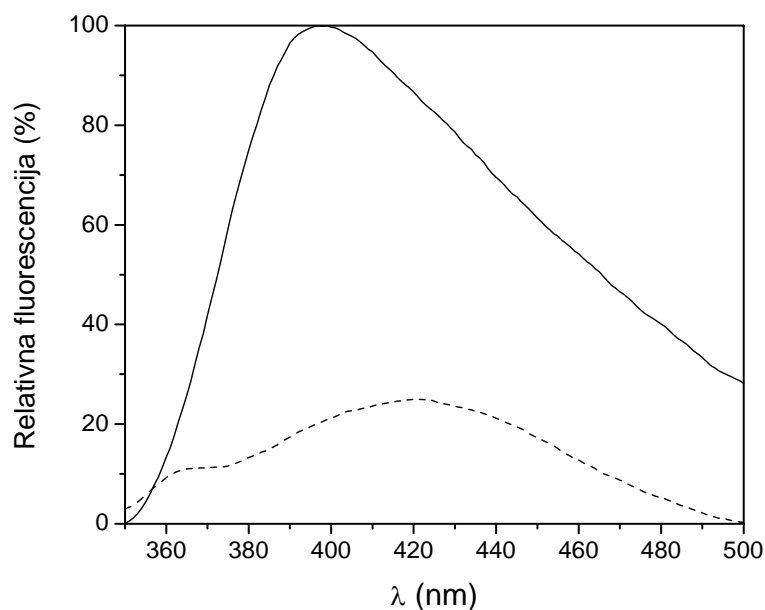
Slika 34. UV/VIS epektar uzoraka MnSOD (*E.coli*) pre (--) i posle tretiranja enzima azot monoksidom (—). Uzorci MnSOD (5 μ M po monomeru) su tretirani azot monoksidom tokom 15 minuta pod uslovima datim u legendi ispod tabele 5 i slike 27. pH rastvora je pre snimanja spektra podešeno na 9 dodatkom 1 M NaOH (Odeljak 4.14). Strelicom je označen maksimum na 428 nm, karakterističan za 3-nitrotirozin (Riordan & Vallee, 1972b).

Sa slike 35 se vidi da je nitrovanje MnSOD spor proces: maksimalno 1 ostatak nitrotirozina u MnSOD se nitruje nakon dužeg (24 sata) inkubiranja enzima sa NO. Sa slike 35 se takođe vidi da su količine nitrita nastale u reakcionoj smeši u dobroj korelaciji sa nitrovanjem ostataka tirozina u enzimu.



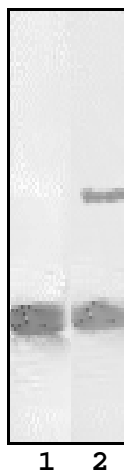
Slika 35. Nitrovanje ostataka tirozina u MnSOD (●) i nastajanje nitrita (○) u zavisnosti od vremena inkubiranja sa NO. Rastvor MnSOD (15 μM po monomeru) inkubiran je sa NO pod eksperimentalnim uslovima datim u legendi ispod tabele 5 i slike 27. 3-nitrotirozin je određivan spektrofotometrijski (Odeljak 4.14). Vrednosti na grafiku su prikazane kao $\bar{X} \pm SD$; n = 3.

3,3'-Ditirozin pokazuje u vodenom rastvoru pH 9 karakterističan fluorescentni spektar sa ekscitacijom na 325 nm i emisijom na 410 nm (Anderson, 1966; Lehrer & Fasman, 1967). Uzorak MnSOD tretiran azot monoksidom pokazivao je fluorescentni spektar navedenih karakteristika (Slika 36), na osnovu čega je zaključeno da je nitrovanje ostataka tirozina u enzimu praćeno oksidacijom ostataka tirozina do 3,3'-ditirozina.



Slika 36. Fluorescentni spektar uzoraka MnSOD (*E.coli*) pre (--) i posle (—) inkubiranja sa NO. Enzim (15 μM po monomeru) je inkubiran sa NO tokom 15 minuta pri eksperimentalnim uslovima datim u legendi ispod tabele 5 i slike 27. pH rastvora enzima je podešen na 9, dodatkom 1M NaOH; ekscitacija na 325 nm, emisija na 410 nm. Relativna fluorescencija je izražena u odnosu na pufer.

Nastajanje 3,3'-ditirozina zahteva povezivanje 2 ostatka tirozina koji se nalaze na površini molekula enzima, što će imati za posledicu nastajanje dimera. Zaista, SDS-PAGE (12% gel) MnSOD (*E.coli*) inkubirane sa NO pokazuje, pored glavne trake koja odgovara monomeru MnSOD (23 kDa), traku veće molekulske mase (46 kDa) koja odgovara dimeru enzima (Slika 37).

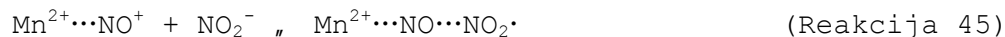
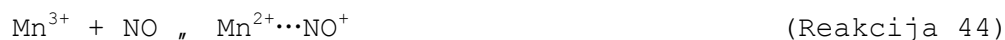


Slika 37. SDS-PAGE (12% gel) elektroforegram uzoraka MnSOD (*E.coli*) pre (1) i posle (2) inkubiranja sa NO. Uzorci MnSOD (15 μM po monomeru) inkubirani su sa NO tokom 15 minuta pod eksperimentalnim uslovima datim u legendi ispod tabele 5 i slike 27. Alikvoti rastvora (8 μg proteina) su nanešeni na ploču, a izazivanje je vršeno bojenjem sa srebrom (Odeljak 4.19).

Opisani rezultati ukazuju da u rastvoru MnSOD inkubirane sa NO nastaju reaktivne vrste sposobne da nitruju i oksiduju ostatke tirozina u molekulu enzima. Mehanizmi ovih reakcija ne mogu se za sada sa sigurnošću objasniti. Poznato je da oksidi azota nastali autooksidacijom azot monoksida mogu da izazovu nitrovanje ostataka tirozina (Odeljak 2.4.4). Činjenica da u apoMnSOD (Odeljak 4.2) inkubiranoj sa NO, nije detektovan 3-nitrotirozin ukazuje da pod primenjenim, striktno anaerobnim eksperimentalnim uslovima ne nastaju NO_x koji bi mogli da nitruju enzim. Reakcijom NO^+ sa fenolima nastaje C-nitroso proizvod, koji može biti oksidovan do nitro derivata (Odeljak 2.4.3.2). Međutim, ovaj reakcioni mehanizam za nitrovanje ostataka tirozina, pod primenjenim striktno anaerobnim uslovima, nije verovatan, zbog odsustva oksidanasa potrebnih za oksidaciju nitroso derivata.

Sve je više dokaza koji ukazuju na biološki relevantne mehanizme nitrovanja tirozina koji se zasnivaju na oksidaciji nitrita u $\text{NO}_2\cdot$ (Odeljak 2.4.4). Polazeći od činjenice da u rastvorima MnSOD inkubiranim sa NO nastaju značajne količine nitrita (Slika 35) pretpostavili smo da reakcijom nitrita sa NO^+ , vezanim za jon mangana, u aktivnom centru enzima može da nastane $\text{NO}_2\cdot$ (Reakcije 44 -

46). Nastali $\text{NO}_2\cdot$ će, prema reakcionim mehanizmima opisanim u odeljku 2.4.4 (Slika 25), izazvati nitrovanje ostataka tirozina u 3-nitrotirozin i oksidaciju do 3,3'-ditirozina.



Kandidat za nitrovanje je visoko konzervirani ostatak tirozina-34 koji se nalazi nekoliko angstrema udaljen od metalnog centra u MnSOD (Slika 14). Kovalentno vezivanje dva ostatka tirozina u 3,3'-ditirozin može verovatno da nastane između ostataka Tyr184 koji se nalaze na površini molekula MnSOD, međusobno udaljeni svega nekoliko angstrema (Edwards et al., 1998).

3.2 Dismutacija NO katalizovana jonima gvožđa

U ovom odeljku biće prikazani rezultati naših istraživanja dismutacije NO katalizovane jonima gvožđa. U ovom radu smo ranija istraživanja, u kojima je DNIC-inicirana transformacija NO u NO^+ demonstrirana nastajanjem RSNO u neutralnim rastvorima NO, tiola male molekulske mase (cistein, GSH) i katalitičkih količina Fe^{2+} (Vanin et al., 1997; Vanin, 1998; Vanin et al., 2002), proširili na nastajanje hidroksilamina (karakterističnog reakcionog proizvoda HNO/NO^- sa tiolima) (Odeljak 2.4.3.3). Pored toga ispitivali smo efekte biološki relevantnih anjonskih liganada, kao što su proteinski tioli, mokraćna kiselina i aminokiseline, na dismutaciju NO katalizovanu jonima gvožđa. -SH grupe iz proteina se smatraju dominantnim ligandima za DNIC u biološkim sistemima (Odeljak 2.3.1.2). Aminokiseline, koje takođe mogu biti ligandi u DNIC tipu kompleksa (Odeljak 2.4.3.1), su široko rasprostranjene u biološkim sistemima, a mokraćna kiselina, koja je anjon na fiziološkom pH (i zbog toga potencijalni ligand za DNIC!), je jedan od najvažnijih liganada za "slobodno" gvožđe (Odeljak 2.3.1.2).

3.2.1. Dismutacija NO katalizovana jonima gvožđa u prisustvu cisteina, GSH i proteinskih -SH grupa

Da bismo utvrdili da li joni gvožđa u prisustvu cisteina i GSH katalizuju dismutaciju NO u NO^+ i NO^- vrste, neutralni rastvori ovih tiola (u 50 mM kalijum fosfatnom puferu koji je sadržavao 1 μM jona

gvožđa) inkubirani su sa azot monoksidom pod anaerobnim uslovima, a potom su u reakcionoj smeši određivani hidroksilamin, RSNO i nitrit, karakteristični proizvodi NO^- , odnosno NO^+ vrsta (Odeljak 2.4.3.2 i 2.4.3.3). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Određivanje hidroksilamina, RSNO i nitrita u rastvorima jona gvožđa i GSH ili cisteina inkubiranih sa NO.

	NH_2OH (μM)	RSNO (μM)	NO_2^- (μM)
GSH / Fe^{2+} (1 μM)	n.d.	14 ± 3	26 ± 4
GSH / Fe^{2+} (5 μM)	n.d.	66 ± 5	51 ± 5
Cys / Fe^{2+} (1 μM)	4,6 ± 0,6	n.d.*	317 ± 14
Cys / Fe^{2+} (5 μM)	16,2 ± 0,8	n.d.*	1090 ± 73

U deaerisane rastvore GSH, ili cisteina (250 μM) u 50 mM kalijum fosfatnom puferu pH 7,4 koji je sadržavao 1 μM jona gvožđa, ili je gvožđe dodato u rastvor do krajnje koncentracije od 5 μM , uvođen je gasoviti NO tokom 15 minuta (koncentracija NO u zasićenom rastvoru \approx 1,7 mM) (Bonner & Stedman, 1996), posle čega je NO odstranjen propuštanjem argona. Hidroksilamin, RSNO i nitrit su određivani u reakcionoj smeši kao što je opisano u odeljcima 4.8, 4.9 i 4.11. Vrednosti su prikazane kao $\bar{X} \pm SD$; n = 3. *n.d. ispod granice detekcije.

Nakon 15 minuta inkubiranja rastvora GSH i jona gvožđa izreagovalo je 40% SH grupa iz GSH, uz nastajanje GSNO i nitrita (Tabela 6). Međutim, hidroksilamin nije detektovan u ovoj reakcionoj smeši. Pod identičnim eksperimentalnim uslovima izreagovalo je 90% SH grupa cisteina, dok je u reakcionoj smeši nađen hidroksilamin i značajno veća količina nitrita, u poređenju sa količinom nađenom u reakcionoj smeši sa GSH (Tabela 6). Zbog brzog razlaganja, katalizovanog jonima gvožđa (Vanin et al., 1997), Cys-NO zaostao u reakcionoj smeši nije bilo moguće odrediti primenjenom metodom u ovom radu (Odeljak 4.11).

Povećanje koncentracije tiola (do 1000 μM) nije značajno uticala na povećanje prinosa proizvoda (hidroksilamina, nitrozotiola i nitrita) (Slika 38). Međutim, povećanje koncentracije jona gvožđa, sa polazne (1 μM) na 5 μM , rezultovalo je u nastajanju značajno većih prinosa proizvoda u oba ispitivana sistema (Tabela 6). Dodatak 0,25 mM o-fenantrolina, selektivnog helatora za Fe^{2+} (Vanin et al., 1997), pre izlaganja reakcione smeše azot monoksidu, doveo je do potpunog blokiranja nastajanja GSNO i hidroksilamina, i značajnog smanjenja produkcije nitrita (13 ± 3 μM (n=9)). Ovi rezultati jasno ukazuju da joni gvožđa katalizuju dismutaciju NO u NO^+ i NO^- vrste. Mala količina nitrita (13 ± 3 μM (n=9)), detektovana u rastvorima inkubiranim sa NO u prisustvu o-fenantrolina, verovatno potiče od

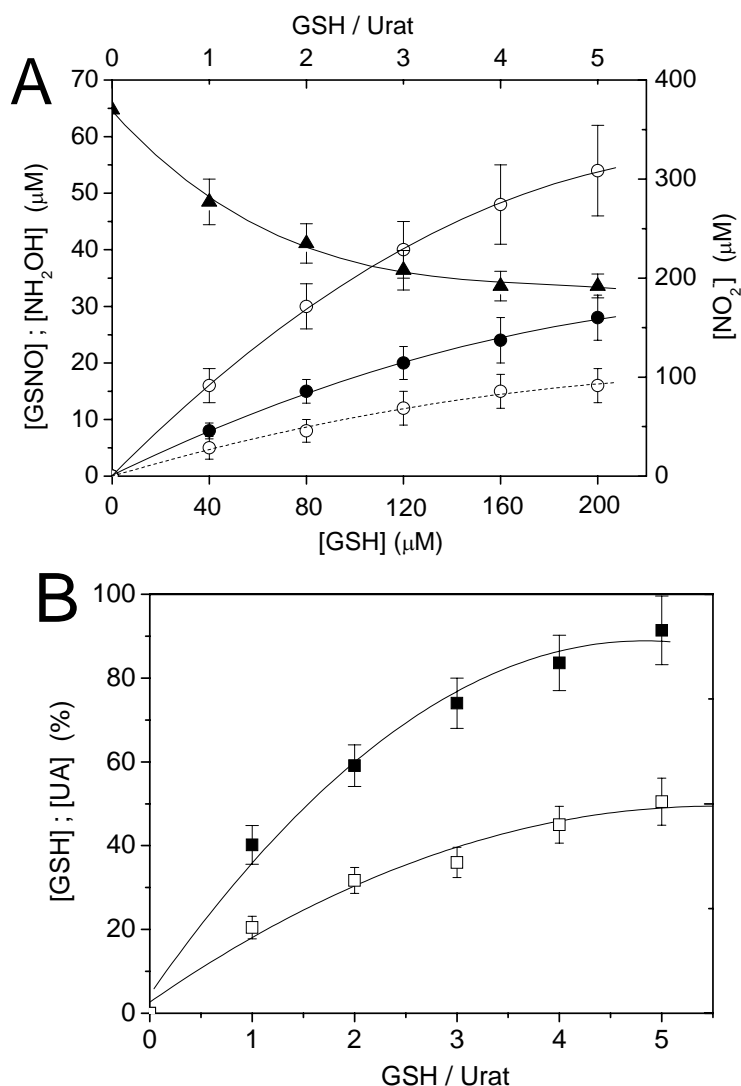
oksidacije azot monoksida tragovima kiseonika zaostalog u reakcionoj smeši.

3.2.2 Efekat urata na dismutaciju NO katalizovanu jonima gvožđa

Smatra se da je mokraćna kiselina jedan od najvažnijih liganada za vezivanje "slobodnog" gvožđa (Davies et al., 1986; Halliwell & Gutteridge, 1999). Na fiziološkom pH mokraćna kiselina je potpuno disosovana do urata. DNIC kompleksi sa uratom nisu poznati, ali može se pretpostaviti da urat kao anjon u neutralnom rastvoru može da bude ligand za labilne nitrozil komplekse DNIC tipa (Odeljak 2.4.3.1). S druge strane SH grupe iz proteina i glutaciona, dominantnog niskomolekulskog tiola u biološkim sistemima, predstavljaju ligande za DNIC u biološkim sistemima (Odeljak 2.3.1.2). Zbog toga smo u daljem radu ispitivali efekat urata na dismutaciju NO katalizovanu jonima gvožđa u prisustvu GSH i proteinskih -SH grupa.

U reakcionoj smeši, dobijenoj nakon inkubiranja rastvora glutaciona, jona gvožđa i mokraćne kiseline sa azot monoksidom, nađeni su 1,5 do 3 puta veći prinosi GSNO, a detektovan je i hidroksilamin (Slika 38A). Zapaženo je da pri ovim uslovima dolazi do raspadanja urata, dok višak GSH, koji je reaktivniji od urata, u reakcijama sa NO^+ i NO^- vrstama, štiti urat od raspadanja (Slika 38B). Opisani rezultati ukazuju na dvojakom ulogu mokraćne kiseline. Prvo, mokraćna kiselina može da bude ligand za nitrozil komplekse gvožđa DNIC tipa i to čak u prisustvu GSH koji se smatra dominantnim niskomolekulskim tiolnim ligandom za DNIC u biološkim sistemima (Odeljak 2.3.1.2). Drugo, mokraćna kiselina je efikasan hvatač generisanih RNOS.

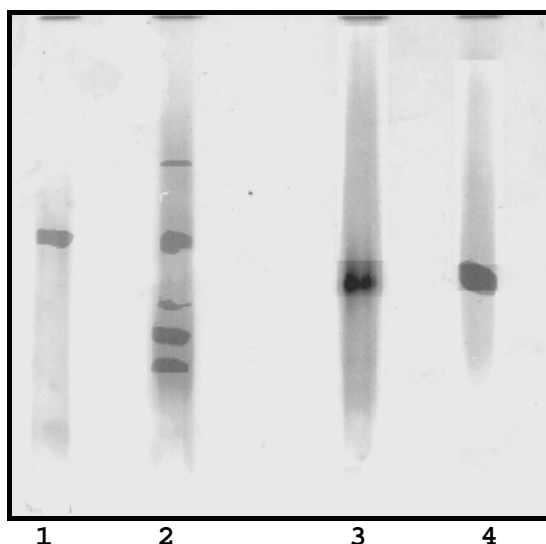
U daljim eksperimentima pokazano je da se mokraćna kiselina na isti način ponaša u prisustvu proteinskih tiola, dominantnih liganada za DNIC u biološkim sistemima (Odeljak 2.3.1.2). U ovim eksperimentima su kao izvor tiola korišćeni proteini sa slobodnim -SH grupama kao što su BSA i humani globin (dobijen nakon odvajanja hema od hemoglobina).



Slika 38. (A) Efekat urata na dismutaciju NO katalizovanu jonima gvožđa u prisustvu GSH; (—○—) GSNO nastao u rastvorima jona gvožđa i GSH inkubiranim sa NO; (○) GSNO, (▲) nitrit i (●) hidroksilamin nastao u rastvorima jona gvožđa i mokraćne kiseline u prisustvu različitih koncentracija GSH, nakon njihove inkubacije sa NO; **(B)** Razlaganje urata (■) i smanjenje SH grupa iz GSH (□) izraženi su kao procenat od početne koncentracije. Argonom tretirani rastvori GSH (0-200 μM) sa i bez urata (40 μM), u 50mM kalijum fosfatnom puferu pH 7,4 koji je sadržavao 1 μM jona gvožđa, zasićeni su azot monoksidom i inkubirani na 22 ± 2 °C tokom 15 minuta. Posle odstranjivanja NO argonom, reakcioni proizvodi su određeni kao što je opisano u Eksperimentalnom delu. Svaka tačka predstavlja $\bar{X} \pm SD$; n = 3.

BSA sadrži jednu slobodnu SH grupu po molekulu proteina, ali je sadržaj SH grupa u komercijalnim preparatima BSA niži (za oko 40%) od teorijske vrednosti (na primer Boese et al., 1995). U rastvoru BSA (180 μM) u 50 mM kalijum fosfatnom puferu, koji je sadržavao 5 μM jona gvožđa, nakon inkubiranja sa zasićenim rastvorom NO nije detektovano ni nastajanje S-nitrozotiola, niti hidroksilamina. Međutim, kada je pre inkubiranja sa NO u rastvor dodat urat (200 μM) nađeno je da je 15% cisteinskih ostataka u BSA (0,4 mol/mol BSA) S-nitrozilovano, a detektovan je i hidroksilamin (16 μM).

Molekul humanog hemoglobina sadrži reaktivnu SH grupu iz ostatka cisteina β -93. Da bismo izbegli efekte vezivanja NO za hem u hemoglobinu (Odeljak 2.3.1.1) u ovim eksperimentima smo koristili globin od kojeg smo prethodno pažljivo odvojili hem (Odeljak 4.3). U rastvoru humanog globina (1,1 mM) u 50 mM kalijum fosfatnom puferu koji je sadržavao 5 μ M jona gvožđa, nakon inkubiranja sa zasićenim rastvorom NO nije detektovano ni nastajanje S-nitrozotiola, niti hidroksilamina. Međutim, kada je pre inkubiranja sa NO u rastvor dodat urat (200 μ M) nađeno je 166 μ M S-nitrosotiola (0,2 mol/mol globina), a detektovan je i hidroksilamin (85 μ M). PAGE elektroforegram (Slika 39) uzoraka globina tretiranih sa NO u prisustvu jona gvožđa i urata pokazuju prisustvo niza traka veće pokretljivosti u odnosu na kontrolni uzorak koji je tretiran sa NO, ali bez dodatka urata. Ovi rezultati ukazuju da RNOS generisane u prisustvu urata reaguju sa amino grupama iz proteina, što izaziva promene u naelektrisanju i omogućuje razdvajanje modifikovanih proteina.



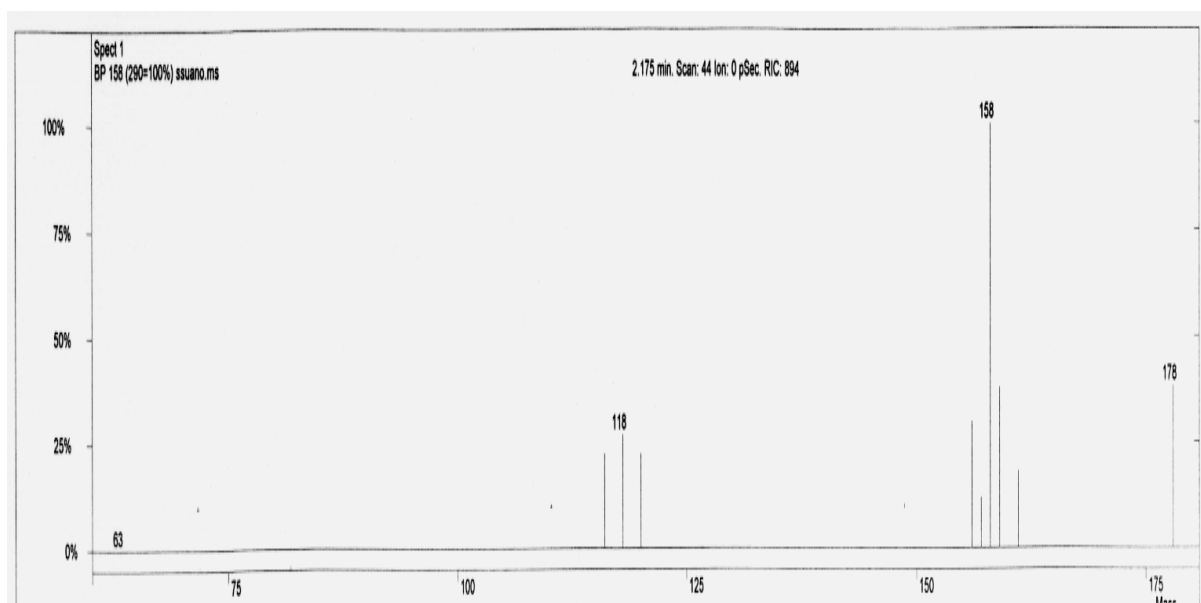
Slika 39. PAGE elektroforegram uzoraka globina inkubiranih sa NO bez (1) i sa (2) dodatkom urata. Poređenja radi dati su i uzorci hemoglobina (3) i hemoglobina tretiranog sa NO (4). Argonom tretirani rastvor globina (1,1 mM) sa i bez urata (400 μ M) u 50 mM kalijum fosfatnom puferu pH 7,4 koji je sadržavao 5 μ M jona gvožđa, zasićen je azot monoksidom i inkubiran na 22 ± 2 °C tokom 20 minuta, nakon čega je NO odstranjen argonom. Rastvori hemoglobina (2,7 mM) tretirani su na isti način. Na ploču su naneti alikvoti uzoraka (8 μ g proteina), a izazivanje je vršeno bojenjem srebrom (Odeljak 4.19).

Opisani rezultati ukazuju da u prisustvu proteinskih -SH grupa ne nastaju nitrozil kompleksi gvožđa koji katalizuju dismutaciju NO, te da se urat efikasno "takmiči" sa proteinskim -SH grupama za jone gvožđa u rastvoru, što rezultuje u nastajanju nestabilnih nitrozil kompleksa DNIC tipa, odnosno dismutaciji NO (Slika 22).

Preliminarno karakterisanje raspadnih proizvoda urata

Mokraćna kiselina se lako oksiduje, pri čemu nastaju alantoin, imidazoltrion i urea (Halliwell & Gutteridge, 1999). Reakcionu smešu dobijenu nakon inkubiranja rastvora mokraćne kiseline i jona gvožđa sa NO analizirali smo na prisustvo uree primenom ureaze, alantoina poređenjem UV i NMR spektra reakcione smeše sa standardom alantoina. Ni jedan od ovih sastojaka nije detektovan u reakcionoj smeši.

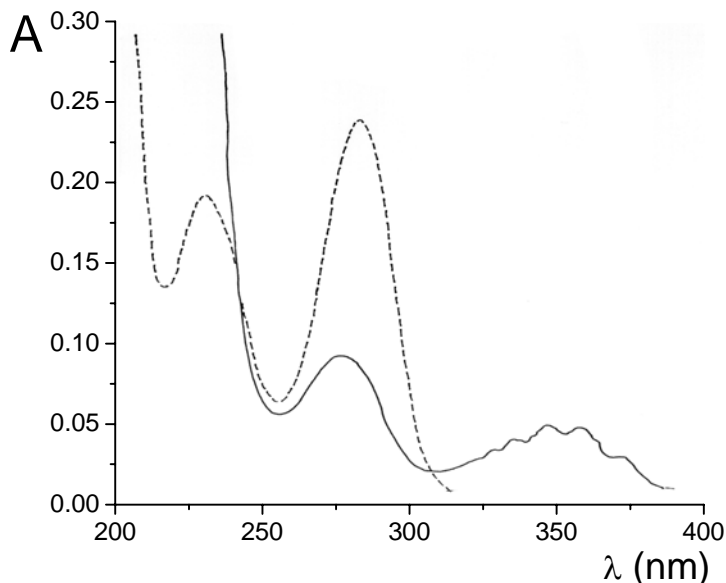
Na osnovu MS spektra detektovali smo prisustvo tri proizvoda u reakcionoj smeši: molekulskog jona m/z: 118, m/z: 158 i m/z: 178 (Slika 40). Na osnovu MS spektra sa slike 40 može se zaključiti da ni jedan od nastalih proizvoda ne odgovara reakcionom nitrozo/nitro derivatu mokraćne kiseline, koji nastaje u reakciji mokraćne kiseline sa peroksinitritom (Skinner et al., 1998).



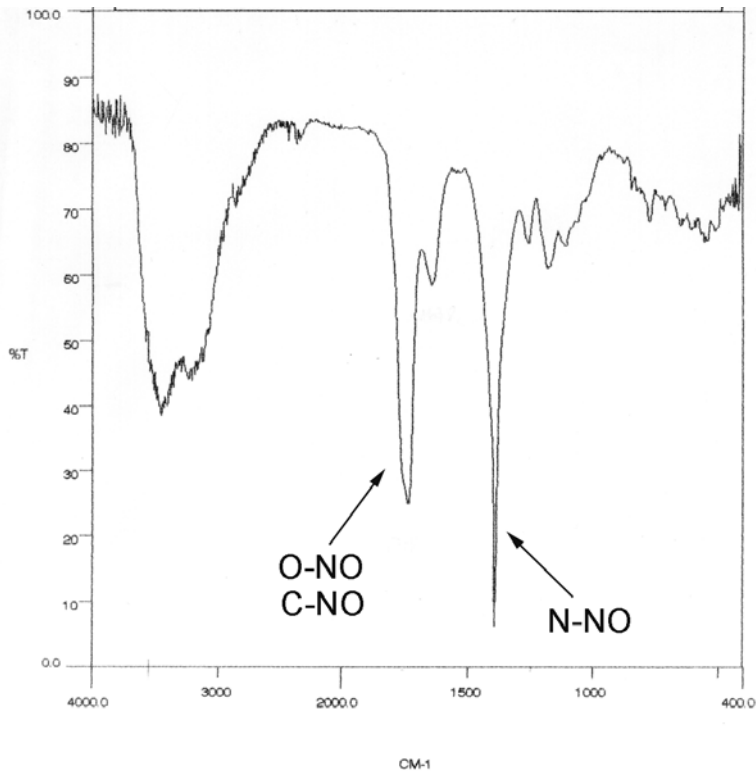
Slika 40. Maseni spektar liofilizovanog uzorka koji je sadržavao mokraćnu kiselinu (400 μM) i Fe^{2+} (1 μM) u destilovanoj vodi na 22 ± 2 °C, tokom 90 minuta. Za eksperimentalne detalje videti legendu ispod tabele 5.

Prve indikacije o prirodi proizvoda nastalih u rastvorima mokraćne kiseline i jona gvožđa inkubiranim sa NO dobijeni su na osnovu UV-VIS spektra. U UV-VIS spektru rastvora tiola, mokraćne kiseline i jona gvožđa zapaža se smanjenje apsorpcionog maksimuma na 280 nm koji potiče od mokraćne kiseline, a pojavljuje se karakteristični "talasasti" pik između 320 i 400 nm, sa maksimumom na oko 360 nm (Slika 41). Idući spektar se dobija i kada se rastvor, koji sadrži samo mokraćnu kiselinu i jone gvožđa, inkubira sa NO. Ovakav spektar je karakterističan za nitrozo derivate (Zhang et al., 1996), što ukazuje na prisustvo ovakvih derivata u reakcionoj smeši. Ovo je

potvrđeno i analizom IC spektra reakcione smeše (Slika 42), na kojem se uočava prisustvo trake na 1385 cm^{-1} koja je pripisana N-nitroso grupi (N-NO), na 1638 cm^{-1} koja je pripisana O-nitroso (O-NO), C-nitroso (C-NO) i/ili karbonilnoj (C=O) grupi (Lee et al., 2002).



Slika 41. UV/VIS apsorpcioni spektar rastvora mokraćne kiseline ($20\ \mu\text{M}$) u $50\ \text{mM}$ kalijum fosfatnom puferu pH 7,4 koji je sadržavao $1\ \mu\text{M}$ jona gvožđa pre (--) i posle (—) inkubiranja sa NO. Za eksperimentalne detalje videti legendu ispod tabele 5.



Slika 42. IC spektar uzorka reakcione smeše (liofilizovane sa KBr) dobijene inkubiranjem rastvora mokraćne kiseline ($400\ \mu\text{M}$) i Fe^{2+} ($1\ \mu\text{M}$) u destilovanoj vodi na $22 \pm 2\ ^\circ\text{C}$, tokom 90 minuta sa NO. Za eksperimentalne detalje videti legendu ispod tabele 5.

3.2.3 Dismutacija NO katalizovana jonima gvožđa u prisustvu aminokiselina

-SH grupe iz proteina i GSH se smatraju dominantnim ligandima za DNIC u biološkim sistemima (Odeljak 2.3.1.2), dok se aminokiseline, koje takođe mogu biti ligandi u DNIC tipu kompleksa (Odeljak 2.4.3.1), nalaze u visokim koncentracijama u pojedinim biološkim sistemima. Zbog toga smo u naša istraživanja uključili i ispitivanje efekta aminokiselina na dismutaciju NO katalizovanu jonima gvožđa. U ovim eksperimentima smo određivali proizvode NO^+ i NO^- vrsta, RSNO, nitrit, odnosno hidroksilamin, u rastvorima koji su pored katalitičkih količina jona gvožđa, GSH i/ili proteinskih tiola (BSA), sadržavali predstavnike aminokiselina, nakon njihovog inkubiranja sa NO. Pored toga, reakcionu smešu, dobijenu nakon inkubiranja rastvora tirozina i jona gvožđa sa NO, analizirali smo na prisustvo 3-nitrotrozina i 3,3'-ditirozina.

Tabela 7. Određivanje hidroksilamina, GSNO i nitrita u rastvorima jona gvožđa, aminokiselina i GSH inkubiranih sa NO.

	NH_2OH (μM)	GSNO (μM)	NO_2^- (μM)
GSH / Fe^{2+}	n.d.	14 ± 3	26 ± 4
Gln / GSH / Fe^{2+}	3,1 ± 0,6	10 ± 1	255 ± 12
His / GSH / Fe^{2+}	2,5 ± 0,5	8 ± 1	178 ± 8
Tyr / GSH / Fe^{2+}	3,0 ± 0,5	8 ± 1	190 ± 10

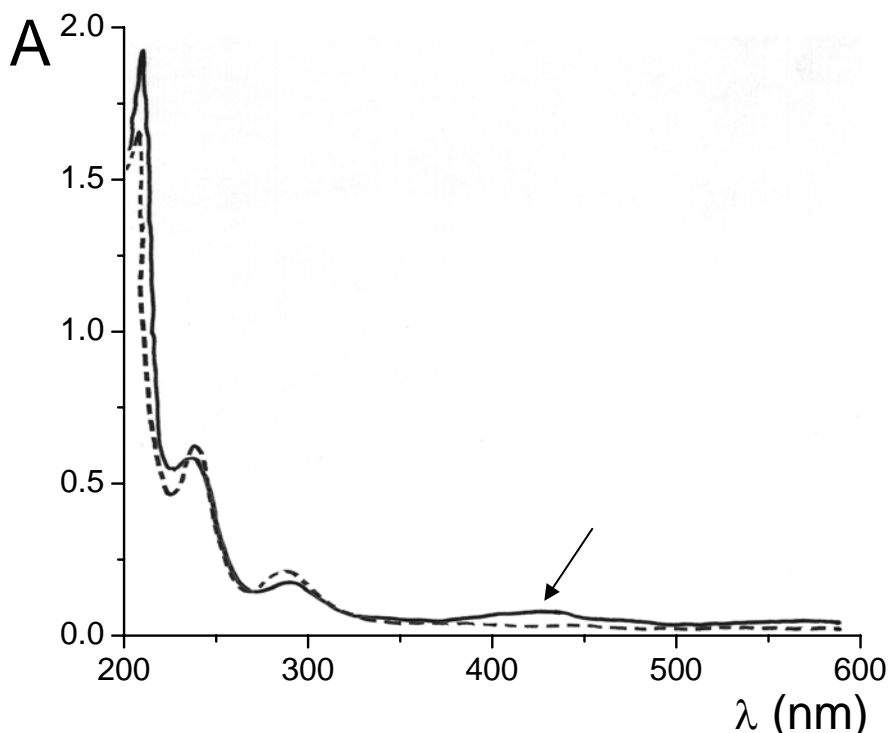
Deaerisani rastvori GSH (20 μM), i navedenih aminokiselina (20 μM) u 50 mM kalijum fosfatnom puferu pH 7,4, koji je sadržavao 1 μM jona gvožđa, inkubirani su sa zasićenim rastvorom NO ($\approx 1,7$ mM) tokom 15 minuta, posle čega je NO odstranjen argonom. Hidroksilamin, RSNO i nitrit su određivani u reakcionoj smeši kao što je opisano u Eksperimentalnom delu (4.8, 4.9 i 4.11). Vrednosti su prikazane kao $\bar{X} \pm SD$; n = 5. n.d. ispod granice detekcije.

Iz tabele 7 se vidi da dodatak aminokiselina u reakcionu smešu koja sadrži jone gvožđa i GSH pre uvođenja NO dovodi do nastajanja hidroksilamina, kao i do značajno većih količina GSNO i nitrita u odnosu na kontrolu bez aminokiselina. U rastvorima u koje je pre uvođenja NO dodata EDTA (0,5 mM) nisu nađene merljive količine RSNO, nitrita, a ni hidroksilamina. Ovi rezultati ukazuju da aminokiseline, koje grade mnogo manje stabilne DNIC komplekse u odnosu na DNIC sa GSH (Odeljak 2.4.3.1), pokazuju efekte na dismutaciju NO slične napred opisanim efektima mokraćne kiseline.

Pri inkubiranju rastvora BSA i jona gvožđa sa NO nije primećeno ni nastajanje S-nitrozotiola niti hidroksilamina. Slično efektu urata (Odeljak 3.2.2), dodatak aminokiselina u reakcionu smešu BSA i jona gvožđa pre inkubiranja sa NO rezultovao je u S-nitrozovanju BSA i nastajanju hidroksilamina. Tako je pri inkubiranju BSA (50 μM) u 50 mM kalijum fosfatnom puferu koji je sadržavao 1 μM jona gvožđa i 100 μM glutamina, nakon inkubiranja sa NO, nađeno 7,6 μM RSNO i 8,3 μM hidroksilamina.

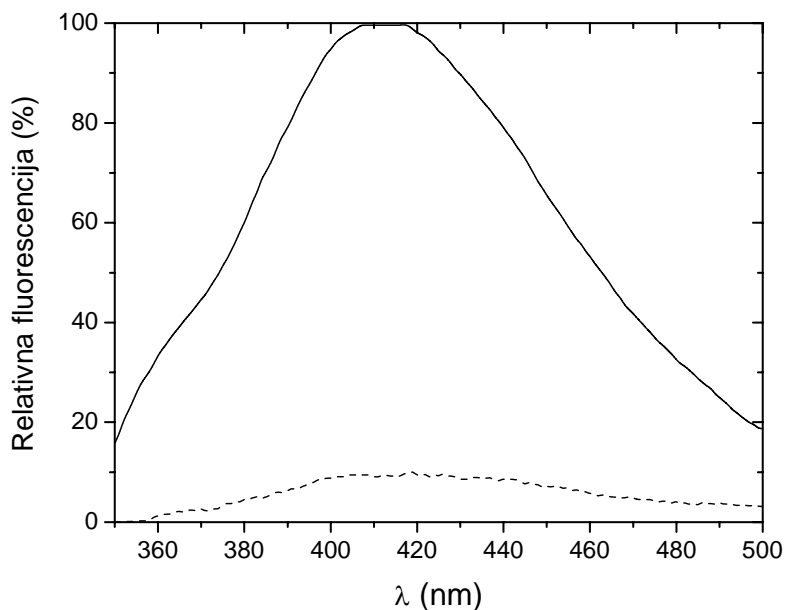
Nitrovanje i oksidacija tirozina

Apsorpcioni spektar reakcione smeše dobijene nakon inkubiranja neutralnog rastvora tirozina i katalitičkih (mikromolarnih) koncentracija jona gvožđa (Slika 43) bio je karakterističan za 3-nitrotirozin (Riordan & Vallee, 1972b). Prisustvo 3-nitrotirozina je potvrđeno i HPLC analizom. Primera radi, pri inkubiranju 20 μM tirozina u prisustvu 1 μM jona gvožđa, u zasićenom rastvoru NO tokom 15 minuta, nađeno je $0,7 \pm 0,2$ μM 3-nitrotirozina.



Slika 43. UV/VIS spektar rastvora tirozina i jona gvožđa pre (--) i posle inkubiranja sa NO (—). Rastvor tirozina (20 μM), u kalijum fosfatnom puferu pH 7,4 koji je sadržavao jone gvožđa (1 μM), inkubiran je sa NO tokom 15 minuta pod uslovima datim u legendi ispod tabele 5 i slike 27. pH rastvora je pre snimanja spektra podešen na 9 dodatkom 1 M NaOH (Odeljak 4.14). Strelicom je označen maksimum na 428 nm karakterističan za 3-nitrotirozin (Riordan & Vallee, 1972b).

Prisustvo 3,3'-ditirozina u reakcionoj smeši utvrđeno je na osnovu karakterističnog fluorescentnog spektra (Slika 44).



Slika 44. Fluorescentni spekter rastvora tirozina i jona gvožđa pre (--) i posle inkubiranja sa NO (—). Rastvor tirozina (20 μM), u kalijum fosfatnom puferu pH 7,4 koji je sadržavao jone gvožđa (1 μM), inkubiran je sa NO tokom 15 minuta pod uslovima datim u legendi ispod tabele 5 i slike 27. Rastvoru enzima je podešen pH na 9, ekscitacija na 325 nm, emisija na 410 nm. Relativna fluorescencija je izražena u odnosu na pufer.

3.2.4 Mehanizmi dismutacije NO katalizovane jonima gvožđa

Rezultati opisani u prethodnim odeljcima su u skladu sa ranijim studijama koje su pokazale da u anaerobnim uslovima joni gvožđa u prisustvu niskomolekulskih, ali ne i proteinskih tiola katalizuju nastajanje S-nitrozotiola (Boese et al., 1995; Vanin et al., 1997; Vanin, 1998). Ove studije su pokazale, da nastajanje RSNO pod navedenim uslovima prethodi nastajanje DNIC (Vanin et al., 1997) (Slika 22). Naši rezultati u potpunosti potvrđuju da je nastajanje DNIC kompleksa povezano sa disproporcionisanjem NO do HNO/NO⁻, koji reakcijom sa slobodnim SH grupama daje hidroksilamin (Slika 22). Iznenadujuće je, da je pri primenjenim uslovima, hidroksilamin detektovan samo u reakcionim smešama koje su sadržavale samo cistein, ali ne i samo GSH ili proteinske tirole. Međutim, znatne količine hidroksilamina su nađene u reakcionim smešama koje su sadržavale GSH ili proteinske tirole, u kombinaciji sa mokraćnom kiselinom ili sa aminokiselinama. U skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da razni anjoni mogu da služe kao ligandi za DNIC

komplekse, pretpostavili smo da nastajanje hidroksilamina, zajedno sa povećanom produkcijom nitrita i RSNO u prisusustvu mokračne kiseline (Odeljak 3.2.2), predstavlja indirektno dokaze da urat može da služi kao ligand u nestabilnim nitrozil kompleksima gvožđa tipa DNIC.

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da disproporcionisanje NO, katalizovano jonima gvožđa, zavisi od stabilnosti DNIC, tj. da je kapacitet jona gvožđa da katalizuju dismutaciju NO u obrnutoj srazmeri sa stabilnošću DNIC. Naša hipoteza je da pri disproporcionisanju NO, do kojeg dolazi pri nastajanju DNIC, pored intermedijernog oslobađanja HNO/NO⁻ (Vanin et al., 1997; Vanin 1998; Vanin et al., 2002), dolazi i do direktne reakcije "slobodnog" NO sa koordinovanim NO, pri čemu nastaje N₂O (Reakcija I na slici 22) (McCleverty, 1979). Ovaj proces izgleda da je dominantniji pri nastajanju stabilnijih DNIC, kao što su DNIC sa GSH i proteinskim -SH grupama (Mulsch et al., 1991). DNIC se raspada na Fe²⁺, NO, ligande i NO⁺ (Vanin et al., 1997; Vanin, 1998). NO⁺ reaguje sa vodom dajući nitrite (reakcija NO⁺ jona sa bilo kojim drugim nukleofilom osim sa vodom malo je verovatna (Butler et al., 1995) (Slika 22, Reakcije II). Molekuli vode (ili preciznije OH⁻ joni) mogu takođe direktno da napadnu nitrozonijum ligand u DNIC, inicirajući njegovu transformaciju u nitrit, što dovodi do raspadanja kompleksa (Vanin et al., 2002). Tioli su u jakoj kompeticiji sa molekulima vode za nitrozonijum ligande u DNIC i mogu da ih vezuju dajući RSNO (Vanin et al., 2002) (Slika 22, Reakcije II).

DNIC može ponovo da nastane iz regenerisanih jona gvožđa, liganada i preostalog NO, što dovodi do još jednog ciklusa disproporcionisanja NO (Slika 22). Tako, znatno veće količine hidroksilamina, GSNO i nitrita (odnosno indirektno NO⁺ i NO⁻ vrsta), koje su nađene u rastvorima koji su sadržavali cistein, mokračnu kiselinu ili aminokiseline nakon njihovog inkubiranja sa NO, u odnosu na rastvore koji su sadržavali samo GSH, reflektuje relativno veliku stabilnost DNIC sa GSH, odnosno proteinskim -SH grupama (Mulsch et al., 1995).

Mehanizam koji smo predložili za nitrovanje ostataka tirozina u MnSOD zasniva se na reakciji NO⁺ grupe iz mangan-nitrozil kompleksa sa nitritima iz reakcione smeše, pri čemu nastaje NO₂[·], za koji je poznato da izaziva nitrovanje i oksidaciju tirozina (Odeljak 3.1.3). Zbog toga smo pretpostavili da bi i NO⁺ grupe iz DNIC kompleksa (Slika 22) mogle da se ponašaju na sličan način, te da u reakciji sa

nitritima iz reakcione smeše nagrade NO_2^- , koji potom, na dobro poznati način (Odeljak 2.4.4), izaziva nitrovanje tirozina u 3-nitrotirozin i njegovu oksidaciju do ditirozina.

3.3 "Slobodno" gvožđe u cerebrospinalnoj tečnosti (CSF) katalizuje dismutaciju NO u NO^+ i NO^- vrste

Potencijalni biološki značaj rezultata opisanih u prethodnim odeljcima proverili smo u *ex vivo* eksperimentima u kojima smo koristili cerebrospinalnu tečnost (CSF) zdravih osoba i osoba obolelih od sporadičnog oblika amiotrofične lateralne skleroze (SALS). CSF sadrži "slobodno" gvožđe, MnSOD, tragove GSH i znatne količine niskomolekulskih anjonskih konstituenata kao što su aminokiseline i mokraćna kiselina (Lentner, 1981), koji su potencijalni ligandi za DNIC. Azot monoksid se generiše u mozgu pod normalnim uslovima, a njegova produkcija je povećana u raznim neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i amiotrofičnu lateralnu sklerozu (Odeljak 2.2.2). Nađeno je da su metaboliti azot monoksida, nitrit i 3-nitrotirozin, povećani u CSF-u pacijenata obolelih od SALS-a (Odeljak 2.2.2), a MnSOD je jedini nitrovani protein u CSF-u (Odeljak 2.3.1.3). Zbog svega navedenog, može se pretpostaviti da NO iz moždanog tkiva difunduje u CSF, gde podleže dismutaciji NO katalizovanoj "slobodnim" gvožđem i (eventualno) MnSOD, što može da objasni nastajanje navedenih metabolita NO . Pretpostavili smo da fine promene u sastavu antioksidanata u CSF-u, kao što su proteinske SH grupe, urat i askorbat, koji mogu biti potencijalni ligandi za komplekse DNIC tipa i/ili efikasni hvatači NO^+ i HNO/NO^- , vrsta mogu da utiču na dismutaciju NO katalizovanu "slobodnim" gvožđem. Zbog toga smo prvo analizirali navedene antioksidante u CSF-u, a potom smo analizirali proizvode i efekte NO dismutacije u normalnom CSF-u i CSF-u pacijenata obolelih od SALS-a, nakon njihovog *ex vivo* inkubiranja sa azot monoksidom.

3.3.1 Analiza sadržaja proteina, -SH grupa, urata i askorbata u CSF zdravih osoba i osoba obolelih od amiotrofične lateralne skleroze (SALS)

U odnosu na vrednosti nađene u kontrolnim uzorcima CSF-a, sadržaj ukupnih proteina, -SH grupa i urata značajno je povećan, dok je sadržaj askorbata značajno smanjen u uzorcima CSF-u osoba obolelih od SALS-a, korišćenih u ovom radu (Tabela 8). Povećane vrednosti za

proteine i urat u saglasnosti su sa nalazima drugih autora (Leonardi et al., 1984; Stover et al., 1997), dok je smanjen nivo askorbata suprotan nalazima drugih autora (Reiber et al., 1993; Paraskevas et al., 1997). CSF kontrolnih uzoraka, kao i pacijenata obolelih od SALS-a, ne sadrže cistein, a sadržaj glutaciona je manji od 0,1 μM (Tohgi et al., 1999b), što ukazuje da -SH grupe u CSF-u potiču od proteina.

Tabela 8. Analiza proteina, -SH grupa, urata i askorbata u CSF-u.

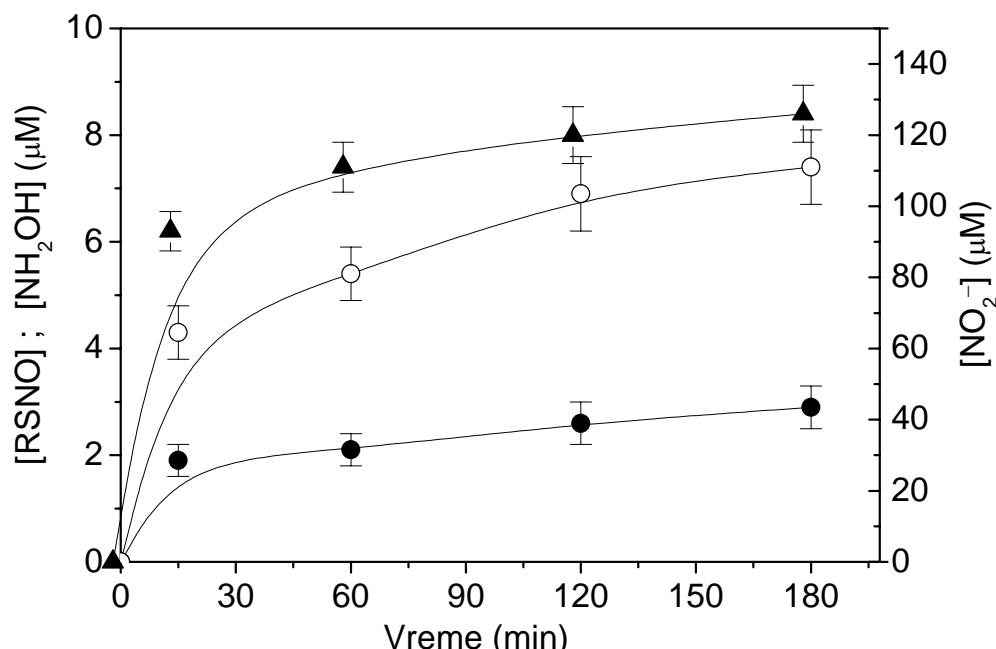
Sastojak	Kontrolni CSF	CSF (SALS)
Proteini	0,32 \pm 0,04 g/L	0,43 \pm 0,05* g/L
-SH grupe	13,3 \pm 0,7 μM	23,4 \pm 2,8* μM
Urat	18,3 \pm 0,7 μM	45,4 \pm 2,1* μM
Askorbat	127,0 \pm 5,8 μM	96,8 \pm 2,6* μM

Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SD$; n = 10. *Statistički značajna razlika (p<0,05) u poređenju sa vrednostima u kontrolnom CSF.

3.3.2 Dismutacija NO u CSF uzorcima inkubiranim *ex vivo* sa NO

Da bismo utvrdili da li "slobodno" gvožđe u CSF-u katalizuje dismutaciju NO u NO⁺ i HNO/NO⁻ vrste, određivali smo nitrite, RSNO i hidroksilamin u uzorcima CSF-a zdravih osoba, sa i bez dodatka o-fenantrolina, selektivnog helatora za Fe²⁺ (Vanin, 1998), nakon njihovog inkubiranja sa NO pod anaerobnim uslovima (Slika 45, Tabela 9). Sa slike 45 se vidi da posle 15 minuta izlaganja uzoraka CSF azot monoksidu nastaje oko 4 μM S-nitrozotiola i oko 2 μM hidroksilamina. U prvih 15 minuta reakcije nastaje i najveća količina nitrita, dok je nakon toga brzina nastajanja nitrita znatno smanjena (Slika 45). Važno je istaći da je količina nastalog nitrita znatno veća od prinosa reakcionih proizvoda sa tiolima, što ukazuje da je količina nastalih NO⁺ i NO⁻ vrsta znatno veća od one koja bi se dobila samo na osnovu određivanja reakcionih proizvoda sa tiolima. U slepoj probi, koja se sastojala samo od 50 mM kalijum fosfatnog pufera pH 7,4 nađena je zanemarljiva (< 7 μM) količina nitrita (koja nastaje reakcijom NO sa tragova zaostalog kiseonika u sistemu), što ukazuje da nitrit i S-nitrozotioli, nađeni u uzorcima CSF-a inkubiranim sa NO, ne nastaju u značajnoj meri reakcijom sa azotovim oksidima (Odeljak 2.4.1). Nastajanje proizvoda (Slika 45) je skoro u

potpunosti (oko 90%) inhibirano u uzorcima CSF-a u koje je pre uvođenja NO dodat o-fenantrolin (250 μM) (Vanin, 1998). Svi navedeni rezultati jasno ukazuju da "slobodno" gvožđe u CSF-u katalizuje dismutaciju NO u NO^+ i NO^- vrste.



Slika 45. Određivanje S-nitrozotiola (O), hidroksilamina (●) i nitrita (▲), u uzorcima CSF-a tretiranim azot monoksidom. Uzorci CSF (1 mL) (Odeljak 4.4) su pažljivo deaerisani propuštanjem argona, a potom je u deaerisane uzorke uvođen NO i uzorci ostavljeni u atmosferi NO od 15 minuta do 3 sata. Višak NO je odstranjen provođenjem struje argona i navedeni proizvodi su određivani kao što je opisano u Eksperimentalnom delu (Odeljci 4.8, 4.9 i 4.11). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SD$; $n = 10$.

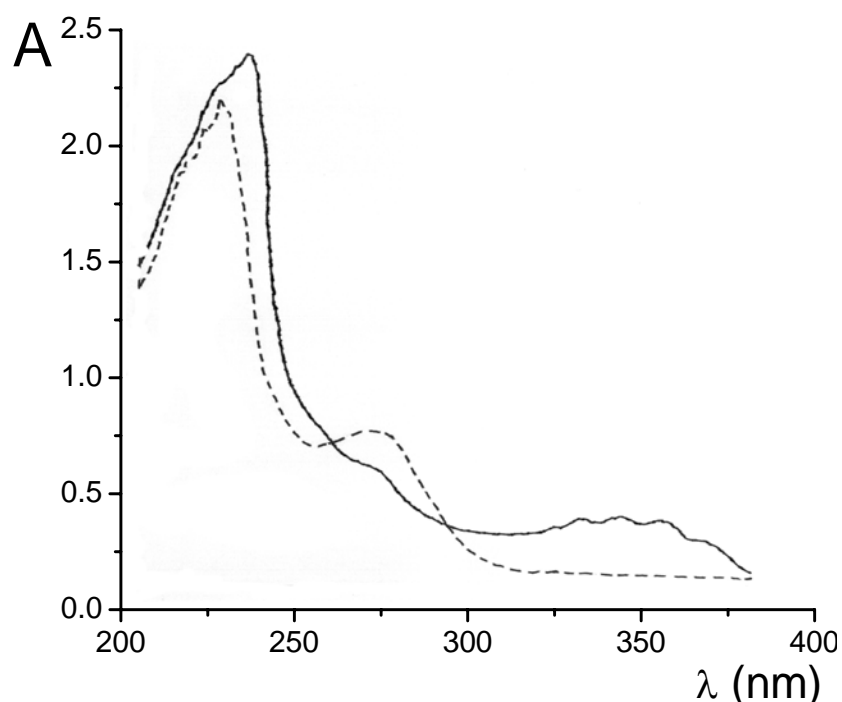
Iz tabele 9 se vidi, da je posle inkubiranja sa NO, smanjenje sadržaja slobodnih -SH grupa, izraženo u procentima, statistički značajno veće u CSF uzorcima pacijenata obolelih od SALS, u odnosu na kontrolne CSF uzorke. Veći prinos nitrozotiola i hidroksilamina u CSF pacijenata tretiranim sa NO može se objasniti značajno većim sadržajem -SH grupa u ovim uzorcima (Tabela 8). Iako -SH grupe u CSF uzorcima inkubiranim sa NO nisu u potpunosti izreagovale sa generisanim RNOS, u reakcionoj smeši nije zaostalo ni malo askorbata, a zaostalo je malo urata (Tabela 9). Kako je koncentracija askorbata u CSF uzorcima znatno veća od koncentracije urata (Tabela 8) to je gubitak askorbata veći od gubitka urata. Ovo ukazuje da su askorbat i urat reaktivniji od tiola, u odnosu na RNOS generisane dismutacijom NO. Značajno je napomenuti da u CSF uzorcima inkubiranim sa NO nastaje 3-nitrotirozin, i to u statistički značajno većem prinosu u CSF uzorcima pacijenata (Tabela 9).

Tabela 9. Efekti dismutacije NO u kontrolnim CSF uzorcima i CSF uzorcima osoba obolelih od SALS nakon njihovog *ex vivo* inkubiranja sa NO.

Sastojci	Kontrolni CSF uzorci + NO (μM)	CSF uzorci pacijenata +NO (μM)
Preostale -SH grupe	$6,1 \pm 0,6$ (46%)	$6,5 \pm 0,8$ (28%)*
Nitriti	$93,2 \pm 5,1$	$182,4 \pm 10,1$ *
RSNO	$4,3 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,8$ *
NH ₂ OH	$1,9 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,3$ *
3-nitrotirozin	$11,1 \pm 1,2$	$14,2 \pm 2,0$ *
Preostali urat	$0,8 \pm 0,2$ (4%)	$1,7 \pm 0,4$ (4%)*
Preostali askorbat	n.d.	n.d.

Inkubiranje CSF uzoraka sa NO je opisano u legendi ispod slike 45. Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SD$; n = 10. *Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima u kontrolnom CSF. n.d. ispod granice detekcije.

UV/VIS spektar CSF uzoraka posle uvođenja NO (Slika 46) u potpunosti odgovara spektru rastvora mokraćne kiseline i jona gvožđa tretiranom sa NO (Slika 41). Ovi rezultati ukazuju da je mokraćna kiselina u CSF-u efikasan "hvatač" generisanih RNOS, te da nastali proizvodi odgovaraju proizvodima mokraćne kiseline i RNOS generisanim u rastvorima mokraćne kiseline i jona gvožđa inkubiranih sa NO (Odeljak 3.2.2).



Slika 46. UV/VIS apsorpcioni spektar kontrolnog CSF uzorka pre (--) i posle (—) inkubiranja sa NO (15 minuta). Uslovi rada su dati u legendi ispod slike 45. Spektri su snimljeni naspram 50 mM kalijum fosfatnog pufera pH 7,4.

Ukratko, navedeni rezultati jasno pokazuju da "slobodno" gvožđe u cerebrospinalnoj tečnosti efikasno katalizuju dismutaciju NO u NO⁺ i NO⁻ vrste. Nastale RNOS reaguju sa vodom, antioksidantima, proteinskim -SH grupama, uratom i askorbatom, kao i tirozinom, dajući 3-nitrotirozin. Ovi procesi se odvijaju u većoj meri u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata obolelih od amiotrofične skleroze nego u kontrolnim uzorcima.

Efekti dodatka urata i askorbata na dismutaciju NO

Urat je potencijalni ligand za nestabilne nitrozil komplekse gvožđa DNIC tipa (Odeljak 3.2.2 i 3.2.4). Urat i askorbat mogu da kompleksiraju "slobodno" gvožđe (Davies et al., 1986; Buettner & Jurkiewicz, 1996) (Odeljak 2.3.1.2), a ponašaju se i kao efikasni hvatači RNOS (Miranda et al., 2001). Sadržaj urata u CSF uzorcima pacijenata obolelih od amiotrofične lateralne skleroze je povećan, dok je sadržaj askorbata smanjen (Tabela 8). Zbog toga smo u kontrolne CSF uzorke dodali urat ili askorbat pre njihovog inkubiranja sa NO, a potom smo određivali reakcione proizvode generisanih RNOS sa tiolima, kao i preostali urat i askorbat (Tabela 10). Iz tabele se vidi da dodatak urata u kontrolni CSF uzorak, pre njegovog izlaganja azot monoksidu, izaziva povećanu produkciju RSNO i hidroksilamina, dok dodatak askorbata značajno smanjuje nastajanje ovih proizvoda. Ovi rezultati bi ukazivali da je urat dominantan ligand za nitrozil komplekse sa "slobodnim" gvožđem u CSF uzorcima koji omogućuju dismutaciju NO, dok je askorbat efikasniji "hvatač" generisanih RNOS od urata. Koncentracija "slobodnog" gvožđa u CSF-u pacijenata obolelih od SALS se ne razlikuje značajno od koncentracije nađene u normalnom CSF-u (Kjellin, 1967). Tako će, od nivoa urata u CSF uzorcima u najvećoj meri zavisiti kapacitet "slobodnog" gvožđa da katalizuje dismutaciju NO u NO⁺ i HNO/NO⁻ vrste, dok će nivo askorbata, koji je najefikasniji hvatač generisanih RNOS, uticati na prinos reakcionih proizvoda RNOS sa CSF sastojcima.

Tabela 10. Efekti dodatka urata i askorbata u CSF uzorke pre inkubiranja sa NO.

	Preostale SH grupe (%)	RSNO (μM)	Hidroksilamin (μM)	Preostali urat (%)	Preostali askorbat (%)
Kontrolni CSF	49,2 \pm 4,0	4,1 \pm 0,5	1,7 \pm 0,4	5	n.d.
CSF + urat	21,1 \pm 3,8*	6,3 \pm 0,6*	2,9 \pm 0,4*	10	-
CSF + askorbat	60,9 \pm 3,8*	2,8 \pm 0,4*	1,0 \pm 0,3*	-	2,8

Inkubiranje CSF uzoraka sa NO je opisano u legendi ispod slike 45. Koncentracija SH grupa u CSF uzorcima zdravih osoba (kontrolni uzorci) je bila 13,9 \pm 0,8 μM , koncentracija urata 18,7 \pm 0,7 μM i askorbata 124,9 \pm 4,6 μM . U CSF uzorke je pre inkubiranja sa NO dodat urat (20 μM) ili askorbat (100 μM). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SD$, od tri eksperimenta. *Značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na vrednosti u kontrolnim uzorcima inkubiranim sa NO bez dodatka urata ili askorbata. n.d. ispod granica detekcije.

4 EKSPERIMENTALNI DEO

4.1 Hemikalije i reagensi korišćeni u ovom radu

Enzimi korišćeni u ovom radu: MnSOD (*E.coli*), FeSOD (*E.coli*), FeSOD (*P.leiognathi*), dobijeni su ljubaznošću profesora M.Spasića i profesora A.M.Michelsona. Enzimi su izolovani po postupcima opisanim u literaturi: MnSOD (*E.coli*) (Keele et al., 1970), FeSOD (*E.coli*) (Slykhouse & Fee, 1976), FeSOD (*P.leiognathi*) (Puget & Michelson, 1974). Goveđa Cu/ZnSOD je bila proizvođača Grunenthal GmbH (Stalberg). apoMnSOD je pripremljena po postupku iz literature (Quijano et al., 2001) (Odeljak 4.2). Sledeće hemikalije su bile od Sigmee: goveđi serum albumin (BSA), L-aminokiseline, mokraćna kiselina, askorbinska kiselina, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB), N-etil-maleimid (NEM), o-fenantrolin, 2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina (TNBS), naftilamin-hidrohlorid, 8-hidroksi-hinolin i sulfanilna kiselina. Test za određivanje mokraćne kiseline "Menagent uric acid HF kit" bio je od firme Menarini diagnostics (Italija). Sve ostale hemikalije su bile najboljeg, p.a. kvaliteta, komercijalno dostupne. Za pripremu rastvora korišćena je ili dvostruko destilovana voda ili voda prečišćena propuštanjem kroz Milipor-filtre.

4.2 Pripremanje apoMnSOD (*E.coli*) (Quijano et al., 2001)

Vodeni rastvor MnSOD (*E.coli*) (15 μ M po monomeru) je dijalizovan 20 sati naspram rastvora koji sadrži: 20 mM 8-hidroksihinolin, 2,5 M guanidin hlorid, 5 mM Tris i 0,1 mM EDTA na pH 3,8 i 4 °C. Nakon dijalize potvrđen je gubitak aktivnosti enzima metodom opisanom u odeljku 4.7. Nakon toga, enzim je dijalizovan naspram 50 mM kalijum fosfatnog pufera pH 7,4, određena je njegova koncentracija (Odeljak 4.17) i zamrznut na -20 °C do upotrebe.

4.3 Odvajanje hema od globina (Ascoli et al., 1981)

U kivetu za centrifugovanje koja sadrži 8 mL prethodno ohlađenog acetona (-20 °C) u kome se nalazi HCl (2,5 mL 2M HCl na 1 L acetona) dodavan je u kapima rastvor hemoglobina (1-2%), dijalizovan naspram destilovane vode, i ohlađen na 4 °C, uz blago mešanje. Globin se

taloži u obliku belog pahuljičastog taloga. Uzorak je ostavljen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2-3 sata), a globin je potom odvojen od acetonskog supernatanta koji sadrži hem centrifugovanjem na 3000 o/min, tokom 5 minuta. Ovako pripremljeni globin je korišćen u daljim eksperimentima.

4.4 Uzorci cerebrospinalne tečnosti

U ovom radu korišćeni su uzorci cerebrospinalne tečnosti zdravih osoba i SALS pacijenata. Kontrolna grupa se sastojala od 16 osoba (10 muškaraca i 6 žena) starosne dobi $46,3 \pm 7,1$ ($\bar{X} \pm SD$) godina, neurološki zdravih, sa dijagnozom: glavobolja, spondiloza vrata i lumbalna spondiloza. Dijagnoza SALS pacijenata uključuje klinički status prema kriterijumu Svetske Neurološke Federacije, Subkomitet za MND (Motor Neuron Disease) (Brooks, 1994). SALS grupa se sastojala od 35 pacijenata (24 muškaraca i 11 žena) starosne dobi $52,0 \pm 3,5$ ($\bar{X} \pm SD$) godina.

CSF uzorci su dobijeni ljubaznošću dr Zorice Stević iz Instituta za neurologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, a pripremljeni su netraumatičnom lumbalnom punkcijom i odmah centrifugovani na 5000 g, tokom 10 minuta, pri čemu je supernatant odvojen i brzo zamrznut na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

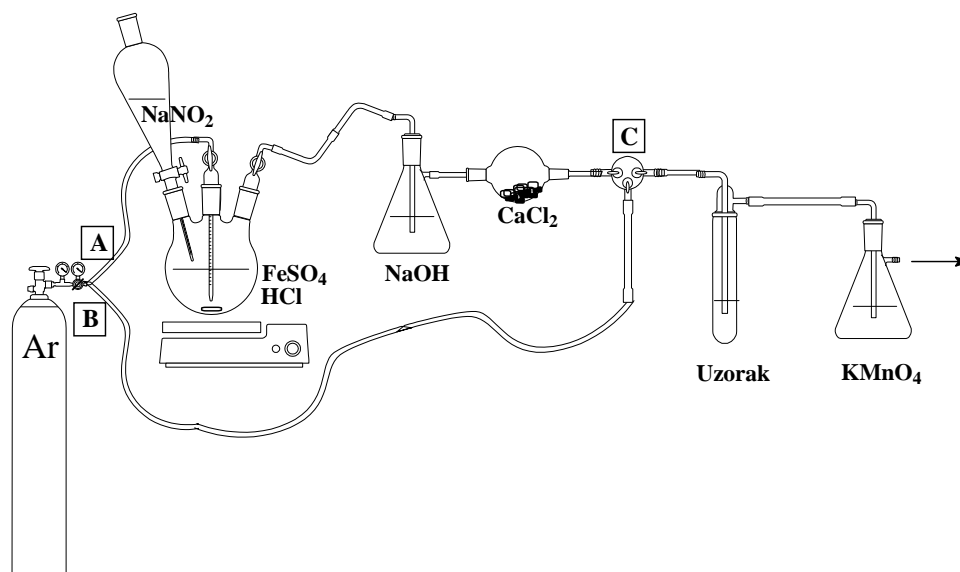
4.5 Pripremanje rastvora Fe^{2+} i liganada

"Štok" rastvora Fe^{2+} (10 mM) napravljen je rastvaranjem $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u redestilovanoj vodi. pH rastvora je podešen na 2,5 dodatkom 1M HCl. Eksperimenti su izvođeni u 50 mM kalijum fosfatnom puferu (pH 7,4) u kojem je koncentracija gvožđa kao kontaminanta, određena atomskom apsorpcionom spektroskopijom, iznosila oko $1\text{ }\mu\text{M}$ (0,8-1,2 μM). Puferi su pripremani u Milli-Q vodi. U pufer su, neposredno pre izvođenja eksperimenta, dodavani joni gvožđa i odgovarajući ligandi do željene koncentracije.

4.6 Inkubiranje uzoraka sa NO

Azot monoksid korišćen u ovom radu pripremljen je prema modifikovanom postupku Lee et al., (1994). Šema aparature za dobijanje i uvođenje NO u uzorke prikazana je na slici 47. Crevo

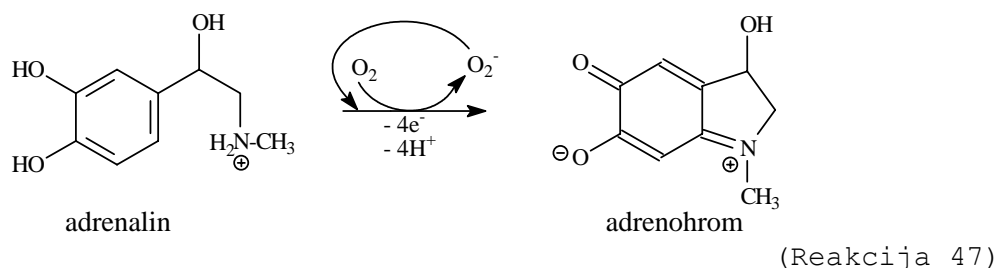
(ili staklenu cev) na kapalici treba napuniti destilovanom vodom pre propuštanja argona kroz aparaturu da bi se istisnuo vazduh iz tog dela aparature, a potom u kapalicu dodati 50 mL 10% NaNO₂. Ukoliko se to ne bi učinilo došlo bi do oksidacije NO vazduhom zaostalim u cevi do NO_x. U trogrli ("šlifovan") balon od 250 mL sipa se 50 mL 20% FeSO₄ i 50 mL koncentrovane HCl. Zatim se propusti argon kroz crevo A 2 sata da bi se istisnuo vazduh iz rastvora i ostalih delova aparature. Protok gasa treba da bude 2-3 mehurića u sekundi. Protok gasa se posmatra u epruveti za uzorak. Potom se argonom istisne vazduh iz creva B (potrebno je svega 2-3 minuta pri istom protoku argona). Protok gasa se usmerava okretanjem slavine C u željenom pravcu. Uvođenje argona kroz uzorak nastavlja se tokom 20 minuta pri istim uslovima. Nakon ovog vremena, ukapava se 10% NaNO₂ u trogrli balon, pri čemu nastaje NO. Brzina ukapavanja se podešava tako da protok mehurića kroz uzorak bude isti (2-3 u sekundi). Na taj način se NO uvodi u uzorak 5 minuta, a zatim se zatvori slavina okretanjem za 90° u bilo kom smeru. Pri ovim uslovima rastvor je potpuno zasićen sa NO (koncentracija NO u rastvoru je ~ 1,7 mM) (Bonner & Stedman, 1996). Uzorak se zatim ostavi u atmosferi NO. Nakon određenog vremena NO se odstranjuje iz uzorka propuštanjem argona tokom 10 minuta i odmah uzimaju alikvoti za određivanje nitrita, SH grupa, S-nitrozotiola, hidroksilamina, urata i askorbata. Preostali uzorci se čuvaju na -20 °C. Uzorci tretirani argonom, umesto sa NO, upotrebljavani su kao kontrola. Slepa proba, koja je sadržavala 50 mM kalijum fosfatni pufer, rađena je paralelno sa uzorcima, da bi se na osnovu određivanja nitrita utvrdila količina zaostalog kiseonika u sistemu. Pod ovim anaerobnim uslovima u slepoj probi je nađeno 6 ± 3 μM nitrita (n = 12), i ova količina se značajno povećavala pri produženom inkubiranju uzorka sa NO.



Slika 47. Aparatura za dobijanje i uvođenje NO.

4.7 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza (Misra & Fridovich, 1972)

Metoda za određivanje aktivnosti SOD koju smo koristili u ovom radu zasniva se na autooksidaciji adrenalina pri kojoj se oslobađa superoksid anjon radikal i adrenohrom koji apsorbuje na 480 nm (Reakcija 47). Brzina autooksidacije adrenalina određuje se na osnovu promene apsorbance rastvora na 480 nm. Katalitička aktivnosti enzima se određuje na osnovu stepena inhibicije ove reakcije pomoću SOD, koja katalizuje dismutaciju $O_2^{\cdot -}$ do O_2 i H_2O_2 (Odeljak 2.3.1.3; Reakcija 13) i tako sprečava nastajanje adrenohroma. Brzina autooksidacije adrenalina, određena u odsustvu enzima, uzima se kao referentna (kontrolna), a aktivnost enzima se određuje na osnovu smanjenja ove referentne vrednosti.



Postupak koji smo koristili sastoji se ukratko u sledećem:

U 3 mL 0,05 M karbonatnog pufera pH 10,2 dodati određenu zapreminu (10-80 μ L) $3 \cdot 10^{-4}$ M rastvora adrenalina u 0,02 M HCl dok se ne postigne promena apsorbance od 0,019 - 0,024 u minuti, tokom 4 minuta (promena apsorbance se prati spektrofometrijski na 480 nm). Ukoliko je promena apsorbance veća ili manja, eksperiment se ponavlja sa manjom, odnosno većom zapreminom rastvora adrenalina. Dobijena vrednost za promenu apsorbance (brzine autooksidacije adrenalina) predstavlja ΔK u jednačini za izračunavanje aktivnosti SOD. Brzina autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD (ΔA) se dobija tako što se merenje ponovi uz dodatak one količine SOD (0,3-0,5 mg/mL) koja će izazvati smanjenje apsorbance na 0,010 - 0,014 u minuti, tokom 4 minuta. Ukoliko je promena apsorbance veća ili manja, eksperiment se ponavlja sa većom, odnosno manjom zapreminom rastvora SOD (V u jednačini za izračunavanje aktivnosti SOD). Ovako određene vrednosti za ΔK , ΔA , V , R i C_{prot} uvrstiti u jednačinu za određivanje aktivnosti SOD.

Količina SOD izražena je u jedinicama SOD aktivnosti po mg proteina:

$$U/mg = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \cdot R}{\Delta K \cdot V \cdot C_{prot}}$$

ΔK - promena apsorbance u kontrolnoj probi u minuti

ΔA - promena apsorbance u uzorku sa enzimom u minuti

V - zapremina uzorka u mL

C_{prot} - koncentracija proteina u mg/mL

R - razblaženje uzorka

4.8 Određivanje nitrita (Green et al., 1982)

U 1 mL uzorka dodati 20 μ L 0,5% EDTA i energično promešati na Vortex-mešalici. Zatim dodati 20 μ L rastvora sulfanilne kiseline (0,6 g sulfanilne kiseline rastvoriti u 70 mL destilovane vode uz zagrevanje, u ohlađen rastvor dodati 20 mL konc. HCl i dopuniti do 100 mL destilovanom vodom). Posle 10 minuta uzorku dodati 20 μ L rastvora 1-naftilamin-hidrohlorida (rastvoriti 0,6 g naftilamina u 50 mL destilovane vode, dodati 1 mL konc. HCl i dopuniti destilovanom vodom do 100 mL), promešati, a zatim dodati 20 μ M 2M natrijum acetata i opet promešati. Odmah nakon dodavanja 1-naftilamin-hidrohlorida i mešanja dodati rastvor natrijum acetata i meriti apsorbancu na 520 nm. Koncentracija nitrita se očitava sa odgovarajuće standardne prave za nitrite. Standardna prava se priprema svaki puta kada se pripremaju novi reagensi.

4.9 Određivanje hidroksilamina (Arnelle & Stamler, 1996)

U 0,5 mL uzorka dodati 0,5 mL 1% 8-hidroksihinolina u apsolutnom etanolu i energično promešati na Vortex-mešalici. Zatim dodati oko 0,5 mL 1M natrijum karbonata tako da pH bude 11. Boja se razvija 60 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se meri apsorbancu na 700 nm. Koncentracija hidroksilamina u uzorcima se očitava sa odgovarajuće standardne prave za hidroksilamin. Standardna prava se priprema svaki puta kada se pripremaju novi reagensi.

4.10 Određivanje SH-grupa Ellmanovom metodom (Habeeb, 1972)

U 0,5 mL uzorka dodati 0,5 mL 0,1 M kalijum fosfatnog pufera pH 7,3 i 200 μ L 3 mM DTNB reagensa u 0,1 M kalijum fosfatnom puferu pH 7,3. Dobro promešati rastvor na Vortex-mešalici i meriti apsorbancu na 412 nm nakon 10 minuta (ili nakon dužeg vremena ako se apsorbancu nije ustalila). Koncentracija SH-grupa se određuje na osnovu molarnog apsorpcionog koeficijenta ($a = 14150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

4.11 Određivanje S-nitrozotiola (Stamler & Feelisch, 1996)

Određivanje S-nitrozotiola je rađeno na osnovu razlike u koncentraciji nitrita pre (Odeljak 4.8) i posle dodavanja rastvora HgCl_2 : u 750 μ L ispitivanog rastvora dodati 750 μ L 0,2% HgCl_2 (u destilovanoj vodi) i rastvor ostaviti da stoji 10 minuta, nakon čega se određuju nitriti po gore opisanom postupku (Odeljak 4.8). Alternativno se S-nitrozotoli određuju tako što se, pre dodatka rastvora HgCl_2 , u rastvoru uklone nitriti pomoću sulfamata po sledećem postupku: u 1 mL rastvora uzorka dodati 1 mL 0,2% amonijum sulfamat (rastvoren u 50 mM HCl), posle 10 minuta rastvor neutralisati dodatkom 80 μ L 1M NaOH.

4.12 Određivanje mokraćne kiseline

Mokraćna kiselina je određivana primenom komercijalnog testa "Menagent uric acid HF kit" (Menarini diagnostics, Italy).

Princip metode se zasniva na oksidaciji mokraćne kiseline u alantoin pri čemu se oslobađa vodonik peroksid koji u prisustvu peroksidaze sa 2,4-dihlorofenolsulfonatom i 4-aminofenazonom gradi kompleks crvene boje, sa maksimumom apsorbance na 510 nm (Liddle et al., 1959).

Postupak se sastoji u sledećem:

U 2 mL radnog reagensa (60 IU urikaza, 660 IU peroksidaza, 1 mM aminofenazon, 4 mM 2,4-dihlorofenolsulfonat u 50 mM GOOD puferu pH 7,5) dodati 50 μ L uzorka, dobro promešati i inkubirati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga izmeriti apsorbancu na 510 nm.

Koncentracija mokraćne kiseline se očitava sa odgovarajuće standardne prave.

4.13 Određivanje askorbinske kiseline (Okamura, 1980)

Metoda se zasniva na redukciji feri u fero jon pomoću askorbata u kiseloj sredini, pri čemu se fero jon kupluje sa α, α' -dipiridilom u kompleks sa maksimumom apsorpcije na 525 nm. Ovom metodom se određuju zajedno askorbinska kiselina i dehidroaskorbinska kiselina.

Postupak se sastoji u sledećem:

U 0,2 mL uzorka dodati 0,2 mL 20 mM 2-merkaptoetanolu, 0,4 mL 0,15 M natrijum fosfatnog pufera pH 7,4 i ostaviti na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta. Zatim, dodati 0,2 mL 0,5% NEM, 1,0 mL 10% TCA, 0,8 mL 42% H_3PO_4 , 0,8 mL 4% α, α' -dipiridila u 70% etanolu i 0,4 mL 3% $FeCl_3$. Intenzivno promešati smešu i inkubirati je 60 minuta na 37 °C. Nakon toga očitati apsorbciju na 525 nm. Postupak ponoviti sa standardnim rastvorom askorbinske kiseline u intervalu koncentracija od 10-100 μM , na osnovu kojih se konstruiše standardna prava za očitavanje nepoznatih koncentracija.

4.14 Određivanje 3-nitrotirozina spektrofotometrijski (Riordan & Vallee, 1972b)

3-nitrotirozin se određuje spektrofotometrijski tako što se pH uzorka podesi dodatkom 1 M NaOH na 9. Pri tome treba voditi računa o razblaženju uzorka. Snimi se spektar uzorka (3-NTYR ima karakterističan spektar u alkalnoj sredini sa maksimumom na 428 nm) i potom odredi koncentracija na osnovu merenja absorbance na 428 nm. Molarni apsorpcioni koeficijent 3-nitrotirozina na 428 nm je $4200 \text{ cm}^{-1}M^{-1}$.

4.15 Detektovanje ditirozina (MacMillan-Crow et al., 1998)

Ditirozin je detektovan fluorimetrijski (Perkin-Elmer LS-5, Luminescence Spectrometer) u vodenom rastvoru uzorka čiji je pH dodatkom 1 M NaOH podešen na 9. Ekscitacija je izvedena na 325 nm, a

emisija praćena na 410 nm. Prisustvo ditirozina je potvrđeno pojavom karakteristićnog emisioog pika na 410 nm.

4.16 Određivanje amino grupa (Fields, 1972)

Amino grupe su određivane u reakciji sa TNBS (2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina) reagensom pri ćemu nastali kompleksi sa amino grupama daju maksimum apsorpcije na 420 nm.

Postupak se sastoji u sledećem:

U 0,5 mL uzorka dodati 0,5 mL 0,1 M boratnog pufera, 20 μ L 1,1 M TNBS rastvora i dobro promešati rastvor. Posle taćno 5 minuta reakcija se zaustavlja dodatkom 2,0 mL 0,1 M NaH_2PO_4 , koji sadrži 1,5 mM Na_2SO_3 i izmeri apsorbanca na 420 nm. Koncentracija amino grupa se određuje na osnovu poznatih molarnih apsorpcionih koeficijenata za TNP- ϵ amino grupe ($a = 19200 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

4.17 Određivanje proteina Bradfordovom metodom (Bradford, 1976)

Rastvore proteina koji sadrže od 10 μ g do 100 μ g pipetirati u epruvetu, i dopuniti sa rastvorom 0,15 M NaCl do zapremine od 0,1 mL. Dodati 5 mL reagensa (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 u 50 mL 95% etanola. U taj rastvor dodati 100 mL 85% fosforne kiseline i dopuniti destilovanom vodom do 1 L. Rastvor filtrirati.) i promešati na Vortex-mešalici. Posle 2 minuta, a pre jednog sata, oćitati apsorbanca na 595 nm naspram slepe probe (0,1 mL odgovarajućeg pufera u kome je rastvoren uzorak proteina i 5 mL reagensa). Koncentracija proteina se oćitava sa odgovarajuće standardne prave za proteine. Standardna prava, koristeći BSA, se priprema svaki put kada se pripremaju novi reagensi.

4.18 MS i IC

Maseni spektri su snimani na masenom spektrometru Finnigan-Mat 8230 sa hemijskom jonizacijom (CI 150 eV), uz izobutan kao jonizujući gas. Korišćen je liofilizovani uzorak.

IC spektri su snimani pravljenjem KBr pilula od liofilizovanog uzorka na Perkin-Elmer FT-IR 1785 spektrometru.

4.19 Elektroforetske tehnike

SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Za pripremanje 12% ili 20% poliakrilamidnog gela za razdvajanje korišćeni su rastvori prikazani u tabeli 11, a kao gel za koncentrovanje korišćen je 4% poliakrilamidni gel pripremljen od 4% akrilamida i 2,7% bisakrilamida u 0,5 M Tris - HCl puferu pH 6,8 koji sadrži 0,1% SDS, 0,05% w/v amonijumpersulfat i 0,05% v/v TEMED. Kao elektrodni pufer korišćen je 0,025 M Tris pH 8,3 koji sadrži 0,192 M Gly i 0,1% SDS. Na ploču je nanošeno po 20 μ L uzorka rastvorenog u puferu za uzorak (0,125M Tris - HCl pH 6,8 koji sadrži 4% SDS, 20% Gly, 10% merkptoetanol), koji je prethodno zagrejan 90 sekundi na ključalom vodenom kupatilu, ili ostavljen u puferu za uzorak preko noći. SDS-PAGE je rađena pri naponu od 160 V, jačini struje od 30 mA, na 4 °C, tokom 2 sata.

Posle završene elektroforeze, gel je ispran destilovanom vodom, fiksiranjem, a potom ostavljen u fiksiru 15 minuta. Kao fiksir korišćena je smeša destilovane vode (500 mL), metanola (400 mL) i sirćetne kiseline (100 mL). Za bojenje gela korišćena je boja 0,25% Coomassie Blue R - 250. Uzorci su obezbojavani 7% sirćetnom kiselinom u destilovanoj vodi.

Tabela 11. Pripremanje poliakrilamidnog gela (12% i 20%) za SDS-PAGE.

	12% gel (mL)	20% gel (mL)
30% akrilamid/0,8% bisakrilamid	6,00	10,00
1,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 8,8	3,75	3,75
H ₂ O	5,25	0,75
10% amonijum persulfat	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,01

PAGE

PAGE je rađena na poliakrilamidnom gelu (Davis, 1964). Korišćen je 10% poliakrilamidni gel, anodni pufer (63 mM Tris, 0,05 M HCl, pH 7,47), katodni pufer (37,6 mM Tris, 40 mM Gly, pH 8,89). PAGE je rađena pri naponu od 160 V, jačini struje od 30 mA, na 4 °C, tokom 2 sata. Posle završene elektroforeze, gel je ispran destilovanom vodom, fiksiranjem, a potom je ostavljen u rastvoru fiksira 15 minuta. Kao fiksir korišćena je smeša destilovane vode (500 mL), metanola (400 mL) i sirćetne kiseline (100 mL). Za bojenje gela korišćen je

0,25% rastvor Coomassie Blue R - 250 u destilovanoj vodi. Obezbojivač je 7% sirćetna kiselina.

Radi dodatne osetljivosti gel je bojen srebrom (Heukeshoven & Dernick, 1985) po sledećem postupku: gel je fiksiran 30 minuta u rastvoru fiksira (50% metanol, 10% sirćetna kiselina i 40% dest.voda), a potom još 30 minuta u 10% glutaraldehidu (u destilovanoj vodi). Nakon fiksiranja gel je ispran nekoliko puta destilovanom vodom u toku 30 minuta. Nakon toga gel je bojen rastvorom srebra nitrata (3,5 mL konc. NH_4OH , 42 mL 0,36% NaOH , 8 mL 19,4% AgNO_3 , destilovana voda do 200 mL) tokom 15 minuta. Posle bojenja gel je ispran destilovanom vodom 5 puta po jedan minut. Odmah nakon ispiranja gel je ostavljen u razvijaju (0,5 g natrijum citrat, 0,5 mL 37% formaldehid, destilovana voda do 100 mL), a zatim po postignutom željenom intenzitetu boje (10 do 15 minuta) gel je ispran destilovanom vodom i postavljen između dva sloja celofana da se osuši. Ukoliko je gel prethodno bojen sa Coomassie Blue R - 250, pre bojenja srebrom, gelovi su obezbojeni potapanjem u rastvor koji sadrži 7% sirćetne kiseline i 5% metanola.

Po završetku bojenja gelovi su skenirani i dalje analizirani primenom postupka razvijenog u našoj laboratoriji uz pomoć programa koji daje (i grafički predstavlja) procentualne intenzitete zatamnjenosti dobijenih traka.

5 DISKUSIJA

Dobro je utvrđeno da metalni centri u biološkim sistemima predstavljaju primarne mete za NO (Stamler et al., 1992b; Radi, 1996). Rezultati opisani u ovoj tezi jasno pokazuju da metalni centri u biološkim sistemima, kao što su MnSOD i "slobodno" gvožđe, ne samo da mogu da reaguju sa NO, nego mogu i da katalizuju transformaciju NO u reaktivne NO⁺ i HNO/NO⁻ vrste (2NO → NO⁺ + NO⁻). Pošto su NO⁺ i HNO/NO⁻ izuzetno reaktivni oni se ne mogu direktno detektovati, nego se njihovo detektovanje vrši na osnovu reakcije NO⁺ sa vodom u kojoj nastaju nitriti (NO⁺) i reakcije sa tiolima (prisutnim ili dodatim u reakcionu smešu) u kojima nastaju S-nitrozotiol (NO⁺) i hidroksilamin (HNO/NO⁻) (Odeljci 4.8 i 4.9). Kako se NO⁺, NO i NO⁻ mogu posmatrati i kao analozi redoks formi kiseonika: O₂, O₂^{·-} i O₂²⁻ (Stamler et al., 1992b) predložili smo naziv dismutacija NO, da bi se ova metal-posredovana redoks transformacija NO razlikovala od drugih reakcija disproporcionisanja NO koje su zapažene u koordinacionoj hemiji (Ford & Lorkovic, 2002). Naši rezultati pokazuju da se mehanizam dismutacije NO katalizovane "slobodnim" gvožđem zasniva na dobro poznatim dinitrozil kompleksima gvožđa (DNIC) (npr Vanin et al., 1997; Vanin, 1998; Vanin et al., 2001), dok je za mehanizam dismutacije NO pomoću SOD predložen mehanizam analog dobro poznatom mehanizmu dismutacije superoksid anjon radikala (Lah et al., 1995) (Odeljci 2.4.3.1 i 2.3.1.3).

Reaktivne NO vrste, generisane MnSOD (*E.coli*) katalizovanom dismutacijom NO, izazivaju ekstenzivnu modifikaciju molekula enzima: fragmentaciju polipeptidnog niza na ostacima histidina u aktivnom mestu, modifikacije amino grupa, te nitrovanje i oksidaciju ostataka tirozina. Za razliku od fragmentacije polipeptidnog niza, modifikacije ostataka tirozina mnogo su sporije: maksimum (od 1) ostataka tirozina se nitruje tek pri produženom (24 sata) inkubiranju enzima sa NO. Nitrovanje je praćeno oksidacijom ostataka tirozina do ditirozina. Gubitak enzimske aktivnosti je u dobroj korelaciji sa navedenim modifikacijama (Odeljak 3.1.1).

Nitrovanje i oksidacija ostataka tirozina u humanoj MnSOD i MnSOD (*E.coli*) pomoću peroksinitrita intenzivno su izučavani u nizu *in vitro* studija (Ischiropoulos et al., 1992; MacMillan et al., 1998; Yamakura et al., 1998; MacMillan, 1999; Quijano et al., 2001). NO je u poređenju sa peroksinitritom (Ischiropoulos et al., 1992; MacMillan-Crow et al., 1998; Yamakura et al., 1998) mnogo manje

invazivan. Tako, inkubiranje *E.coli* MnSOD sa NO (1 mM, 37°C, 2h) izaziva samo 50% inaktivacije, dok izlaganje milimolarnim koncentracijama peroksinitrita dovodi do skoro potpune inaktivacije enzima (Ischiropoulos et al., 1992; MacMillan et al., 1998; Yamakura et al., 1998). Inkubiranje sa NO izaziva brzi, početni gubitak aktivnosti (ca 30%) (Slika 27), dok je za potpuni gubitak aktivnosti potrebno produženo (24 sata) (Slika 27) inkubiranje sa NO. Međutim, u poređenju sa peroksinitritom, koji izaziva samo nitrovanje i oksidaciju ostataka tirozina, (MacMillan-Crow et al., 1998) inkubiranje sa NO dovodi, kao što smo videli, do ekstenzivnijih modifikacija *E.coli* MnSOD.

Pretpostavili smo da NO indukuje nitrovanje Tyr34 u *E.coli* MnSOD. Ovaj tirozinski ostatak koji se nalazi svega nekoliko angstrema od mangana u aktivnom centru (Edwards et al., 1996; Stroupe et al., 2001), primarno se nitruje i u reakciji sa peroksinitritom (MacMillan et al., 1998; Yamakura et al., 1998). Ovaj ostatak tirozina se nalazi na vrhu substratnog levka (Edwards et al., 1996; Stroupe et al., 2001) tako da može da dođe u dodir sa nitrujućim vrstama koje se generišu u aktivnom centru enzima (Slika 14).

Kovalentno vezivanje dva ostatka tirozina, pri čemu nastaje 3,3'-ditirozin, može da nastane kombinacijom dva tirozil radikala u procesu koji će biti znatno olakšan, ako se oni nalaze u međusobnoj blizini. U skladu sa pretpostavkom datom za oksidaciju ostataka tirozina peroksinitritom (MacMillan et al., 1998; MacMillan, 1999) pretpostavili smo da verovatno ostaci Tyr184 (Edwards et al., 1996) iz susednih subjedinica mogu međusobno da se povežu.

MacMillan et al., (1998) su našli da se humana MnSOD ne inaktivira u značajnoj meri pri inkubiranju sa NO, što je iznenađujuće s obzirom na identičnost strukture aktivnih centara ova dva enzima (Edwards et al., 1996). Međutim, za razliku od *E.coli* MnSOD, koja ne sadrži ostatke cisteina, humana MnSOD sadrži dva ostatka cisteina po subjedinici (Borgstahl et al., 1992). Uzimajući u obzir da su niskomolekulski tioli mete za NO⁻, NO⁺ i NO₂[·], (Arnelle and Stamler, 1995; Butler et al., 1995; Hogg, 2002) pretpostavili smo da ostaci cisteina Cys140 u humanoj MnSOD koji su blizu aktivnog centra enzima, (Slika 13) mogu da reaguju sa ovim RNOS i tako spreče modifikaciju i inaktivaciju enzima.

Uzimajući sve ovo u obzir, pretpostavili smo da i humana MnSOD može da reaguje sa NO, ali da je humani enzim mnogo manje podložan NO

posredovanim modifikacijama i inaktivaciji u odnosu na MnSOD (*E.coli*), što objašnjava zašto je ovo prošlo nezapaženo u studiji McMillan-Crow et al., (1998). Ako su ove pretpostavke tačne to bi značilo da je potrebno duže inkubiranje da bi se utvrdilo da li humana MnSOD reaguje sa NO.

Činjenica da je u nizu bolesti, za koje je karakterističan oksidativni stres i povećana produkcija NO, nađeno da je MnSOD agregirana i nitrovana, zajedno sa *in vitro* eksperimentima u kojima je pokazano da sintetički peroksinitrit izaziva nitrovanje i oksidaciju ostataka tirozina u MnSOD, naveli su na pretpostavku da bi peroksinitrit mogao da bude glavni agens za nitrovanje tirozina u MnSOD *in vivo* (MacMillan et al., 1998; Yamakura et al., 1998). Međutim, direktni dokazi za peroksinitrit-posredovano nitrovanje proteina *in vivo* još uvek nedostaje. Štaviše, u većem broju najnovijih studija je pokazano da istovremeno generisanje NO i $O_2^{\cdot-}$, što bolje aproksimira *in vivo* uslove od dodavanja koncentrovanog peroksinitrita, ne dovodi do nitrovanja tirozina (Van der Vliet, 1995; Pfeiffer and Mayer, 1998; Goldstein et al., 2000; Hodges et al., 2000; Pfeiffer et al., 2000). Sve više je dokaza koji ukazuju da su mehanizmi zasnovani na nitritu mnogo relevantniji za nitrovanje tirozina *in vivo* (Odeljak 2.4.4) (Pfeiffer et al., 2001; Herold, 2004).

Na osnovu naših rezultata može se pretpostaviti da bi NO-posredovano nitrovanje moglo da bude relevantno i za humanu MnSOD *in vivo* pri uslovima koje karakteriše overprodukcija NO tokom dužeg perioda. Joni prelaznih metala su glavne mete za NO u biološkim sistemima (Henry and Singel, 1996), tako da bi reakcija NO sa MnSOD bila svakako specifičnija od reakcije sa peroksinitritom, koji se ne samo brzo raspada na neutralnom pH, nego i reaguje sa svim klasama biomolekula uključujući i antioksidanse malih molekulskih masa koji su prisutni u velikim količinama u ćeliji (Koppenol, 1998; Groves, 1999). U prilog ovoj pretpostavci može se navesti i nedavni nalaz da je u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata obolelih od neurodegenerativnih bolesti MnSOD jedini protein sa nitrovanim ostacima tirozina (Aoyama et al., 2000). Peroksinitrit efikasno nitruje ostatke tirozina u Cu/ZnSOD (Ischiropulos et al., 1992), dok naši rezultati pokazuju da NO ne izaziva inaktivaciju Cu/ZnSOD. Cu/ZnSOD je mnogo više zastupljen u cerebrospinalnoj tečnosti nego MnSOD (Yoshida et al., 1994), na osnovu čega bi se očekivalo da bi Cu/ZnSOD, a ne MnSOD trebalo da bude bolja meta za peroksinitrit. Ovo, zajedno sa činjenicom da je i sadržaj nitrita u

cerebrospinalnoj tečnosti povećan u neurodegenerativnim bolestima (Tohgi et al., 1999b), ukazuje da bi predloženi mehanizam nitrovanja MnSOD iniciran nitritima i RNOS generisanim u reakciji NO sa MnSOD (Odeljak 2.4.4) bio mnogo verovatniji.

Reakcija NO sa *E.coli* MnSOD može da doprinosi rezistentnosti *E.coli* na NO posredovanu odbranu domaćina (Nathan & Shiloh, 2000). RNOS koje predstavljaju deo odbrambenog mehanizma domaćina imaju DNK kao krajnji cilj (Nathan & Shiloh, 2000), a MnSOD u *E.coli* štiti njenu DNK od oksidativnih oštećenja (Hopkin et al., 1992). Smanjenjem nivoa superoksid anjon radikala i NO, MnSOD sprečava nastajanje peroksinitrita koji je baktericidniji od oba svoja prekursora. Naši rezultati ukazuju da će reakcija NO sa MnSOD u *E.coli* dovesti do transformacije NO u reaktivne vrste koje su manje reaktivne od peroksinitrita.

DNIC inicirana transformacija NO u NO⁺ (vezan za jone gvožđa u kompleksu) dobro je poznata (Odeljak 2.4.3.1). Rezultati opisani u ovom radu pokazuju da joni gvožđa prisutni u katalitičkim (mikromolarnim) koncentracijama, u prisustvu niskomolekulskih anjonskih liganada, mogu da katalizuju DNIC iniciranu dismutaciju NO u NO⁺ i HNO/NO⁻ vrste (Odeljak 3.2). Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je kapacitet jona gvožđa da katalizuju dismutaciju NO u obrnutoj srazmeri sa stabilnošću odgovarajućih DNIC kompleksa (Odeljak 3.2.4). Tako, znatno veće količine nitrita, GSNO, i hidroksilamina (odnosno, indirektno NO⁺ i HNO/NO⁻ vrsta), nađenih u rastvorima koji su sadržavali cistein, urat ili aminokiseline u odnosu na rastvore u kojima je bio sam GSH (Tabele 6 i 7; Slika 38), reflektuju veću stabilnost DNIC sa GSH (Mulsch et al., 1991).

Biološka uloga mokraćne kiseline kao antioksidanta je dobro poznata. Ona proističe iz sposobnosti urata da deluje kao moćan hvatač ROS i RNOS, kao i da vezuje jone gvožđa i tako sprečava njihovu pro-oksidativnu ulogu (Odeljak 2.3.1.2) (Halliwell & Gutteridge, 1999). Rezultati opisani u ovom radu da joni gvožđa u prisustvu urata katalizuju dismutaciju NO u NO⁺ i HNO/NO⁻ vrste, ukazuje na potpuno novu ulogu mokraćne kiseline. Ovo dovodi do raspadanja urata i nastajanja nitrozo derivata koji za sada nisu identifikovani. Proces je izraženiji u odsustvu GSH, za kojeg je pokazano da u zavisnosti od odnosa GSH/urat štiti urat od raspadanja.

U saglasnosti sa ranijim studijama koje su pokazale da su DNIC vezani za proteine stabilni, ni RSNO niti hidroksilamin nisu

detektovani u rastvorima proteina i tragova gvožđa inkubiranim sa NO. Međutim, po dodatku urata došlo je do reakcije -SH grupa i nastajanja hidroksilamina, S-nitrozovanja ostataka cisteina, kao i modifikacija amino grupa u proteinu (Odeljak 3.2.2). Svi ovi rezultati ukazuju da mokraćna kiselina, u fiziološki relevantnim koncentracijama, može da se takmiči sa GSH i proteinskim -SH grupama za jone gvožđa, te da povećava kapacitet jona gvožđa da katalizuju dismutaciju NO.

Pored urata pokazano je da α -aminokiseline, konstituenti široko rasprostranjeni u biološkim sistemima, koje daju nestabilne DNIC (Woolum et al., 1968), mogu takođe da se takmiče sa tiolima za jone gvožđa, te da povećavaju njihov kapacitet da katalizuju dismutaciju NO. Važno je napomenuti da u prisustvu tirozina dolazi do nastajanja 3-nitrotirozina i ditirozina, po reakcionom mehanizmu analognom onom predloženom za nitrovanje ostataka tirozina u MnSOD (*E.coli*) (Odeljak 2.4.4). Velika nestabilnost ovih DNIC kompleksa, posebno pri niskim koncentracijama (Vanin et al., 1996) objašnjava zašto nisu detektovani u *ex vivo* eksperimentima. Na osnovu svega iznetog može se pretpostaviti da stepen i efekti dismutacije NO katalizovane jonima gvožđa u biološkom okruženju može da zavisi od distribucije "slobodnog" gvožđa u nitrozil kompleksima, što će biti funkcija pojedinačnih konstanti stabilnosti kompleksa i relativne koncentracije svakog liganda.

Dismutacija NO katalizovana jonima gvožđa može biti relevantna za metabolizam NO u biološkoj sredini u kojoj je "slobodno" gvožđe prisutno endogeno, ili nastaje kao rezultat oksidativnog stresa (Halliwell & Gutteridge, 1999). Tako, sposobnost kompleksa DNIC tipa sa "slobodnim" gvožđem da deluju kao S-nitrozujući agensi u ćelijama i tkivima (Mulsch et al., 1991; Kim et al., 2000) treba proširiti i na generisanje HNO/NO⁻ (i/ili N₂O), proizvoda reakcije dimerizacije i dehidratacije HNO (Odeljak 2.4.3.3).

Na veliki fiziološki i (potencijalni) farmakološki značaj HNO/NO⁻ vrsta ukazuju najnovije studije koje su pokazale da donori NO⁻ izazivaju relaksaciju krvnih sudova i pozitivnu srčanu inotropiju, stimulisanjem CGRP peptida (Booth et al., 2000; Paolocci et al., 2001; Feelisch, 2003). Pored toga, pokazano je da HNO/NO⁻ može da izazove štetne efekte u kardiovaskularnom sistemu (Ma et al., 1999). Predloženo je da HNO/NO⁻ uključen u ove procese može da nastane direktno, aktivnošću NOS, ili pak raspadanjem S-nitrozotiola (Miranda et al., 2001; Feelisch, 2003). Mikrovaskularni endotel je

jedan od najvažnijih mesta za produkciju urata u koronarnom sistemu, a urat se oslobađa i iz humanog miokarda (Becker, 1993, Halliwell & Gutteridge, 1999). "Slobodno" gvožđe je prisutno u zidu arterija (Halliwell & Gutteridge, 1999), a joni prelaznih metala, uključujući i "slobodno" gvožđe, se nalaze u miokardu (Spencer et al., 1998). Može se pretpostaviti da ovo može doprineti DNIC iniciranom generisanju HNO/NO⁻ i nastajanju RSNO.

Dismutacija NO katalizovana jonima gvožđa može da se očekuje u uslovima ograničenog prisustva kiseonika, kao na primer u ishemiji, ali i u prisustvu kiseonika. Prisustvo kiseonika će da poveća efikasnost redoks transformacije NO u NO⁺, što će rezultovati u nastajanju većih količina S-nitrozotiola (Vanin, 1998). S druge strane, HNO/NO⁻ može da reaguje sa kiseonikom dajući peroksinitrit ili jedinstvenu reaktivnu vrstu slične reaktivnosti kao peroksinitrit (Wink et al., 1998b; Hughes, 1999; Miranda et al., 2001; Espey et al., 2002). Tako se može očekivati da će prisustvo kiseonika uticati na veći broj sekundarnih reakcija HNO/NO⁻.

Dismutacija NO katalizovana jonima gvožđa može biti izraženija u ekstraćelijskim tečnostima koje sadrže "slobodno" gvožđe, niske nivoe GSH i proteinskih -SH grupa, a visoke koncentracije niskomolekulskih anjonskih sastojaka. Rezultati "ex vivo" eksperimenata urađenih u ovom radu potvrđuju ovu pretpostavku. Pri inkubiranju zdravih CSF uzoraka, koji sadrže mikromolarne koncentracije "slobodnog" gvožđa (Halliwell & Gutteridge, 1999) sa NO pokazano je nastajanje nitrita, RSNO i hidroksilamina, koje je izostalo u prisustvu o-fenantrolina, selektivnog helatora za Fe²⁺ (Vanin, 1998). Ovo je potvrdilo našu pretpostavku da "slobodno" gvožđe u biološkim sistemima može da katalizuje dismutaciju NO.

Pored toga došli smo do interesantnog saznanja da urat određuje kapacitet "slobodnog" gvožđa u CSF uzorcima da katalizuje dismutaciju NO, dok je askorbat najefikasniji hvatač generisanih RNOS. Askorbat je reaktivniji u odnosu na generisane RNOS od (proteinskih) -SH grupa, koje se smatraju glavnim metama za NO⁺ i NO⁻ vrste (Odeljak 3.3.2). Tako je u CSF uzorcima pacijenata obolelih od amiotrofične lateralne skleroze, u kojima su nađene povećane koncentracije urata i smanjene koncentracije askorbata u odnosu na kontrolne CSF uzorke, inkubiranim sa NO, pokazana znatno veća dismutacija NO nego u kontrolnim uzorcima. Mehanizmom dismutacije NO mogu se bolje nego nastajanjem peroksinitrita objasniti nađene povišene koncentracije nitrita i slobodnog 3-nitrotirozina u CSF

uzorcima SALS pacijenata (Tohgi et al., 1999a). Povećane produkcije NO i mokraćne kiseline su karakteristične za razne neurodegenerativne bolesti (Stover et al., 1997; Thomson et al., 2001). Gvožđe, koje je važno za funkcionisanje normalnog mozga, može biti oslobođeno u većim koncentracijama u raznim neurološkim oboljenjima, što doprinosi oksidativnim oštećenjima centralnog nervnog sistema u ovim oboljenjima (Halliwell & Gutteridge, 1999; Thompson et al., 2001). Može se pretpostaviti da će pod ovim uslovima, koje karakteriše i povećana produkcija NO (Odeljak 2.2.2), doći do povećane dismutacije NO što može imati uticaja na mehanizme bolesti.

Pored neurotoksičnih, pokazano je u *ex vivo* eksperimentima da NO može da ima i neuroprotektivne efekte (Lipton et al., 1993; Wink et al., 1995; Tennesi et al., 1997). Neurotoksični efekti se povezuju sa peroksinitritom (Lipton et al., 1993; Schulz et al., 1995b) i nitroksilom (Lipton et al., 1993; Kim et al., 1999), dok se neuroprotektivni efekti povezuju sa S-nitrozilovanjem NMDA receptora (Lipton et al., 1993; Tennesi et al., 1997; Stamler et al., 2001). Naši rezultati ukazuju da dismutacija NO, katalizovana "slobodnim" gvožđem, može da bude uključena u oba od ovih mehanizama.

Rezultati prezentirani u ovom radu ubedljivo pokazuju da metal-posredovana dismutacija NO u biološkim uslovima ne samo da je moguća, nego je i fiziološki relevantna. Zbog toga fiziološki značaj metal posredovane dismutacije NO zaslužuje dalja istraživanja.

6 CITIRANA LITERATURA

Abe K., Pan L.H., Watanabe M., Kato T., & Itoyama Y. (1995). Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 199: 152-154.

Abu-Soud H.M., Ichimori K., Presta A., & Stuehr D.J. (2000). Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 275: 17349-17357.

Adak S., Wang Q., & Stuehr D.J. (2000). Molecular basis for hyperactivity in tryptophan 409 mutants of neuronal NO synthase. *J. Biol. Chem.* 275 : 17434-17439.

Adelman R., Saul R.L., & Ames B.N. (1988). Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2706-2708.

Aji W., Ravalli S., Szabolcs M., Jiang X.C., Sciacca R.R., Michler R.E., & Cannon P.J. (1997). L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Circulation* 95: 430-437.

Akaike T., Noguchi Y., Ijiri S., Setoguchi K., Suga M., Zheng Y.M., Dietzschold B., & Maeda H. (1996). Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2448-2453.

Alderton W.K., Cooper C.E., & Knowles R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.

Alencar J.L., Chalupsky K., Sarr M., Schini-Kerth V., Vanin A.F., Stoclet J.C., & Muller B. (2003). Inhibition of arterial contraction by dinitrosyl-iron complexes: critical role of the thiol ligand in determining rate of nitric oxide (NO) release and formation of releasable NO stores by S-nitrosation. *Biochem. Pharmacol.* 66: 2365-2374.

Almeida A. & Bolanos J.P. (2001). A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 77: 676-690.

Altman J.D., Kinn J., Duncker D.J., & Bache R.J. (1994). Effect of inhibition of nitric oxide formation on coronary blood flow during exercise in the dog. *Cardiovasc. Res.* 28: 119-124.

Alvarez B., Rubbo H., Kirk M., Barnes S., Freeman B.A., & Radi R. (1996). Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 390-396.

Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., & Hochstein P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6858-6862.

Ames B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264.

Anderson S.O. (1966). Covalent cross-links in a structural protein, resilin. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 263: 1-81.

Annane D., Sanquer S., Sebille V., Faye A., Djuranovic D., Raphael J.C., Gajdos P., & Bellissant E. (2000). Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet* 355: 1143-1148.

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

Ara J., Przedborski S., Naini A.B., Jackson-Lewis V., Trifiletti R.R., Horwitz J., & Ischiropoulos H. (1998). Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7659-7663.

Arnal J.F., Dinh-Xuan A.T., Pueyo M., Darblade B., & Rami J. (1999). Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 1078-1087.

Arnelle D.R. & Stamler J.S. (1995). NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 318 : 279-285.

Arnelle L. & Stamler J. (1996) Detection of hydroxylamine. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 541-552. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.

Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., & Murad F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3203-3207.

Ascoli F., Rosaria H., Fannelli R., & Antonini E. (1981) Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins. In *Methods in enzymology* (ed. Antonini E., Rossi-Bernardi L., and Chiancone E.), pp. 72-87. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.

Averill B.A. & Tiedje J.M. (1982). The chemical mechanism of microbial denitrification. *FEBS Lett.* 138: 8-12.

Averill B.A. (1996). Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chem. Rev.* 96: 2951-2964.

Bachmaier K., Neu N., Pummerer C., Duncan G.S., Mak T.W., Matsuyama T., & Penninger J.M. (1997). iNOS expression and nitrotyrosine formation in the myocardium in response to inflammation is controlled by the interferon regulatory transcription factor 1. *Circulation* 96: 585-591.

Bagasra O., Michaels F.H., Zheng Y.M., Bobroski L.E., Spitsin S.V., Fu Z.F., Tawadros R., & Koprowski H. (1995). Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12041-12045.

Bannerman D.M., Chapman P.F., Kelly P.A., Butcher S.P., & Morris R.G. (1994). Inhibition of nitric oxide synthase does not impair spatial learning. *J. Neurosci.* 14: 7404-7414.

Bannister J.V., Bannister W.H. & Rotilio G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 111-180.

Barnes P.J. (1995). Nitric oxide and airway disease. *Ann. Med.* 27: 389-393.

Bartberger M.D., Fukuto J.M., & Houk K.N. (2001). On the acidity and reactivity of HNO in aqueous solution and biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2194-2198.

Bartlett D., Church D.F., Bounds P.L., & Koppenol W.H. (1995). The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxyxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.* 18: 85-92.

Bazylnski D.A. & Hollocher T.C. (1985). Metmyoglobin and methemoglobin as efficient traps for nitrosyl hydride (nitroxyl) in neutral aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 7982-7986.

Beal M.F., Ferrante R.J., Henshaw R., Matthews R.T., Chan P.H., Kowall N.W., Epstein C.J., & Schulz J.B. (1995). 3-Nitropropionic acid neurotoxicity is attenuated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *J. Neurochem.* 65: 919-922.

Beal M.F., Ferrante R.J., Browne S.E., Matthews R.T., Kowall N.W., & Brown R.H., Jr. (1997). Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 42: 644-654.

Beck K.F., Eberhardt W., Frank S., Huwiler A., Messmer U.K., Muhl H., & Pfeilschifter J. (1999). Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J. Exp. Biol.* 202: 645-653.

Becker B.F. (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Rad. Biol. Med.* 14: 615-631.

Beckman J.S., Carson M., Smith C.D., & Koppenol W.H. (1993). ALS, SOD and peroxyxynitrite. *Nature* 364: 584.

Beckman J.S., Chen J., Crow J.P., & Ye Y.Z. (1994). Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxyxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog. Brain. Res.* 103: 371-380.

Beckman J.S. & Koppenol W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxyxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271: C1424-C1437.

Benzi G. & Moretti A. (1995). Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* 16: 661-674.

Beyer W.F., Jr., Reynolds J.A., & Fridovich I. (1989). Differences between the manganese- and the iron-containing superoxide dismutases of *Escherichia coli* detected through sedimentation equilibrium, hydrodynamic, and spectroscopic studies. *Biochemistry* 28: 4403-4409.

Beyer W., Imlay J., & Fridovich I. (1991). Superoxide dismutases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 40: 221-253.

Bleijenberg B.G., Van Eijk H.G., & Leijnse B. (1971). The determination of non-heme iron and transferrin in cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta* 31: 277-281.

- Boese M., Mordvintcev P.I., Vanin A.F., Busse R., & Mulsch A. (1995). S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex. *J. Biol. Chem.* 270: 29244-2929.
- Bohme G.A., Bon C., Lemaire M., Reibaud M., Piot O., Stutzmann J.M., Doble A., & Blanchard J.C. (1993). Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9191-9194.
- Bonner L. & Stedman G. (1996) The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 4-18. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Bonnett R. & Nicolaidou P. (1977). Nitrite and the environment. The nitrosation of α -amino acid derivatives. *Heterocycles* 7: 637-659.
- Booth B.P., Tabrizi-Fard M.A., & Fung H. (2000). Calcitonin gene-related peptide-dependent vascular relaxation of rat aorta. An additional mechanism for nitroglycerin. *Biochem. Pharmacol.* 59: 1603-1609.
- Borgstahl G.E., Parge H.E., Hickey M.J., Beyer W.F., Jr., Hallewell R.A., & Tainer J.A. (1992). The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* 71: 107-118.
- Borgstahl G.E., Parge H.E., Hickey M.J., Johnson M.J., Boissinot M., Hallewell R.A., Lepock J.R., Cabelli D.E., & Tainer J.A. (1996). Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry* 35: 4287-4297.
- Bosse H.M. & Bachmann S. (1997). Immunohistochemically detected protein nitration indicates sites of renal nitric oxide release in Goldblatt hypertension. *Hypertension* 30: 948-952.
- Boveris A. (1984). Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* 105: 429-435.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bredt D.S. & Snyder S.H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 175-195.
- Breuer W., Greenberg E., & Cabantchik Z.I. (1997). Newly delivered transferrin iron and oxidative cell injury. *FEBS Lett.* 403: 213-219.
- Broillet M.C. (1999). S-nitrosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 1036-1042.
- Brooks B.R. (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J. Neurol. Sci.* 124 Suppl: 96-107.
- Brown G.C. (1995). Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem.* 232: 188-191.

Bruch-Gerharz D., Ruzicka T., & Kolb-Bachofen V. (1998). Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. *Arch. Dermatol. Res.* 290: 643-651.

Bruijn L.I., Beal M.F., Becher M.W., Schulz J.B., Wong P.C., Price D.L., & Cleveland D.W. (1997). Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)- like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS- linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 94: 7606-7611.

Bryar T.R. & Eaton D.R. (1992). Electronic configuration and structure of paramagnetic iron dinitrosyl complexes. *Can. J. Chem.* 70: 1917-1926.

Buettner G.R. & Jurkiewicz B.A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat. Res.* 145: 532-541.

Bush A.I. (2000). Metals and neuroscience. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 184-191.

Butler A.R., Flitney F.W., & Williams D.L. (1995). NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron- nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 18-22.

Butler A.R. & Megson I.L. (2002). Non-heme iron nitrosyls in biology. *Chem. Rev.* 102: 1155-1166.

Buttery L.D., Springall D.R., Chester A.H., Evans T.J., Standfield E.N., Parums D.V., Yacoub M.H., & Polak J.M. (1996). Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab. Invest.* 75: 77-85.

Cai H. & Harrison D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87: 840-844.

Calingasan N.Y., Park L.C., Calo L.L., Trifiletti R.R., Gandy S.E., & Gibson G.E. (1998). Induction of nitric oxide synthase and microglial responses precede selective cell death induced by chronic impairment of oxidative metabolism. *Am. J. Pathol.* 153: 599-610.

Campbell D.L., Stamler J.S., & Strauss H.C. (1996). Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J. Gen. Physiol.* 108: 277-293.

Cannon R.O., III (1998). Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin. Chem.* 44: 1809-1819.

Cardillo C., Kilcoyne C.M., Quyyumi A.A., Cannon R.O., III, & Panza J.A. (1997a). Role of nitric oxide in the vasodilator response to mental stress in normal subjects. *Am. J. Cardiol.* 80: 1070-1074.

Cardillo C., Kilcoyne C.M., Quyyumi A.A., Cannon R.O., III, & Panza J.A. (1997b). Decreased vasodilator response to isoproterenol during nitric oxide inhibition in humans. *Hypertension* 30: 918-921.

Carr A. & Frei B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13: 1007-1024.

Cassina A. & Radi R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 328: 309-316.

Castro L., Rodriguez M., & Radi R. (1994). Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269: 29409-29415.

Cayatte A.J., Palacino J.J., Horten K., & Cohen R.A. (1994). Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler. Thromb.* 14: 753-759.

Challis B.C. (1989). Chemistry and biology of nitrosated peptides. *Cancer Surv.* 8: 363-384.

Chen B., Keshive M., & Deen W.M. (1998). Diffusion and reaction of nitric oxide in suspension cell cultures. *Biophys. J* 75: 745-754.

Chen Z., Zhang J., & Stamler J.S. (2002). Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8306-8311.

Choe N., Tanaka S., & Kagan E. (1998). Asbestos fibers and interleukin-1 upregulate the formation of reactive nitrogen species in rat pleural mesothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 226-236.

Chou S.M., Wang H.S., & Komai K. (1996). Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* 10: 249-258.

Chung E., Curtis D., Chen G., Marsden P.A., Twells R., Xu W., & Gardiner M. (1996). Genetic evidence for the neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1) as a susceptibility locus for infantile pyloric stenosis. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 363-370.

Chung H.T., Pae H.O., Choi B.M., Billiar T.R., & Kim Y.M. (2001). Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 1075-1079.

Clancy R.M., Leszczynska-Piziak J., & Abramson S.B. (1992). Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 90: 1116-1121.

Cleeter M.W., Cooper J.M., Darley-Usmar V.M., Moncada S., & Schapira A.H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345: 50-54.

Clementi E., Brown G.C., Feelisch M., & Moncada S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7631-7636.

Coeroli L., Renolleau S., Arnaud S., Plotkine D., Cachin N., Plotkine M., Ben-Ari Y., & Charriaut-Marlangue C. (1998). Nitric oxide production and perivascular tyrosine nitration following focal ischemia in neonatal rat. *J. Neurochem.* 70: 2516-2525.

- Collard J.F., Cote F., & Julien J.P. (1995). Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 375 : 61-64.
- Connor J.R. (1997) Metals and oxidative damage in neurological disorders. Plenum Press, New York.
- Cooper C.E. (1994) Ferryl iron and protein free radicals. In Free Radical Damage and its Control (ed. Rice-Evans C.A. and Burdon R.H.), pp. 65-109. Elsevier, Amsterdam.
- Cooper C.E. & Brown G.C. (1995). The interactions between nitric oxide and brain nerve terminals as studied by electron paramagnetic resonance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 404-412.
- Cooper A.J.L. (1997) Glutathione in the brain: Disorders of glutathione metabolism. In The molecular and genetic basis of neurological disease (ed. Rosenber R.N., Prusiner S.B., DiMauro S., Barch R.L., and Klunk L.M.), pp. 1242-1245. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Cooper C.E., Patel R.P., Brookes P.S., & Darley-Usmar V.M. (2002). Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem. Sci.* 27: 489-492.
- Cotton, A.F., Wilkinson, & G (1988) Advanced Inorganic Chemistry. 4th ed., Wiley, New York.
- Cowden W.B., Cullen F.A., Staykova M.A., & Willenborg D.O. (1998). Nitric oxide is a potential down-regulating molecule in autoimmune disease: inhibition of nitric oxide production renders PVG rats highly susceptible to EAE. *J. Neuroimmunol.* 88: 1-8.
- Coyle J.T. & Puttfarcken P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.
- Crichton R.R. & Ward R.J. (1992). Iron metabolism - new perspectives in view. *Biochemistry* 31: 11255-11264.
- Cross A.H., Misko T.P., Lin R.F., Hickey W.F., Trotter J.L., & Tilton R.G. (1994). Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *J. Clin. Invest.* 93: 2684-2690.
- Cross A.H., Manning P.T., Keeling R.M., Schmidt R.E., & Misko T.P. (1998). Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 88: 45-56.
- Crow J.P., Sampson J.B., Zhuang Y., Thompson J.A., & Beckman J.S. (1997). Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J. Neurochem.* 69: 1936-1944.
- Culotta E. & Koshland D.E., Jr. (1992). NO news is good news. *Science* 258: 1862-1865.
- Cuzzocrea S., Zingarelli B., Villari D., Caputi A.P., & Longo G. (1998a). Evidence for in vivo peroxynitrite production in human chronic hepatitis. *Life Sci.* 63: L25-L30.

- Cuzzocrea S., Zingarelli B., & Caputi A.P. (1998b). Role of constitutive nitric oxide synthase and peroxynitrite production in a rat model of splanchnic artery occlusion shock. *Life Sci.* 63: 789-799.
- Dahn H., Loewe L., Lüscher E., & Menasse R. (1960). Über die oxydation von ascorbinsäure durch salpetrige saure. Teil I: Stöchiometrie und kinetische messtechnik. *Helv. Chim. Acta* 43: 287-293.
- Daiber A., Nauser T., Takaya N., Kudo T., Weber P., Hultschig C., Shoun H., & Ullrich V. (2002). Isotope effects and intermediates in the reduction of NO by P450(NOR). *J. Inorg. Biochem.* 88: 343-352.
- Davies K.J., Sevanian A., Muakkassah-Kelly S.F., & Hochstein P. (1986). Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* 235: 747-54.
- Davis B.J. (1964). Disc Electrophoresis-II, Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Davis K.L., Martin E., Turko I.V., & Murad F. (2001). Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41: 203-236.
- Dawson V.L., Dawson T.M., Uhl G.R., & Snyder S.H. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3256-3259.
- DeMaster E.G., Quast B.J., Redfern B., & Nagasawa H.T. (1995). Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry* 34: 11494-11499.
- Doyle C., Holscher C., Rowan M.J., & Anwyl R. (1996). The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitro-indazole blocks both long-term potentiation and depotentiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo. *J. Neurosci.* 16: 418-424.
- Drapier J.C., Pellat C., & Henry Y. (1991). Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages. *J. Biol. Chem.* 266: 10162-10167.
- Duhe R.J., Nielsen M.D., Dittman A.H., Villacres E.C., Choi E.J., & Storm D.R. (1994). Oxidation of critical cysteine residues of type I adenylyl cyclase by o-iodosobenzoate or nitric oxide reversibly inhibits stimulation by calcium and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 269: 7290-7296.
- Edwards R.A., Baker H.M., Whittaker M.M., Whittaker J.W., Jameson G.B., & Baker E.N. (1998). Crystal structure of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase at 2.1-Å resolution. *JBIC* 3: 161-171.
- Eiserich J.P., Butler J., van d., V, Cross C.E., & Halliwell B. (1995). Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals. *Biochem. J.* 310: 745-749.
- Eiserich J.P., Cross C.E., Jones A.D., Halliwell B., & van d., V (1996). Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J. Biol. Chem.* 271: 19199-19208.
- Eiserich J.P., Patel R.P., & O'Donnell V.B. (1998). Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med.* 19: 221-357.

- el Dwairi Q., Comtois A., Guo Y., & Hussain S.N. (1998). Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *Am. J. Physiol.* 274: C770-C779.
- Emerit J., Beaumont C., & Trivin F. (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed. Pharmacother.* 55: 333-339.
- Epsztejn S., Kakhlon O., Glickstein H., Breuer W., & Cabantchik I. (1997). Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal. Biochem.* 248: 31-40.
- Eritja R., Horowitz D.M., Walker P.A., Ziehler-Martin J.P., Boosalis M.S., Goodman M.F., Itakura K., & Kaplan B.E. (1986). Synthesis and properties of oligonucleotides containing 2'-deoxynebularine and 2'-deoxyxanthosine. *Nucleic Acids Res.* 14: 8135-8153.
- Espey M.G., Miranda K.M., Thomas D.D., & Wink D.A. (2002). Ingress and reactive chemistry of nitroxyl-derived species within human cells. *Free Rad. Biol. Med.* 33: 827-834.
- Fechner A., Bohme C., Gromer S., Funk M., Schirmer R., & Becker K. (2001). Antioxidant status and nitric oxide in the malnutrition syndrome kwashiorkor. *Pediatr. Res.* 49: 237-243.
- Feelisch M. & Stamler J.S. (1996) Donors of nitrogen oxides. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 71-115. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Feelisch M. (2003). Nitroxyl gets to the heart of the matter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4978-4980.
- Ferranti P., Malorni A., Mamone G., Sannolo N., & Marino G. (1997). Characterisation of S-nitrosohaemoglobin by mass spectrometry. *FEBS Lett.* 400: 19-24.
- Fields R. (1972) The rapid determination of amino groups with TNBS. In *Methods in Enzymology* (ed. Hirs C.H.W. and Timasheff S.N.), Vol.25, pp. 464-468. Academic Press, New York.
- Floor E. (2000). Iron as a vulnerability factor in nigrostriatal degeneration in aging and Parkinson's disease. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 46: 709-720.
- Floris R., Piersma S.R., Yang G., Jones P., & Wever R. (1993). Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur. J. Biochem.* 215: 767-775.
- Floyd R.A. (1991). Oxidative damage to behavior during aging. *Science* 254: 1597.
- Folkes L.K., Candeias L.P., & Wardman P. (1995). Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 323: 120-126.
- Ford H., Watkins S., Reblock K., & Rowe M. (1997). The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.* 32: 275-282.
- Ford P.C., Wink D.A., & Stanbury D.M. (1993). Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett.* 326: 1-3.

- Ford P.C. & Lorkovic I.M. (2002). Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes. *Chem. Rev.* 102: 993-1018.
- Forman L.J., Liu P., Nagele R.G., Yin K., & Wong P.Y. (1998). Augmentation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurochem. Res.* 23: 141-148.
- Forstermann U. & Kleinert H. (1995). Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 352: 351-364.
- Fridovich I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 239-257.
- Fridovich I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11.
- Fries D.M., Paxinou E., Themistocleous M., Swanberg E., Griendling K.K., Salvemini D., Slot J.W., Heijnen H.F., Hazen S.L., & Ischiropoulos H. (2003) Expression of inducible nitric-oxide synthase and intracellular protein tyrosine nitration in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 278: 22901-22907.
- Fukuto J.M. and Mayer B. (1996) The enzymology of nitric oxide synthase. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 147-160. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Fujita K., Yamauchi M., Shibayama K., Ando M., Honda M., & Nagata Y. (1996). Decreased cytochrome c oxidase activity but unchanged superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci. Res.* 45: 276-281.
- Fukuto J.M., Wallace G.C., Hszieh R., & Chaudhuri G. (1992). Chemical oxidation of N-hydroxyguanidine compounds. Release of nitric oxide, nitroxyl and possible relationship to the mechanism of biological nitric oxide generation. *Biochem. Pharmacol.* 43: 607-613.
- Fukuto J.M. & Ignarro L.J. (1997). In vivo aspects of nitric oxide chemistry: Does peroxynitrite (ONOO⁻) play a major role in cytotoxicity? *Accounts Chem. Res.* 30: 149-151.
- Fukuyama N., Takebayashi Y., Hida M., Ishida H., Ichimori K., & Nakazawa H. (1997). Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 771-774.
- Fukuyama N., Takizawa S., Ishida H., Hoshiai K., Shinohara Y., & Nakazawa H. (1998). Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 123-129.
- Furchgott R.F. & Zawadzki J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- Gackowski D., Kruszewski M., Bartłomiejczyk T., Jawien A., Ciecierski M., & Olinski R. (2002). The level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine is positively correlated with the size of the labile iron pool in human lymphocytes. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7: 548-550.

- Gage J.E., Hess O.M., Murakami T., Ritter M., Grimm J., & Krayenbuehl H.P. (1986). Vasoconstriction of stenotic coronary arteries during dynamic exercise in patients with classic angina pectoris: reversibility by nitroglycerin. *Circulation* 73: 865-876.
- Gal A., Tamir S., Kennedy L.J., Tannenbaum S.R., & Wogan G.N. (1997). Nitrotyrosine formation, apoptosis, and oxidative damage: relationships to nitric oxide production in SJL mice bearing the RcsX tumor. *Cancer Res.* 57: 1823-1828.
- Gaston B. (1999). Nitric oxide and thiol groups. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 323-333.
- Gbadegesin M., Vicini S., Hewett S.J., Wink D.A., Espey M., Pluta R.M., & Colton C.A. (1999). Hypoxia modulates nitric oxide-induced regulation of NMDA receptor currents and neuronal cell death. *Am. J. Physiol.* 277: C673-C683.
- Geller B.L. & Winge D.R. (1983). A method for distinguishing Cu,Zn- and Mn-containing superoxide dismutases. *Anal. Biochem.* 128: 86-92.
- Geng Y.J., Petersson A.S., Wennmalm A., & Hansson G.K. (1994). Cytokine-induced expression of nitric oxide synthase results in nitrosylation of heme and nonheme iron proteins in vascular smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* 214: 418-428.
- Ghafourifar P., Schenk U., Klein S.D., & Richter C. (1999). Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J. Biol. Chem.* 274: 31185-31188.
- Goldstein S. & Czapski G. (1995). Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution in absence and presence of various reductants. The nature of the oxidizing intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 12078-12088.
- Goldstein S.R., Yang G.Y., Chen X., Curtis S.K., & Yang C.S. (1998). Studies of iron deposits, inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in a rat model for esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 19: 1445-1449.
- Goldstein S., Czapski G., Lind J., & Merenyi G. (2000). Tyrosine nitration by simultaneous generation of $\cdot\text{NO}$ and O_2^- under physiological conditions. How the radicals do the job. *J. Biol. Chem.* 275: 3031-3036.
- Good P.F., Werner P., Hsu A., Olanow C.W., & Perl D.P. (1996). Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 149: 21-28.
- Gopalakrishna R., Chen Z.H., & Gundimeda U. (1993). Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J. Biol. Chem.* 268: 27180-27185.
- Gorbunov N.V., Yalowich J.C., Gaddam A., Thampatty P., Ritov V.B., Kisin E.R., Elsayed N.M., & Kagan V.E. (1997). Nitric oxide prevents oxidative damage produced by tert-butyl hydroperoxide in erythroleukemia cells via nitrosylation of heme and non-heme iron. Electron paramagnetic resonance evidence. *J. Biol. Chem.* 272: 12328-12341.
- Goto T., Haruma K., Kitadai Y., Ito M., Yoshihara M., Sumii K., Hayakawa N., & Kajiyama G. (1999). Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 5: 1411-1415.

- Gow A., Duran D., Thom S.R., & Ischiropoulos H. (1996). Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* 333: 42-48.
- Gow A.J., Chen Q., Gole M., Themistocleous M., Lee V.M., & Ischiropoulos H. (2000). Two distinct mechanisms of nitric oxide-mediated neuronal cell death show thiol dependency. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278: C1099-C1107.
- Granger D.N. & Kubes P. (1996). Nitric oxide as antiinflammatory agent. *Methods Enzymol.* 269: 434-442.
- Green R., Charlton R., Seftel H., Bothwell T., Mayet F., Adams B., Finch C., & Layrisse M. (1968). Body iron excretion in man: a collaborative study. *Am. J. Med.* 45: 336-353.
- Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., & Tannenbaum S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.
- Greenacre S.A. & Ischiropoulos H. (2001). Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Rad. Res.* 34: 541-581.
- Grisham M.B., Granger D.N., & Lefer D.J. (1998). Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Rad. Biol. Med.* 25: 404-433.
- Gross S.S. & Wolin M.S. (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 737-769.
- Groves J.T. (1999). Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 226-235.
- Grune T., Blasig I.E., Sitte N., Roloff B., Haseloff R., & Davies K.J. (1998). Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* 273: 10857-10862.
- Gutteridge J.M., Rowley D.A., Halliwell B., Cooper D.F., & Heeley D.M. (1985). Copper and iron complexes catalytic for oxygen radical reactions in sweat from human athletes. *Clin. Chim. Acta* 145: 267-273.
- Habeeb A. (1972) Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. In *Methods in Enzymology* (ed. Hirs C.H.W. and Timasheff S.N.), Vol.25, pp. 457-464. Academic Press, New York.
- Haddad I.Y., Pataki G., Hu P., Galliani C., Beckman J.S., & Matalon S. (1994). Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J. Clin. Invest.* 94: 2407-2413.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
- Halliwell B. (1996). Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Rad. Res.* 25: 439-454.
- Halliwell B. (1997). What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett.* 411: 157-160.

Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, University Press, Oxford.

Harrison J.E. & Schultz J. (1976). Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 251: 1371-1374.

Hausladen A., Privalle C.T., Keng T., DeAngelo J., & Stamler J.S. (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell.* 86: 719-729.

Hausladen A. & Stamler J.S. (1998). Nitric oxide in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10345-10347.

Hazel J.R. & Williams E.E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29: 167-227.

Hazen S.L. & Heinecke J.W. (1997). 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest.* 99: 2075-2081.

Hecht S.S., Carmella S.G., Foiles P.G., & Murphy S.E. (1994). Biomarkers for human uptake and metabolic activation of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Res.* 54: 1912s-1917s.

Hegardt P., Widegren B., & Sjogren H.O. (2000). Nitric-oxide-dependent systemic immunosuppression in animals with progressively growing malignant gliomas. *Cell Immunol.* 200: 116-127.

Henle E.S., Luo Y., Gassmann W., & Linn S. (1996). Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. *J. Biol. Chem.* 271: 21177-21186.

Henry Y. & Banerjee R. (1973). Electron paramagnetic studies of nitric oxide haemoglobin derivatives: isolated subunits and nitric oxide hybrids. *J. Mol. Biol.* 73: 469-482.

Henry Y., Ducrocq C., Drapier J.C., Servent D., Pellat C., & Guissani A. (1991). Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur. Biophys. J.* 20: 1-15.

Henry Y.A. & Singel D.J. (1996) Metal-nitrosyl interactions in nitric oxide biology probed by electron paramagnetic resonance spectroscopy. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 357-372. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.

Henry Y., Guissani A., & Ducastel B. (1997) *Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology: EPR Spectroscopy of Nitrosylated Compounds*. Springer-Verlag, Berlin.

Herold S. (2004). Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite. *Free Rad. Biol. Med.* 36: 565-579.

Heukeshoven J. & Dernick R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6: 103-112.

- Hibbs J.B., Jr., Taintor R.R., Vavrin Z., & Rachlin E.M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 87-94.
- Hierholzer C., Harbrecht B., Menezes J.M., Kane J., MacMicking J., Nathan C.F., Peitzman A.B., Billiar T.R., & Tweardy D.J. (1998). Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J. Exp. Med.* 187: 917-928.
- Hingorani A.D. (2001). Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis* 154: 521-527.
- Hinson J.A., Pike S.L., Pumford N.R., & Mayeux P.R. (1998). Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 604-607.
- Hirsch E.C. & Faucheux B.A. (1998). Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov Disord.* 13 Suppl 1: 39-45.
- Hodges G.R., Marwaha J., Paul T., & Ingold K.U. (2000). A novel procedure for generating both nitric oxide and superoxide in situ from chemical sources at any chosen mole ratio. First application: tyrosine oxidation and a comparison with preformed peroxyxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 1287-1293.
- Hogg N., Darley-Usmar V.M., Wilson M.T., & Moncada S. (1993). The oxidation of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *FEBS Lett.* 326: 199-203.
- Hogg N. (2002). The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 585-600.
- Holscher C., McGlinchey L., Anwyl R., & Rowan M.J. (1996). 7-Nitroindazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. *Learn. Mem.* 2: 267-278.
- Holthusen H. & Ding Z. (1997). Nitric oxide is not involved in vascular nociception of noxious physical stimuli in humans. *Neurosci. Lett.* 227: 111-114.
- Hopkin K.A., Papazian M.A., & Steinman H.M. (1992). Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 267: 24253-24258.
- Hoshino M., Ozawa K., Seki H., & Ford P.C. (1993). Photochemistry of nitric oxide adducts of water-soluble iron(III)porphyrin and ferrihemoproteins studied by nanosecond laser photolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 9568-9575.
- Hu H., Chiamvimonvat N., Yamagishi T., & Marban E. (1997). Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ. Res.* 81: 742-752.
- Huang Z., Huang P.L., Ma J., Meng W., Ayata C., Fishman M.C., & Moskowitz M.A. (1996). Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 981-987.
- Huang A., Vita J.A., Venema R.C., & Keaney J.F., Jr. (2000). Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* 275: 17399-17406.

- Hughes M.N. & Nicklin H.G. (1971). The autoxidation of hydroxylamine in alkaline solution. *J. Chem. Soc. A* 164-171.
- Hughes M.N. (1999). Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxyxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 263-272.
- Hugon J., Hugon F., Esclaire F., Lesort M., & Diop A.G. (1996). The presence of calbindin in rat cortical neurons protects in vitro from oxydative stress. *Brain Res.* 707: 288-292.
- Huie R.E. & Padmaja S. (1993). The reaction of no with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18: 195-199.
- Hurst J.K. (2002) Whence nitrotyrosine? *J. Clin. Invest.* 109: 1287-1289.
- Ignarro L.J., Lipperton H., Edwards J.C., Baricos W.H., Hyman A.L., Kadowitz P.J., & Gruetter C.A. (1981). Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218: 739-749.
- Ignarro L.J. (1989a). Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.* 65: 1-21.
- Ignarro L.J. (1989b). Endothelium-derived nitric oxide: pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters. *Pharm. Res.* 6: 651-659.
- Ignarro L.J. (1990). Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 535-560.
- Ignarro L.J., Fukuto J.M., Griscavage J.M., Rogers N.E., & Byrns R.E. (1993). Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8103-8107.
- Ioannidis I., Hellinger A., Dehmlow C., Rauen U., Erhard J., Eigler F.W., & De Groot H. (1995). Evidence for increased nitric oxide production after liver transplantation in humans. *Transplantation* 59: 1293-1297.
- Ischiropoulos H., Zhu L., Chen J., Tsai M., Martin J.C., Smith C.D., & Beckman J.S. (1992). Peroxyxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 431-437.
- Ischiropoulos H., al Mehdi A.B., & Fisher A.B. (1995). Reactive species in ischemic rat lung injury: contribution of peroxyxynitrite. *Am. J. Physiol.* 269: L158-L164.
- Ischiropoulos H., Beers M.F., Ohnishi S.T., Fisher D., Garner S.E., & Thom S.R. (1996). Nitric oxide production and perivascular nitration in brain after carbon monoxide poisoning in the rat. *J. Clin. Invest.* 97: 2260-2267.
- Ischiropoulos H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 356: 1-11.
- Ischiropoulos H. (2003). Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 776-783.

- Ishiyama S., Hiroe M., Nishikawa T., Abe S., Shimojo T., Ito H., Ozasa S., Yamakawa K., Matsuzaki M., Mohammed M.U., Nakazawa H., Kasajima T., & Marumo F. (1997). Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation* 95: 489-496.
- Iwanaga T., Yamazaki T., & Kominami S. (1999). Kinetic studies on the successive reaction of neuronal nitric oxide synthase from L-arginine to nitric oxide and L-citrulline. *Biochemistry* 38: 16629-16635.
- Jellinger K.A. (1999). The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* 14: 115-140.
- Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., & Stamler J.S. (1996). S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380: 221-226.
- Joannides R., Haefeli W.E., Linder L., Richard V., Bakkali E.H., Thuillez C., & Luscher T.F. (1995). Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91: 1314-1319.
- Jones C.T., Swingler R.J., & Brock D.J. (1994). Identification of a novel SOD1 mutation in an apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient and the detection of Ile113Thr in three others. *Hum. Mol. Genet.* 3: 649-650.
- Jourd'heuil D., Mills L., Miles A.M., & Grisham M.B. (1998). Effect of nitric oxide on hemoprotein-catalyzed oxidative reactions. *Nitric Oxide* 2: 37-44.
- Kagan V.E., Kozlov A.V., Tyurina Y.Y., Shvedova A.A., & Yalowich J.C. (2001). Antioxidant mechanisms of nitric oxide against iron-catalyzed oxidative stress in cells. *Antioxid. Redox. Signal.* 3: 189-202.
- Kakhlon O. & Cabantchik Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Rad. Biol. Med.* 33: 1037-1046.
- Kamisaki Y., Wada K., Ataka M., Yamada Y., Nakamoto K., Ashida K., & Kishimoto Y. (1997). Lipopolysaccharide-induced increase in plasma nitrotyrosine concentrations in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1362: 24-28.
- Kamisaki Y., Wada K., Bian K., Balabanli B., Davis K., Martin E., Behbod F., Lee Y.C., & Murad F. (1998). An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11584-11589.
- Kanner J., Harel S., & Granit R. (1991). Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* 289: 130-136.
- Kanner J. (1996). Nitric oxide and metal-catalyzed reactions. *Methods Enzymol.* 269: 218-229.
- Katusic Z.S. (2001). Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281: H981-H986.
- Kaur H. & Halliwell B. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* 350: 9-12.

- Keefer L.K. & Williams D.L.H. (1996) Detection of nitric oxide via its derived nitrosation products. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 509-519. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Keele B.B., Jr., McCord J.M., & Fridovich I. (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem.* 245: 6176-6181.
- Kelm M. and Yoshida K. (1996) Metabolic fate of nitric oxide and related N-oxides. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 47-58. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Khan S., Kayahara M., Joashi U., Mazarakis N.D., Sarraf C., Edwards A.D., Hughes M.N., & Mehmet H. (1997). Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation. *J. Cell Sci.* 110: 2315-2322.
- Kim Y.M., Talanian R.V., & Billiar T.R. (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272: 31138-31148.
- Kim S.O., Orii Y., Lloyd D., Hughes M.N., & Poole R.K. (1999). Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett.* 445: 389-394.
- Kim Y.M., Chung H.T., Simmons R.L., & Billiar T.R. (2000). Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* 275: 10954-10961.
- Kim S.O., Merchant K., Nudelman R., Beyer W.F., Jr., Keng T., DeAngelo J., Hausladen A., & Stamler J.S. (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* 109: 383-396.
- King P.A., Anderson V.E., Edwards J.O., Gustafson G., Plumb R.C., & Suggs J.W. (1992). A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solutions: reaction with proteins and nucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 5430-5432.
- King P.A., Jamison E., Strahs D., Anderson V.E., & Brenowitz M. (1993). 'Footprinting' proteins on DNA with peroxonitrous acid. *Nucleic Acids Res.* 21: 2473-2478.
- Kjellin K.G. (1967). The CSF iron in patients with neurological diseases. *Acta Neurol. Scand.* 43: 299-313.
- Klatt P., Pfeiffer S., List B.M., Lehner D., Glatter O., Bachinger H.P., Werner E.R., Schmidt K., & Mayer B. (1996). Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* 271: 7336-7342.
- Klebl B.M., Ayoub A.T., & Pette D. (1998). Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett.* 422: 381-384.
- Kleschyov A.L., Muller B., Keravis T., Stoeckel M.E., & Stoclet J.C. (2000). Adventitia-derived nitric oxide in rat aortas exposed to endotoxin:

cell origin and functional consequences. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 : H2743-H2751.

Knowles M.E., McWeeny D.J., Couchman L., & Thorogood M. (1974). Interaction of nitrite with proteins at gastric pH. *Nature* 247: 288-289.

Kong S.K., Yim M.B., Stadtman E.R., & Chock P.B. (1996). Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3377-3382.

Kono Y. (1995). The production of nitrating species by the reaction between nitrite and hypochlorous acid. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36: 275-283.

Kooy N.W., Lewis S.J., Royall J.A., Ye Y.Z., Kelly D.R., & Beckman J.S. (1997). Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit. Care Med.* 25: 812-819.

Koppenol W.H. (1987). Thermodynamics of reactions involving oxyradicals and hydrogen peroxide. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 18: 3-11.

Koppenol W.H., Moreno J.J., Pryor W.A., Ischiropoulos H., & Beckman J.S. (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 834-842.

Koppenol W.H. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.* 25: 385-391.

Koshland D.E., Jr. (1992). The molecule of the year. *Science* 258: 1861.

Kruszewski M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.* 531: 81-92.

Kubes P., Suzuki M., & Granger D.N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4651-4655.

Kuhlencordt P.J., Chen J., Han F., Astern J., & Huang P.L. (2001). Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 103: 3099-3104.

Kun J.F., Mordmuller B., Perkins D.J., May J., Mercereau-Puijalon O., Alpers M., Weinberg J.B., & Kremsner P.G. (2001). Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J. Infect. Dis.* 184: 330-336.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lafon-Cazal M., Pietri S., Culcasi M., & Bockaert J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-537.

Lah M.S., Dixon M.M., Pattridge K.A., Stallings W.C., Fee J.A., & Ludwig M.L. (1995). Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* 34: 1646-1660.

Lai C.C., Huang W.H., Klevay L.M., Gunning W.T., III, & Chiu T.H. (1996). Antioxidant enzyme gene transcription in copper-deficient rat liver. *Free Rad. Biol. Med.* 21: 233-240.

- Lancaster J.R., Jr. & Hibbs J.B., Jr. (1990). EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1223-1227.
- Lancaster J.R., Jr. (1994). Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 91: 8137-8141.
- Lander H.M., Ogiste J.S., Teng K.K., & Novogrodsky A. (1995). p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol. Chem.* 270: 21195-21198.
- Lander H.M., Jacovina A.T., Davis R.J., & Tauras J.M. (1996). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J. Biol. Chem.* 271: 19705-19709.
- Lander H.M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11: 118-124.
- Langrehr J.M., White D.A., Hoffman R.A., & Simmons R.L. (1993). Macrophages produce nitric oxide at allograft sites. *Ann. Surg.* 218: 159-166.
- Lavelle F., McAdam M.E., Fielden E.M., & Roberts P.B. (1977). A pulse-radiolysis study of the catalytic mechanism of the iron-containing superoxide dismutase from *Photobacterium leiognathi*. *Biochem. J.* 161: 3-11.
- Lee J., Chen L., West A.H., & Richter-Addo G.B. (2002). Interactions of organic nitroso compounds with metals. *Chemical Reviews* 102: 1019-1065.
- Lee M., Arosio P., Cozzi A., & Chasteen N.D. (1994). Identification of the EPR-active iron-nitrosyl complexes in mammalian ferritins. *Biochemistry* 33: 3679-3687.
- Leeuwenburgh C., Hardy M.M., Hazen S.L., Wagner P., Oh-ishi S., Steinbrecher U.P., & Heinecke J.W. (1997). Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem.* 272: 1433-1436.
- Lehrer S.S. & Fasman G.D. (1967). Ultraviolet irradiation effects in poly-L-tyrosine and model compounds. Identification of bityrosine as a photoproduct. *Biochemistry* 6: 757-767.
- Lejeune P., Lagadec P., Onier N., Pinard D., Ohshima H., & Jeannin J.F. (1994). Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J. Immunol.* 152: 5077-5083.
- Lentner C. (1981) Geigy Scientific Tables. CIBA-GEIGY, Basle, Switzerland.
- Leonardi A., Abbruzzese G., Arata L., Cocito L., & Vische M. (1984). Cerebrospinal fluid (CSF) findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 231: 75-78.
- Leong S.K., Ruan R.S., & Zhang Z. (2002). A critical assessment of the neurodestructive and neuroprotective effects of nitric oxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962: 161-181.
- Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., & Chan P.H. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 11: 376-381.

- Liddle L., Seegmiller J.E., & Laster L. (1959). The enzymatic spectrophotometric method for determination of uric acid. *J. Lab. Clin. Med.* 54: 903-913.
- Lieu P.T., Heiskala M., Peterson P.A., & Yang Y. (2001). The roles of iron in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 22: 1-87.
- Lijinsky W. (1992) Chemistry and biology of N-nitroso compounds. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lincoln J., Hoyle C.H., & Burnstock G. (1997) Nitric oxide in health and disease. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne.
- Liochev S.I. & Fridovich I. (2002). Nitroxyl (NO⁻): a substrate for superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 402: 166-171.
- Lipinski P., Drapier J.C., Oliveira L., Retmanska H., Sochanowicz B., & Kruszewski M. (2000). Intracellular iron status as a hallmark of mammalian cell susceptibility to oxidative stress: a study of L5178Y mouse lymphoma cell lines differentially sensitive to H₂O₂. *Blood* 95: 2960-2966.
- Lipton S.A., Choi Y.B., Pan Z.H., Lei S.Z., Chen H.S., Sucher N.J., Loscalzo J., Singel D.J., & Stamler J.S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso- compounds. *Nature* 364: 626-632.
- Lipton S.A., Choi Y.B., Sucher N.J., & Chen H.S. (1998). Neuroprotective versus neurodestructive effects of NO-related species. *Biofactors* 8: 33-40.
- Lipton S.A. (1999). Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death. Differ.* 6: 943-951.
- Lipton A.J., Johnson M.A., Macdonald T., Lieberman M.W., Gozal D., & Gaston B. (2001). S-nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature* 413: 171-174.
- Liu P., Hock C.E., Nagele R., & Wong P.Y. (1997). Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am. J. Physiol.* 272: H2327-H2336.
- Liu X., Miller M.J., Joshi M.S., Thomas D.D., & Lancaster J.R., Jr. (1998). Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2175-2179.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., & Darnell J. (1999) Molecular Biology of the Cell, pp. 1084. W.H. Freeman and Company, New York.
- Loscalzo J. & Welch G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 38: 87-104.
- Luo Z.D. & Cizkova D. (2000). The role of nitric oxide in nociception. *Curr. Rev. Pain* 4: 459-466.
- Lyman S.V. & Hurst J.K. (1995). Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 8867-8868.
- Ma X.L., Gao F., Liu G.L., Lopez B.L., Christopher T.A., Fukuto J.M., Wink D.A., & Feelisch M. (1999). Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl

on postischemic myocardial injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14617-14622.

MacMicking J.D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D.S., Trumbauer M., Stevens K., Xie Q.W., Sokol K., & Hutchinson N. (1995). Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81: 641-650.

MacMillan-Crow L.A., Crow J.P., Kerby J.D., Beckman J.S., & Thompson J.A. (1996). Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11853-11858.

MacMillan-Crow L.A., Crow J.P., & Thompson J.A. (1998). Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37: 1613-1622.

MacMillan-Crow L.A. & Thompson J.A. (1999). Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 366: 82-88.

Macmillan-Crow L.A. & Cruthirds D.L. (2001). Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.* 34: 325-336.

Mallozzi C., Di Stasi A.M., & Minetti M. (1997). Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3. *FASEB J.* 11: 1281-1290.

Mannick E.E., Bravo L.E., Zarama G., Realpe J.L., Zhang X.J., Ruiz B., Fontham E.T., Mera R., Miller M.J., & Correa P. (1996). Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res.* 56: 3238-3243.

Mannick J.B., Miao X.Q., & Stamler J.S. (1997). Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 24125-24128.

Mannick J.B., Hausladen A., Liu L., Hess D.T., Zeng M., Miao Q.X., Kane L.S., Gow A.J., & Stamler J.S. (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284: 651-654.

Martin B.L., Wu D., Jakes S., & Graves D.J. (1990). Chemical influences on the specificity of tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265: 7108-7111.

Martin L.J., Kaiser A., & Price A.C. (1999). Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J. Neurobiol.* 40: 185-201.

Mason R.B., Pluta R.M., Walbridge S., Wink D.A., Oldfield E.H., & Boock R.J. (2000). Production of reactive oxygen species after reperfusion in vitro and in vivo: protective effect of nitric oxide. *J. Neurosurg.* 93: 99-107.

Matsunaga T., Okumura K., Tsunoda R., Tayama S., Tabuchi T., & Yasue H. (1996). Role of adenosine in regulation of coronary flow in dogs with inhibited synthesis of endothelium-derived nitric oxide. *Am. J. Physiol* 270: H427-H434.

Matthews R.T. & Beal M.F. (1996). Increased 3-nitrotyrosine in brains of Apo E-deficient mice. *Brain Res.* 718: 181-184.

Matthews R.T., Beal M.F., Fallon J., Fedorchak K., Huang P.L., Fishman M.C., & Hyman B.T. (1997). MPP+ induced substantia nigra degeneration is attenuated in nNOS knockout mice. *Neurobiol. Dis.* 4: 114-121.

Mattson M.P., Rydel R.E., Lieberburg I., & Smith-Swintosky V.L. (1993). Altered calcium signaling and neuronal injury: stroke and Alzheimer's disease as examples. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 679: 1-21.

McAdam M.E., Feilden E.M., Lavelle F., Calabrese L., Cocco D., & Rotilio G. (1977). The involvement of the bridging imidazolate in the catalytic mechanism of action of bovine superoxide dismutase. *Biochem. J.* 167: 271-274.

McAndrew J., Patel R.P., Jo H., Cornwell T., Lincoln T., Moellering D., White C.R., Matalon S., & Darley-Usmar V. (1997). The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. *Semin. Perinatol.* 21: 351-366.

McCleverty J.A. (1979). Reactions of nitric oxide coordinated to transition metals. *Chem. Rev.* 79: 53-76.

McCord J.M. (1998). Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin. Hematol.* 35: 5-12.

McDonald C.C., Philips W.D., & Mower H.F. (1965). An electron spin resonance study of some complexes of iron, nitric oxide, and anionic ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 3319

McKnight G.M., Smith L.M., Drummond R.S., Duncan C.W., Golden M., & Benjamin N. (1997). Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut* 40: 211-214.

Medele R.J., Stummer W., Reulen H.J., & Steiger H.J. (1996). Evidence for peroxidative damage by nitric oxide in experimental chronic cerebral vasospasm. *Neurol. Res.* 18: 277-280.

Meister A. & Anderson M.E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711-760.

Melov S., Coskun P., Patel M., Tuinstra R., Cottrell B., Jun A.S., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Goodman S.I., Huang T.T., Mizioroko H., Epstein C.J., & Wallace D.C. (1999). Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 846-851.

Michalski W.P. (1996). Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 684: 59-75.

Miles A.M., Bohle D.S., Glassbrenner P.A., Hansert B., Wink D.A., & Grisham M.B. (1996). Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 271: 40-47.

Miller M.J., Thompson J.H., Zhang X.J., Sadowska-Krowicka H., Kakkis J.L., Munshi U.K., Sandoval M., Rossi J.L., Eloby-Childress S., Beckman J.S., & . (1995). Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 109: 1475-1483.

Miller M.J., Voelker C.A., Olistier S., Thompson J.H., Zhang X.J., Rivera D., Eloby-Childress S., Liu X., Clark D.A., & Pierce M.R. (1996). Fetal

growth retardation in rats may result from apoptosis: role of peroxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.* 21: 619-629.

Mills C.D. (1991). Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J. Immunol.* 146: 2719-2723.

Miranda K.M., Espey M.G., Yamada K., Krishna M., Ludwick N., Kim S., Jourdeuil D., Grisham M.B., Feelisch M., Fukuto J.M., & Wink D.A. (2001). Unique oxidative mechanisms for the reactive nitrogen oxide species, nitroxyl anion. *J. Biol. Chem.* 276: 1720-1727.

Mirvish S.S., Williamson J., Babcock D., & Chen S.C. (1993). Mutagenicity of iso-butyl nitrite vapor in the Ames test and some relevant chemical properties, including the reaction of iso-butyl nitrite with phosphate. *Environ. Mol. Mutagen.* 21: 247-252.

Misra H.P. & Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3175.

Moncada S., Palmer R.M., & Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.

Moncada S. & Higgs E.A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329: 2002-2012.

Monteiro H.P. (2002). Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? *Free Rad. Biol. Med.* 33: 765-773.

Moriel P. & Abdalla D.S. (1997). Nitrotyrosine bound to beta-VLDL-apoproteins: a biomarker of peroxynitrite formation in experimental atherosclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232: 332-335.

Muller B., Kleschyov A.L., & Stoclet J.C. (1996). Evidence for N-acetylcysteine-sensitive nitric oxide storage as dinitrosyl-iron complexes in lipopolysaccharide-treated rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 119: 1281-1285.

Muller B., Kleschyov A.L., Alencar J.L., Vanin A., & Stoclet J.C. (2002). Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962: 131-139.

Mulligan M., Althaus B., & Linder M.C. (1986). Non-ferritin, non-heme iron pools in rat tissues. *Int. J. Biochem.* 18: 791-798.

Mulligan M. & Linder M. (1982) The size of small molecular weight iron pools in rat tissues. In *The biochemistry and physiology of iron* (ed. Saltman P. and Hagenau J.), pp. 313-314. Elsevier, New York.

Mulsch A., Mordvintcev P., Vanin A.F., & Busse R. (1991). The potent vasodilating and guanylyl cyclase activating dinitrosyl-iron(II) complex is stored in a protein-bound form in vascular tissue and is released by thiols. *FEBS Lett.* 294: 252-256.

Mulsch A. (1994). Nitrogen monoxide transport mechanisms. *Arzneimittelforschung.* 44: 408-411.

Murphy M.E. & Sies H. (1991). Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10860-10864.

- Naruse K., Shimizu K., & Muramatsu M. (1994). Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arterioscler. Thromb.* 14: 653-655.
- Nathan C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
- Nathan C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* 100: 2417-2423.
- Nathan C. & Shiloh M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8841-8848.
- Nelli S., Hillen M., Buyukafsar K., & Martin W. (2000). Oxidation of nitroxyl anion to nitric oxide by copper ions. *Br. J. Pharmacol.* 131: 356-362.
- Nelson E.J., Connolly J., & McArthur P. (2003). Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol. Cell* 95: 3-8.
- Neta P., Huie R.E., & Ross A.B. (1988). Rate constants for reactions of inorganic radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17: 1112-1115.
- Niedermeier W. & Griggs J.H. (1971). Trace metal composition of synovial fluid and blood serum of patients with rheumatoid arthritis. *J. Chronic. Dis.* 23: 527-536.
- Nikano M., Kimura H., Hara M., Kuroiwa M., Kato M., Totsune K., & Yoshikawa T.A. (1990). A highly sensitive method for determining for Mn- and Cu-Zn superoxide dismutase activities in tissue and blood cells. *Anal. Biochem.* 187: 277-280.
- Niketić V., Stojanović S. & Spasić M. (1998). Regulation of cell processes by reactive oxygen and nitric oxide species - mechanisms of reactions. *Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* 34: 463-477.
- Niketić V., Stojanović S., Nikolić A., Spasić M., & Michelson A.M. (1999). Exposure of Mn and FeSODs, but not Cu/ZnSOD, to NO leads to nitrosonium and nitroxyl ions generation which cause enzyme modification and inactivation: an in vitro study. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 992-996.
- Nottingham W.C. & Sutter J.R. (1989). Kinetics of the oxidation of nitric oxide by chlorine and oxygen in non aqueous media. *Int. J. Chem. Kinet.* 25: 375-381.
- Numata M., Suzuki S., Miyazawa N., Miyashita A., Nagashima Y., Inoue S., Kaneko T., & Okubo T. (1998). Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J. Immunol.* 160: 3031-3037.
- Ohno M., Yamamoto T., & Watanabe S. (1993). Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. *Brain Res.* 632: 36-40.
- Ohshima H., Friesen M., Brouet I., & Bartsch H. (1990). Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem. Toxicol.* 28: 647-652.

- Ohshima H., Celan I., Chazotte L., Pignatelli B., & Mower H.F. (1999a). Analysis of 3-nitrotyrosine in biological fluids and protein hydrolyzates by high-performance liquid chromatography using a postseparation, on-line reduction column and electrochemical detection: results with various nitrating agents. *Nitric Oxide* 3: 132-141.
- Ohshima H., Gilibert I., & Bianchini F. (1999b). Induction of DNA strand breakage and base oxidation by nitroxyl anion through hydroxyl radical production. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1305-1313.
- Okamura M. (1980). An improved method for determination of L-ascorbic acid and L- dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clin. Chim. Acta* 103: 259-268.
- Oury T.D., Day B.J., & Crapo J.D. (1996). Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.* 75: 617-636.
- Oyama J., Shimokawa H., Momii H., Cheng X., Fukuyama N., Arai Y., Egashira K., Nakazawa H., & Takeshita A. (1998). Role of nitric oxide and peroxynitrite in the cytokine-induced sustained myocardial dysfunction in dogs in vivo. *J. Clin. Invest.* 101: 2207-2214.
- Padmaja S. & Huie R.E. (1993). The reaction of nitric oxide with organic peroxyradicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 539-544.
- Padmaja S., Ramezani M.S., Bounds P.L., & Koppenol W.H. (1996). Reaction of peroxynitrite with L-tryptophan. *Redox. Rep.* 2: 173-177.
- Padmaja S., Squadrito G.L., & Pryor W.A. (1998). Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 349: 1-6.
- Pagliaro P., Mancardi D., Rastaldo R., Penna C., Gattullo D., Miranda K.M., Feelisch M., Wink D.A., Kass D.A., & Paolocci N. (2003). Nitroxyl affords thiol-sensitive myocardial protective effects akin to early preconditioning. *Free Rad. Biol. Med.* 34: 33-43.
- Palombella V.J., Conner E.M., Fuseler J.W., Destree A., Davis J.M., Laroux F.S., Wolf R.E., Huang J., Brand S., Elliott P.J., Lazarus D., McCormack T., Parent L., Stein R., Adams J., & Grisham M.B. (1998). Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthrititis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15671-15676.
- Paolocci N., Saavedra W.F., Miranda K.M., Martignani C., Isoda T., Hare J.M., Espey M.G., Fukuto J.M., Feelisch M., Wink D.A., & Kass D.A. (2001). Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10463-10468.
- Paraskevas G.P., Kapaki E., Libitaki G., Zournas C., Segditsa I., & Papageorgiou C. (1997). Ascorbate in healthy subjects, amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 96: 88-90.
- Parker M.W. & Blake C.C. (1988). Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS Lett.* 229: 377-382.
- Patel R.P., McAndrew J., Sellak H., White C.R., Jo H., Freeman B.A., & Darley-Usmar V.M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 385-400.

Pearsall K.A. & Bonner F.T. (1982). Aqueous Nitrosyliron(II) Chemistry. 2. Kinetics and Mechanism of Nitric Oxide reduction. The Nitrosyl Complex. *Inorg. Chem.* 21: 1978-1985.

Pellat C., Henry Y., & Drapier J.C. (1990). IFN-gamma-activated macrophages: detection by electron paramagnetic resonance of complexes between L-arginine-derived nitric oxide and non-heme iron proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 119-125.

Perry T.L., Krieger C., Hansen S., & Eisen A. (1990). Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann. Neurol.* 28: 12-17.

Petrat F., de Groot H., & Rauen U. (2001). Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.* 356: 61-69.

Petrat F., de Groot H., Sustmann R., & Rauen U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol. Chem.* 383: 489-502.

Petruzzelli S., Puntoni R., Mimotti P., Pulera N., Baliva F., Fornai E., & Giuntini C. (1997). Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 1902-1907.

Pfeiffer S. & Mayer B. (1998). Lack of tyrosine nitration by peroxynitrite generated at physiological pH. *J. Biol. Chem.* 273: 27280-27285.

Pfeiffer S., Schmidt K., & Mayer B. (2000). Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide in vivo. *J. Biol. Chem.* 275: 6346-6352.

Pfeiffer S., Lass A., Schmidt K., & Mayer B. (2001). Protein tyrosine nitration in cytokine-activated murine macrophages. Involvement of a peroxidase/nitrite pathway rather than peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 276: 34051-34058.

Pino R.Z. & Feelisch M. (1994). Bioassay discrimination between nitric oxide (NO) and nitroxyl (NO⁻) using L-cysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 54-62.

Pomposiello P.J. & Demple B. (2001). Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* 19: 109-114.

Poskrebyshev G.A., Shafirovich V., & Lyman S.V. (2004). Hyponitrite radical, a stable adduct of nitric oxide and nitroxyl. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 891-899.

Prütz W.A., Monig H., Butler J., & Land E.J. (1985). Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 125-134.

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

Pryor W.A., Jin X., & Squadrito G.L. (1994). One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11173-11177.

- Pryor W.A. & Squadrito G.L. (1996). The chemistry of peroxynitrite and peroxynitrous acid: Products from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Phys.* 268: L699-L721.
- Puget K. & Michelson A.M. (1974). Iron containing superoxide dismutases from luminous bacteria. *Biochimie* 56: 1255-1267.
- Quijano C., Hernandez-Saavedra D., Castro L., McCord J.M., Freeman B.A., & Radi R. (2001). Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *J. Biol. Chem.* 276: 11631-11638.
- Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., & Freeman B.A. (1991a). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 481-487.
- Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., & Freeman B.A. (1991b). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266: 4244-4250.
- Radi R., Rodriguez M., Castro L., & Telleri R. (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 89-95.
- Radi R. (1996). Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 828-835.
- Radomski M.W., Zakar T., & Salas E. (1996). Nitric oxide in platelets. *Methods Enzymol.* 269: 88-107.
- Reaume A.G., Elliott J.L., Hoffman E.K., Kowall N.W., Ferrante R.J., Siwek D.F., Wilcox H.M., Flood D.G., Beal M.F., Brown R.H., Jr., Scott R.W., & Snider W.D. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13: 43-47.
- Rees D.D. (1995). Role of nitric oxide in the vascular dysfunction of septic shock. *Biochem Soc Trans* 23: 1025-1029.
- Reiber H., Ruff M., & Uhr M. (1993). Ascorbate concentration in human cerebrospinal fluid (CSF) and serum. Intrathecal accumulation and CSF flow rate. *Clin. Chim. Acta* 217: 163-173.
- Reyes-Harde M., Potter B.V., Galione A., & Stanton P.K. (1999). Induction of hippocampal LTD requires nitric-oxide-stimulated PKG activity and Ca²⁺ release from cyclic ADP-ribose-sensitive stores. *J. Neurophysiol.* 82: 1569-1576.
- Richter-Addo G.B. & Legzdins P. (1992) Metal Nitrosyls. Oxford University Press, Oxford.
- Ridd J.H. (1961). Nitrosation, diazotisation, and deamination. *Q. Rev.* 15: 418-441.
- Ridd J.H. (1979). Diffusion control and preassociation in nitrosation, nitration, and halogenation. *Adv. Phys. Org. Chem.* 16: 1-33.
- Riordan J.F., Sokolovsky M., & Vallee B.L. (1967). Environmentally sensitive tyrosyl residues. Nitration with tetranitromethane. *Biochemistry* 6: 358-361.

- Riordan J.F. & Vallee B.L. (1972a) Reactions with N-ethylmaleimide and p-mercuribenzoate. In *Methods in Enzymology* (ed. Hirs C.H.W. and Timasheff S.N.), Vol.25, pp. 449-456. Academic Press, New York.
- Riordan J.F. & Vallee B.L. (1972b) Nitration with tetranitromethane. In *Methods in Enzymology* (ed. Hirs C.H.W. and Timasheff S.N.), Vol.25, pp. 515-521. Academic Press, New York.
- Rosen G.M. & Freeman B.A. (1984). Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7269-7273.
- Rowland L.P. & Shneider N.A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 344: 1688-1700.
- Roza A.M., Cooper M., Pieper G., Hilton G., Dembny K., Lai C.S., Lindholm P., Komorowski R., Felix C., Johnson C., & Adams M. (2000). NOX 100, a nitric oxide scavenger, enhances cardiac allograft survival and promotes long-term graft acceptance. *Transplantation* 69: 227-231.
- Rubani G.M., Romero J.C., & Vanhoutte P.M. (1986). Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 250: H1145-H1149.
- Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M., & 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.
- Rusche K.M., Spiering M.M., & Marletta M.A. (1998). Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry* 37: 15503-15512.
- Sagami I., Sato Y., Noguchi T., Miyajima M., Rozhkova E., Daff S., & Shimizu T. (2002). Electron transfer in nitric-oxide synthase. *Coord. Chem. Rev.* 226: 179-186.
- Saleh D., Barnes P.J., & Giaid A. (1997). Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155: 1763-1769.
- Saleh D., Ernst P., Lim S., Barnes P.J., & Giaid A. (1998). Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J.* 12: 929-937.
- Salerno J.C. & Ohnishi T. (1976). Tetranuclear and binuclear iron-sulfur clusters in succinate dehydrogenase: a method of iron quantitation by formation of paramagnetic complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73: 833-840.
- Salvemini D., Wang Z.Q., Bourdon D.M., Stern M.K., Currie M.G., & Manning P.T. (1996). Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur. J. Pharmacol.* 303: 217-220.
- Sanakis Y., Goussias C., Mason R.P., & Petrouleas V. (1997). NO interacts with the tyrosine radical Y(D) of photosystem II to form an iminoxyl radical. *Biochemistry* 36: 1411-1417.
- Sattler R., Xiong Z., Lu W.Y., Hafner M., MacDonald J.F., & Tymianski M. (1999). Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284: 1845-1848.

- Sayre L.M., Perry G., & Smith M.A. (1999). Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 220-225.
- Schmidt H.H. & Walter U. (1994). NO at work. *Cell* 78: 919-925.
- Schroeder R.A. & Kuo P.C. (1995). Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Anesth. Analg.* 81: 1052-1059.
- Schulz J.B., Matthews R.T., Muqit M.M., Browne S.E., & Beal M.F. (1995a). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J. Neurochem.* 64: 936-939.
- Schulz J.B., Matthews R.T., & Beal M.F. (1995b). Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 8: 480-486.
- Schulz J.B., Huang P.L., Matthews R.T., Passov D., Fishman M.C., & Beal M.F. (1996). Striatal malonate lesions are attenuated in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *J. Neurochem.* 67: 430-433.
- Scorza G., Pietraforte D., & Minetti M. (1997). Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-albumin and S-nitroso-glutathione in human plasma. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 633-642.
- Seddon W.A., Fletcher J.W., & Sopchyshyn F.C. (1973). Pulse radiolysis of nitric oxide in aqueous solution. *Can. J. Chem.* 51: 1123-1130.
- Sergent O., Griffon B., Morel I., Chevanne M., Dubos M.P., Cillard P., & Cillard J. (1997). Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. *Hepatology* 25: 122-127.
- Sharma V.S., Traylor T.G., Gardiner R., & Mizukami H. (1987). Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin. *Biochemistry* 26: 3837-3843.
- Sharpe M.A. & Cooper C.E. (1998). Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem. J.* 332: 9-19.
- Shergill J.K., Cammack R., Cooper C.E., Cooper J.M., Mann V.M., & Schapira A.H. (1996). Detection of nitrosyl complexes in human substantia nigra, in relation to Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228: 298-305.
- Shinham O.S. (1983). Organic thionitrites and related substances. *Org. Prep. Proced. Int.* 15: 165-198.
- Siklos L., Engelhardt J., Harati Y., Smith R.G., Joo F., & Appel S.H. (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39: 203-216.
- Simon D.I., Mullins M.E., Jia L., Gaston B., Singel D.J., & Stamler J.S. (1996). Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity, and functional consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4736-4741.
- Singel D.J. & Lancaster J.R., Jr. (1996) Electron paramagnetic resonance spectroscopy and nitric oxide biology. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 341-356. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Singer I.I., Kawka D.W., Scott S., Weidner J.R., Mumford R.A., Riehl T.E., & Stenson W.F. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and

nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111: 871-885.

Skinner K.A., Crow J.P., Skinner H.B., Chandler R.T., Thompson J.A., & Parks D.A. (1997). Free and protein-associated nitrotyrosine formation following rat liver preservation and transplantation. *Arch. Biochem. Biophys.* 342: 282-288.

Skinner K.A., White C.R., Patel R., Tan S., Barnes S., Kirk M., Darley-Usmar V., & Parks D.A. (1998). Nitrosation of uric acid by peroxynitrite. Formation of a vasoactive nitric oxide donor. *J. Biol. Chem.* 273: 24491-2447.

Skurk A., Winnefeld K., Leifer M., & Fendel K. (1974). [Concentration of bivalent kations (Ca, Mg, Fe, Cu, Zn) in human saliva from the parotid (author's transl)]. *Laryngol. Rhinol. Otol. (Stuttg)* 53: 863-867.

Slykhouse T.O. & Fee J.A. (1976). Physical and chemical studies on bacterial superoxide dismutases. Purification and some anion binding properties of the iron-containing protein of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 251: 5472-5477.

Smith C.D., Carson M., van der W.M., Chen J., Ischiropoulos H., & Beckman J.S. (1992). Crystal structure of peroxynitrite-modified bovine Cu,Zn superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 299: 350-355.

Smith M.A., Richey Harris P.L., Sayre L.M., Beckman J.S., & Perry G. (1997). Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 17: 2653-2657.

Sokolovsky M., Riordan J.F., & Vallee B.L. (1966). Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *Biochemistry* 5: 3582-3589.

Spande T. F., Witkop B., Degani Y. & Patchornik A. (1970). Selective cleavage and modification of peptides and proteins. *Adv. Protein. Chem.* 24: 97-260.

Spencer K.T., Lindower P.D., Buettner G.R., & Kerber R.E. (1998). Transition metal chelators reduce directly measured myocardial free radical production during reperfusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32: 343-348.

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

Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., Mullins M.E., Jaraki O., Michel T., Singel D.J., & Loscalzo J. (1992a). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 444-448.

Stamler J.S., Singel D.J., & Loscalzo J. (1992b). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.

Stamler J.S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78: 931-936.

Stamler J. & Feelisch M. (1996). Preparation and detection of S-nitrosothiols. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 521-539. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.

- Stamler J.S., Toone E.J., Lipton S.A., & Sucher N.J. (1997). (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*. 18: 691-696.
- Stamler J.S., Lamas S., & Fang F.C. (2001). Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675-683.
- Stewart V.C. & Heales S.J. (2003). Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Rad. Biol. Med.* 34: 287-303.
- Stojanović S., Stanić D., Nikolić M., Raičević S., Spasić M., & Niketić V. (2005). Manganese superoxide dismutase (MnSOD) catalyzes NO-dependent tyrosine residue nitration. *J.Serb.Chem.Soc.* In Press.
- Stover J.F., Lowitzsch K., & Kempfski O.S. (1997). Cerebrospinal fluid hypoxanthine, xanthine and uric acid levels may reflect glutamate-mediated excitotoxicity in different neurological diseases. *Neurosci. Lett.* 238: 25-28.
- Stoyanovsky D., Murphy T., Anno P.R., Kim Y.M., & Salama G. (1997). Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 21: 19-29.
- Strong M.J., Sopper M.M., Crow J.P., Strong W.L., & Beckman J.S. (1998). Nitration of the low molecular weight neurofilament is equivalent in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and control cervical spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 157-164.
- Stroupe M.E., DiDonato M., and Tainer J.A. (2001). Manganese superoxide dismutase. In *Handbook of Metalloproteins* (ed. Messerschmidt A., Huber R., Poulos T., and Wieghardt K.), pp. 940-951. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Stubbe J.A. (1989). Protein radical involvement in biological catalysis? *Annu. Rev. Biochem.* 58: 257-285.
- Suarez-Pinzon W.L., Szabo C., & Rabinovitch A. (1997). Development of autoimmune diabetes in NOD mice is associated with the formation of peroxynitrite in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* 46: 907-911.
- Sulc F., Immoos C.E., Pervitsky D., & Farmer P.J. (2004). Efficient trapping of HNO by deoxyhemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 1096-1101.
- Szabo C., Salzman A.L., & Ischiropoulos H. (1995). Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Lett.* 363: 235-238.
- Tainer J.A., Getzoff E.D., Beem K.M., Richardson J.S., & Richardson D.C. (1982). Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* 160: 181-217.
- Takagi Y., Gon Y., Todaka T., Nozaki K., Nishiyama A., Sono H., Hashimoto N., Kikuchi H., & Yodoi J. (1998). Expression of thioredoxin is enhanced in atherosclerotic plaques and during neointima formation in rat arteries. *Lab. Invest.* 78: 957-966.
- Tan S., Zhou F., Nielsen V.G., Wang Z., Gladson C.L., & Parks D.A. (1998). Sustained hypoxia-ischemia results in reactive nitrogen and oxygen species production and injury in the premature fetal rabbit brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57: 544-553.

- Tanaka K., Shirai T., Nagata E., Dembo T., & Fukuuchi Y. (1997). Immunohistochemical detection of nitrotyrosine in postischemic cerebral cortex in gerbil. *Neurosci. Lett.* 235: 85-88.
- Taotao W., Chang C., Jingwu H., Baolu Z., & Wenjuan X. (2000). Nitric oxide damages neuronal mitochondria and induces apoptosis in neurons. *Chin. Sci. Bull.* 45: 422-429.
- Tatarko M. & Bumpus J.A. (1997). Further studies on the inactivation by sodium azide of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 339: 200-209.
- Tenneti L., D'Emilia D.M., & Lipton S.A. (1997). Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neurosci. Lett.* 236: 139-142.
- Thompson K.J., Shoham S., & Connor J.R. (2001). Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res. Bull.* 55: 155-164.
- Tilton R.G., Chang K., Corbett J.A., Misko T.P., Currie M.G., Bora N.S., Kaplan H.J., & Williamson J.R. (1994). Endotoxin-induced uveitis in the rat is attenuated by inhibition of nitric oxide production. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 3278-3288.
- Tohgi H., Abe T., Yamazaki K., Murata T., Ishizaki E., & Isobe C. (1999a). Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 46: 129-131.
- Tohgi H., Abe T., Yamazaki K., Murata T., Ishizaki E., & Isobe C. (1999b). Increase in oxidized NO products and reduction in oxidized glutathione in cerebrospinal fluid from patients with sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 260: 204-206.
- Torday L., Santillan M., Ciuffo G., Jauregui E., Pataricza J., Papp J., & Csizmadia I. (1999). Lewis acidity of NO^+ and NO_2^+ as measured by their affinity to selected bases. An ab initio background study of biological NO release. *J. Mol. Structure (Theochem)* 465: 69-78.
- Traylor T.G. & Sharma V.S. (1992). Why NO? *Biochemistry* 31: 2847-2849.
- Turrens J.F., Freeman B.A., Levitt J.G., & Crapo J.D. (1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 217: 401-410.
- Turney T.A. (1957). The Liebermann reaction. *J. Org. Chem.* 22: 1692-1693.
- Tyler D.D. (1975). Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem. J.* 147: 493-504.
- Uppu R.M., Squadrito G.L., & Pryor W.A. (1996). Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 327: 335-343.
- Urushitani M. & Shimohama S. (2001). The role of nitric oxide in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral. Scler. Other Motor Neuron Disord.* 2: 71-81.
- Vallance P. & Moncada S. (1993). Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horiz.* 1: 77-86.
- Vallance P. & Chan N. (2001). Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 85: 342-350.

- Vallance P. (2003). Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17 : 1-10.
- van der Veen R.C., Hinton D.R., Incardonna F., & Hofman F.M. (1997). Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation. *J. Neuroimmunol.* 77: 1-7.
- van der Veen R.C., Dietlin T.A., Dixon G.J., & Gilmore W. (2000). Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. *Cell Immunol.* 199: 43-49.
- van der Vliet, Eiserich J.P., O'Neill C.A., Halliwell B., & Cross C.E. (1995). Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 341-349.
- van der Vliet, Eiserich J.P., Halliwell B., & Cross C.E. (1997). Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J. Biol. Chem.* 272: 7617-7625.
- van Leeuwen F.X. & van Gelder B.F. (1978). A spectroscopic study of nitric-oxide-treated ceruloplasmin. *Eur. J. Biochem.* 87: 305-312.
- Vanderwinden J.M., Mailleux P., Schiffmann S.N., Vanderhaeghen J.J., & De Laet M.H. (1992). Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N. Engl. J. Med.* 327: 511-515.
- Vanin A.F. (1991). Endothelium-derived relaxing factor is a nitrosyl iron complex with thiol ligands. *FEBS Lett.* 289: 1-3.
- Vanin A.F., Men'shikov G.B., Moroz I.A., Mordvintcev P.I., Serezhenkov V.A., & Burbaev D.S. (1992). The source of non-heme iron that binds nitric oxide in cultivated macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1135: 275-279.
- Vanin A.F., Stukan R.A., & Manukhina E.B. (1996). Physical properties of dinitrosyl iron complexes with thiol- containing ligands in relation with their vasodilator activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1295: 5-12.
- Vanin A.F., Malenkova I.V., & Serezhenkov V.A. (1997). Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies. *Nitric Oxide* 1: 191-203.
- Vanin A.F. (1998). Dinitrosyl iron complexes and S-nitrosothiols are two possible forms for stabilization and transport of nitric oxide in biological systems. *Biochemistry (Mosc)*. 63: 782-793.
- Vanin A.F., Huisman A., Stroes E.S., Ruijter-Heijstek F.C., Rabelink T.J., & van Faassen E.E. (2001). Antioxidant capacity of mononitrosyl-iron-dithiocarbamate complexes: implications for NO trapping. *Free Rad. Biol. Med.* 30: 813-824.
- Vanin A.F., Muller B., Alencar J.L., Lobysheva I.I., Nepveu F., & Stoclet J.C. (2002). Evidence that intrinsic iron but not intrinsic copper determines S-nitrosocysteine decomposition in buffer solution. *Nitric Oxide* 7: 194-209.
- Vithayathil A.J., Ternberg J.L., & Commoner B. (1965). Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis. *Nature* 207: 1246-1249.

- Vladimirov I.A. (1998). [Free radicals and antioxidants]. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk* 156: 43-51.
- Wada K., Kamisaki Y., Ohkura T., Kanda G., Nakamoto K., Kishimoto Y., Ashida K., & Itoh T. (1998). Direct measurement of nitric oxide release in gastric mucosa during ischemia-reperfusion in rats. *Am. J. Physiol.* 274: G465-G471.
- Wade R.S. & Castro C.E. (1990). Redox reactivity of iron(III) porphyrins and heme proteins with nitric oxide. Nitrosyl transfer to carbon, oxygen, nitrogen, and sulfur. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 289-291.
- Wang P. & Zweier J.L. (1996). Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 271: 29223-29230.
- Weatherburn D.C. (1996). Structure and function of manganese-containing biomolecules. *Perspectives on Bioinorganic Chemistry* 3: 1-113.
- Weaver J. & Pollack S. (1989). Low-Mr iron isolated from guinea pig reticulocytes as AMP-Fe and ATP-Fe complexes. *Biochem. J.* 261: 787-792.
- Wever L., Leeuwen F.X. & Gelder B.F. (1973). The reaction of nitric oxide with ceruloplasmin. *Biochim. Biophys. Acta* 302: 236-239.
- Wei X.Q., Charles I.G., Smith A., Ure J., Feng G.J., Huang F.P., Xu D., Muller W., Moncada S., & Liew F.Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375: 408-411.
- Williams D.L.H. (1988) Nitrosation. Cambridge Press, Oxford.
- Willmott N., Sethi J.K., Walseth T.F., Lee H.C., White A.M., & Galione A. (1996). Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 271: 3699-3705.
- Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M., Elespuru R.K., Misra M., Dunams T.M., Cebula T.A., Koch W.H., Andrews A.W., & Allen J.S. (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254: 1001-1003.
- Wink D.A., Osawa Y., Darbyshire J.F., Jones C.R., Eshenaur S.C., & Nims R.W. (1993a). Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 115-123.
- Wink D.A., Darbyshire J.F., Nims R.W., Saavedra J.E., & Ford P.C. (1993b). Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 23-27.
- Wink D.A., Nims R.W., Darbyshire J.F., Christodoulou D., Hanbauer I., Cox G.W., Laval F., Laval J., Cook J.A., & Krishna M.C. (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/O₂ reaction. *Chem. Res. Toxicol.* 7: 519-525.
- Wink D.A. & Ford P.C. (1995). Nitric oxide reactions important to biological systems: a survey of some kinetics investigations. *Methods* 7: 14-20.

- Wink D.A., Cook J.A., Pacelli R., DeGraff W., Gamson J., Liebmann J., Krishna M.C., & Mitchell J.B. (1996a). The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch. Biochem. Biophys.* 331: 241-248.
- Wink D.A., Grisham M.B., Miles A.M., Nims R.W., Krishna M.C., Pacelli R., Teague D., Poore C.M., Cook J.A., & Ford P.C. (1996b). Determination of selectivity of reactive nitrogen oxide species for various substrates. *Methods Enzymol.* 268: 120-130.
- Wink D.A. & Feelisch M. (1996) Formation and Detection of Nitroxyl and Nitrous Oxide. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 403-412. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Wink D.A., Cook J.A., Kim S.Y., Vodovotz Y., Pacelli R., Krishna M.C., Russo A., Mitchell J.B., Jourdeuil D., Miles A.M., & Grisham M.B. (1997). Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 11147-11151.
- Wink D.A. & Mitchell J.B. (1998a). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.* 25: 434-456.
- Wink D.A., Feelisch M., Fukuto J., Chistodoulou D., Jourdeuil D., Grisham M.B., Vodovotz Y., Cook J.A., Krishna M., DeGraff W.G., Kim S., Gamson J., & Mitchell J.B. (1998b). The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch. Biochem. Biophys.* 351: 66-74.
- Wong P.S., Hyun J., Fukuto J.M., Shirota F.N., DeMaster E.G., Shoeman D.W., & Nagasawa H.T. (1998). Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. *Biochemistry* 37: 5362-5371.
- Woolum J.C., Tiezzi E., & Commoner B. (1968). Electron spin resonance of iron-nitric oxide complexes with amino acids, peptides and proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 160: 311-320.
- Worrall N.K., Lazenby W.D., Misko T.P., Lin T.S., Rodi C.P., Manning P.T., Tilton R.G., Williamson J.R., & Ferguson T.B., Jr. (1995). Modulation of in vivo alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 181: 63-70.
- Worrall N.K., Misko T.P., Sullivan P.M., Hui J.J., Rodi C.P., & Ferguson T.B., Jr. (1996). Corticosteroids inhibit expression of inducible nitric oxide synthase during acute cardiac allograft rejection. *Transplantation* 61: 324-328.
- Wu G.S., Zhang J., & Rao N.A. (1997). Peroxynitrite and oxidative damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 1333-1339.
- Wynter C.V. & Williams R. (1968). Iron-binding properties of gastric juice in idiopathic haemochromatosis. *Lancet* 2: 534-537.

Xia Y. & Zweier J.L. (1997). Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6954-6958.

Xu L., Eu J.P., Meissner G., & Stamler J.S. (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279: 234-237.

Yamakura F., Taka H., Fujimura T., & Murayama K. (1998). Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J. Biol. Chem.* 273: 14085-14089.

Yang C.C., Alvarez R.B., Engel W.K., & Askanas V. (1996). Increase of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in inclusion-body myositis. *Neuroreport* 8: 153-158.

Ye Y.Z., Strong M., Huang Z.Q., & Beckman J.S. (1996). Antibodies that recognize nitrotyrosine. *Methods Enzymol.* 269: 201-209.

Yim M.B., Berlett B.S., Chock P.B., & Stadtman E.R. (1990). Manganese(II)-bicarbonate-mediated catalytic activity for hydrogen peroxide dismutation and amino acid oxidation: detection of free radical intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 394-398.

Yoshida E., Mokuno K., Aoki S., Takahashi A., Riku S., Murayama T., Yanagi T., & Kato K. (1994). Cerebrospinal fluid levels of superoxide dismutases in neurological diseases detected by sensitive enzyme immunoassays. *J. Neurol. Sci.* 124: 25-31.

Youn H.D., Kim E.J., Roe J.H., Hah Y.C., & Kang S.O. (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* 318: 889-896.

Zhang Y.Y., Xu A.M., Nomen M., Walsh M., Keaney J.F., Jr., & Loscalzo J. (1996). Nitrosation of tryptophan residue(s) in serum albumin and model dipeptides. Biochemical characterization and bioactivity. *J. Biol. Chem.* 271: 14271-14279.

Zhao X.J., Sampath V., & Caughey W.S. (1994). Infrared characterization of nitric oxide bonding to bovine heart cytochrome c oxidase and myoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 537-543.

Zingarelli B., Ischiropoulos H., Salzman A.L., & Szabo C. (1997). Amelioration by mercaptoethylguanidine of the vascular and energetic failure in haemorrhagic shock in the anesthetised rat. *Eur. J. Pharmacol.* 338: 55-65.

Zweier J.L., Wang P., Samouilov A., & Kuppusamy P. (1995). Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat. Med.* 1: 804-809.

7 BIOGRAFIJA

Mr Srđan Stojanović je rođen 1963. godine u Sokobanji, gde je završio osnovnu i srednju školu. Godine 1982. upisao se na Prirodno-matematički fakultet u Beogradu, grupa za hemiju. Studije je započeo 1983. godine posle odsluženja vojnog roka, a diplomirao je 1989.g. sa prosečnom ocenom 8,91 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Magistarske studije iz biohemije završio je na istom fakultetu 1994. godine, odbranivši magistarsku tezu pod naslovom: "Uticaj vezivanja acetaldehida na strukturu hemoglobina kod alkoholičara". Od 1990. godine je zaposlen na Hemijskom fakultetu u Beogradu pri Katedri za biohemiju i to u periodu 1990-1994 kao asistent-pripravnik, a od 1994.g. kao asistent na predmetu Patološka biohemija.

Mr Srđan Stojanović je vršio dužnost sekretara Katedre za biohemiju u periodu 1992-1996. godine. Bio je više puta član Komisije za prijem studenata prve godine, kao i član Komisije za pregled i ocenu radova iz biohemije u okviru gradskog i republičkog takmičenja iz hemije Pokreta nauka mladima. Aktivno je učestvovao u radu Istraživačke stanice u Petnici, držeći dva puta teorijske i eksperimentalne kurseve iz oblasti hemije i biohemije proteina grupama učenika srednjih škola. U periodu 1996-1998. godine bio je član Saveta Hemijskog fakulteta.

Autor je ili koautor 6 naučnih radova i 18 naučnih saopštenja. Koautor je praktikuma iz predmeta Patobiohemija za studente biohemije: "Biohemijski procesi u patološkim promenama metabolizma".

Прилог

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Потписани/а

Изјављујем да је електронска верзија моје докторске дисертације

Срђан

Стојановић_____

коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума
Универзитета у Београду** истоветна штампаној верзији која се налази у фонду
Универзитетске библиотеке „Светозар Марковић“.

Потпис



У Београду, 14.04.1014.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Стојановић, Срђан Ђ.

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Дисмутација азот монооксида у биолошким и модел системима: in vitro испитивања

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 21.2.14.

Срђан Стојановић

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Дисмутација азот монооксида у биолошким и модел системима: in vitro испитивања

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис

У Београду, 21.2.14.

