

Ispitivanje uticaja različitih liganada na dinitrozil gvožđe kompleksom (DNIC) uz posredovanu dismutaciju azot monoksida (NO)

Azot monoksid (NO) je veoma važan molekul koji u organizmu reguliše veliki broj procesa, međutim određeni efekti koji mu se pripisuju potiču od njegovih reaktivnih vrsta, kao što su nitroksil (NO⁻) i nitrozonijum (NO⁺) joni. Slobodno gvožđe koje se u organizmu nalazi vezano za niskomolekulske ligande ili proteine gradi sa azot monoksidom DNIC (dinitrozil kompleks gvožđa). Cilj rada bio je da prouči efekte različitih liganada (cistein, glutation i goveđi serum albumin) na stabilnost i nastajanje DNIC i na DNIC-posredovanu dismutaciju NO do NO⁻ vrste.

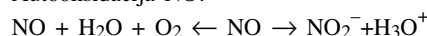
Uvod

Azot monoksid (NO) je veoma važan molekul koji u organizmu reguliše veliki broj procesa; NO učestvuje u regulaciji krvnog pritiska, neurotransmisiji, odbrani od patogena (Moncada *et al.* 1998). Pored brojnih fizioloških uloga, azot monoksid može delovati i patofiziološki kada je prisutan u prekomernim količinama u organizmu (Moncada *et al.* 1998). 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. Patološki efekti su uglavnom povezani sa prekomernim generisanjem reaktivnih azotnih vrsta (RNS, reactive nitrogen species), kao što je peroksinitrit (OONO⁻), koji nastaje u reakciji NO sa superoksid anjon radikalom (O₂⁻) (Eiserich *et al.* 1998; Groves, 1999).

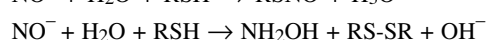
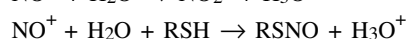
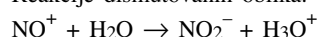
Od skora se pojavila hipoteza da bi u organizmu mogli postojati enzimi ili jedinjenja koja su u stanju da prekomerno generisani NO dismutuju. Radovi Niketić *et al.* 1999 i Stojanović *et al.* 2004 pokazuju da bi takvu ulogu u organizmu mogli uzeti mangan superoksid dismutaza i/ili DNIC (dinitrosyl iron complex). Dismutacijom azot monoksida nastaju NO⁺ i NO⁻ koji su veoma reaktivni i brzo formiraju nova jedinjenja:



Autooksidacija NO:



Reakcije dismutovanih oblika:



Za razliku od 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). Na osnovu karakterističnih EPR spektara (Bryar *et al.* 1992) 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).

"Slobodno" gvožđe obuhvata jone Fe²⁺ i Fe³⁺ koji se nalaze u nestabilnim kompleksima sa ligandima male molekulske mase, ili su labilno vezani za proteine. Nivo "slobodnog" gvožđa se povećava u nekim oboljenjima, kao i u uslovima oksidativnog stresa (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Dinitrozil kompleksi gvožđa tipa Fe(I)(NO)₂(RS⁻)₂ (slika 1) detektovani su primenom EPR tehnike u uslovima povećane produkcije NO u mnogim biološkim sistemima kao što su: makrofagi, tumori, ćelije jetre, ćelije glatkih mišića i pankreasa (Vanin *et al.* 1992 i Vanin *et al.* 1996).

Vladimir Prokopović (1988), Leskovac, Voždova 33, učenik 2. razreda Gimnazije u Leskovcu

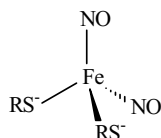
MENTOR:
Miloš Filipović, Hemijski fakultet u Beogradu

U svetlu dosadašnjih rezultata koji se odnose na ulogu i značaj DNIC u metabolizmu NO, mi smo hteli da dublje ispitamo sposobnost ovih kompleksa da dismutuju NO. Određenije, cilj ovog rada bio je da uporedi efekte različitih liganada (cistein – Cys, glutation – GSH i goveđi serum albumin – BSA) na stabilnost i nastajanje DNIC kao i na DNIC posredovanu dismutaciju NO do NO^- vrste. Rad se takođe bavi i efektom pufera (kalijum fosfatni-KPi i HEPES) na ove parametre.

Materijal i metode

Cistein, glutation i BSA nabavljeni su od Sigme. Sve ostale hemikalije korišćene u eksperimentalnom radu bile su najveće čistoće.

Pripremanje rastvora azot monoksida. Azot monoksid korišćen u ovom radu pripremljen je prema modifikovanom postupku Lee *et al.* (1994). Šema aparature za dobijanje i uvođenje NO u uzorke



Slika 1. Struktura paramagnetičnog DNIC sa tiolima, $\text{Fe(I)(NO)}_2(\text{RS}^-)_2$ kompleksa.

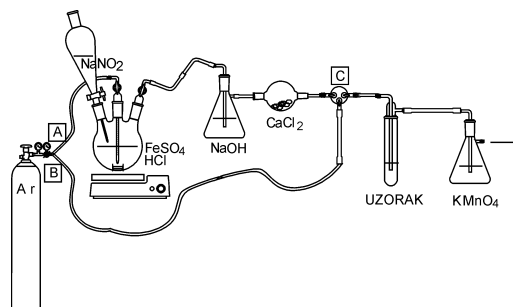
Figure 1. Structure of paramagnetic DNIC with thiols ligands, $\text{Fe(I)(NO)}_2(\text{RS}^-)_2$ complex.

prikazana je na slici 2.

Ukratko, kroz aparaturu se najpre 2 h propušta argon kako bi se uklonio sav prisutan kiseonik, a zatim se ukapava natrijum nitrit u kiseli rastvor FeSO_4 uz neprekidano mešanje. Izdvojeni NO se uvodi u gass-tight staklenu bočicu sa septumom napunjenu destilovanom vodom. Tako pripremljenom rastvoru NO određena je koncentracija na NO-metru (Harvard Apparatus) i bila je ca 1.7 mM.

Pravljenje DNIC. Sa Cys i GSH: u 970 μL 50 mM KPi ili HEPES pufera dodavano je 10 μL 10 mM rastvora Fe^{2+} i 20 μL rastvora 10 mM Cys, odnosno GSH. Sa BSA: u 990 μL 200 M rastvora BSA (BSA u HEPES puferu) dodavano je 10 μL 10 mM rastvora Fe^{2+} . Nakon dodavanja liganada i Fe^{2+} jona u odgovarajući pufer dodavani su gas-tight Hamil-

tonovim špricem bolusi NO (bolus – unapred određena zapremina rastvora gasa poznate koncentracije). Nakon dodavanja određenog broja bolusa, određivani su hidroksilamin i zaostale sulfhidrilne (SH) grupe.



Slika 2. Aparatura za dobijanje i uvođenje NO.

Figure 2. Apparatus for preparation of NO solutions.

Određivanje hidroksilamina (Arnelle & Stampler 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 rastvora natrijum karbonata tako da pH bude 11. Boja se razvija 60 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se meri apsorbanca na 700 nm. Koncentracija hidroksilamina u uzorcima se očitava sa odgovarajuće standardne prave za hidroksilamin. Standardna prava se priprema svaki put kada se pripremaju novi reagensi.

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 L 3 mM DTNB reagensa u 0.1 M kalijum fosfatnom puferu pH 7.3. Dobro promešati rastvor na Vortex-mešalici i meriti apsorbanca na 412 nm nakon 10 minuta (ili nakon dužeg vremena ako se apsorbanca nije ustalila). Koncentracija SH-grupa se određuje na osnovu molarnog apsorpcionog koeficijenta ($a = 14150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

SDS-PAGE (Laemmli 1970). Natrijum dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza izvođena je na 10% gelu pri naponu od 160 V, jačini struje od 30 mA, na 4 °C, tokom 2 sata na Hoefler-ovom sistemu za elektroforezu. Za bojenje gela korišćena je boja Coomassie Blue R-250.

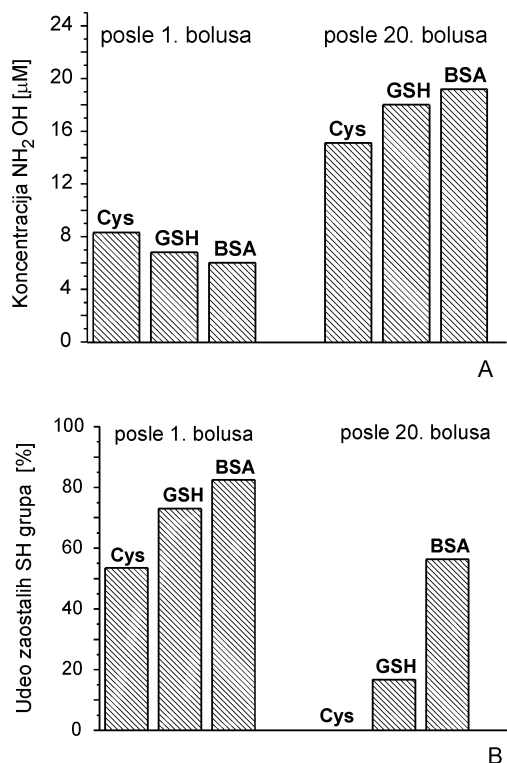
Rezultati i diskusija

Stabilnost DNIC kompleksa intenzivno je proučavana poslednjih godina i pokazano je da je ona uslovljena tipom liganada koji ga grade (Vanin *et al.* 1996, Bryar *et al.* 1992). Manji ligandi kao što je cistein grade najnestabilnije komplekse, dok su oni sa proteinima jako stabilni i postojani. U svetlu ovoga mi smo ispitivali efekat cisteina, glutationa i BSA na sposobnost dismutacije NO u aerobnim uslovima. NO⁺ koji nastaje u reakciji odmah sa vodom daje nitrit. Nitrit je nemoguće pratiti jer i NO koji se dodaje u rastvor da bi DNIC nastao, pri ovim uslovima podleže, jednim delom, autooksidaciji i daje NO₂⁻. Praćenje NO⁻ vrste je moguće posredno, preko hidroksilamina koji nastaje u reakciji sa slobodnim SH grupama.

Produkcija hidroksilamina je zabeležena već pri prvom dodavanju NO u svim slučajevima, nezavisno od tipa liganada (slika 3A). Ona je najveća kod kompleksa koje izgrađuje cistein, a najmanja kod BSA. Potrošnja slobodnih SH grupa (slika 3B) takođe pokazuje isti trend, potvrđujući ranije nalaze da su kompleksi sa cisteinom najnestabilniji, a nestabilnost opada u nizu Cys, GSH, BSA. Nakon 20. dodavanja NO (kumulativna koncentracija 200 mM) najveća količina produkovanog hidroksilamina je detektovana kod kompleksa koji je izgrađen od BSA, dok je najmanja količina nađena kod cisteinskih DNIC. Najveća količina zaostalih SH grupa takođe je nađena kod proteinskih DNIC, dok su sve SH grupe izoksidovane u slučaju cisteina.

Na slikama 4, 5 i 6 može se pratiti kinetika produkcije NO⁻ i potrošnje SH grupa. Iz ovih rezultata se jasno vidi da najmanju efektivnu dismutacionu sposobnost imaju kompleksi sa cisteinom. SH grupe koje su neophodne za građenje kompleksa, jako brzo se troše u reakcijama sa novonastalim NO⁺ i NO⁻ tako da se pri svakom ciklusu njihova koncentracija smanjuje, a time i verovatnoća za nastajanje DNIC kompleksa. Već nakon dodatog petog bolusa NO (kumulativno 50 μM) sve SH grupe su potrošene što je praćeno i nepromenjenom koncentracijom hidroksilamina.

GSH gradi stabilnije DNIC komplekse koji se sporije raspadaju i duže traju, tako da se manje SH grupa oksiduje u ovim reakcijama, pa je i apsolutna efikasnost ovakvih kompleksa mnogo veća. To objašnjava i nalaz da tek nakon što koncentracija SH

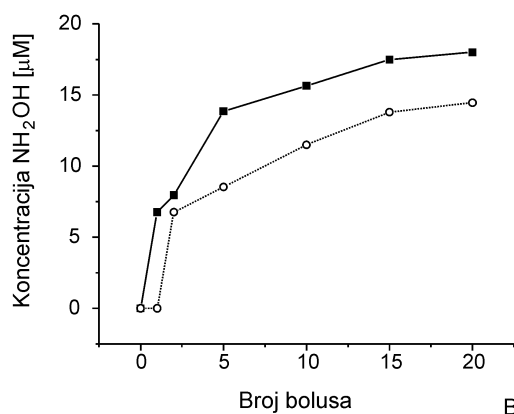
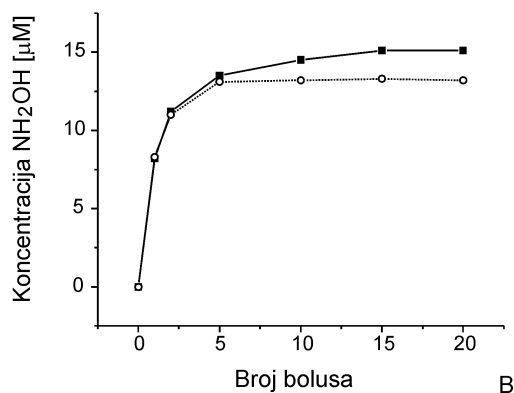
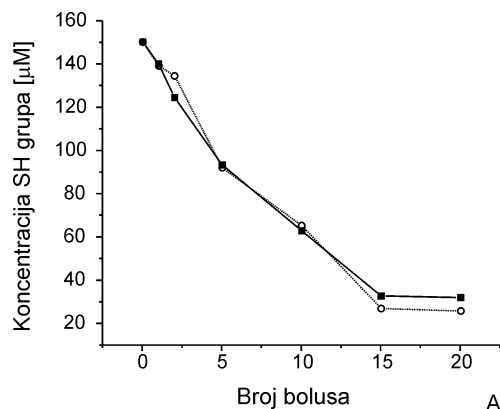
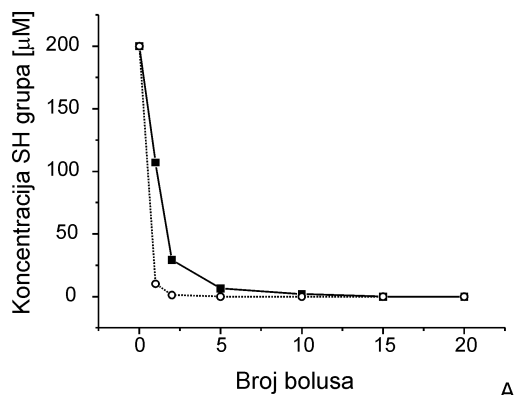


Slika 3. Produkcija hidroksilamina (A) i potrošnja SH grupa u DNIC koji nastaju iz različitih liganada. DNIC kompleksi su napravljeni iz cisteina, glutationa i BSA i u uzorcima su određivane koncentracije hidroksilamina i zaostalih SH grupa po postupku datom u materijalu i metodama. Svi eksperimenti su rađeni u 50 mM HEPES puferu pH 7.4.

Figure 3. Production of hydroxylamine (A) and disappearance of SH groups in DNIC made from various ligands. DNIC are made from cysteine, glutathione and BSA. Concentrations of hydroxylamine and residual SH groups are determined in these samples. All experiments are done in 50 mM HEPES buffer pH 7.4.

grupa padne na cca. 10%, proizvodnja hidroksilamina se zaustavlja.

Najveću efikasnost u dismutovanju pokazali su, suprotno očekivanju, kompleksi sa BSA. Ovi kompleksi su poznati kao znatno stabilniji, što i objašnjava nalaz da je inicijalna produkcija NO⁻ najmanja kod ovih kompleksa. Međutim, kako su SH grupe ovde najmanje podložne oksidovanju, njihov potencijal za dismutovanje nije završen ni nakon 20. bolus dodatka NO. Ovo otvara sasvim drugačiji pogled na proteinske DNIC komplekse kojima se nije



Slika 4. Kinetika potrošnje SH grupa A) i nastajanje hidroksilamina B) iz cisteinskog DNIC napravljenog u 50 mM HEPES puferu pH 7.4 (kvadratići) i 50 mM KPi pH 7.4 (kružići).

Figure 4. Kinetics of SH groups disappearance A) and production of hydroxylamine B) from cysteine DNIC made in 50 mM HEPES buffer pH 7.4 (squares) and in KPi pH 7.4 (circles).

pridavala tolika važnost sa aspekta njihove uloge u metabolizmu, osim što su korišćeni kao markeri za overprodukciju NO (Boese *et al.* 1995). Kako je najveća verovatnoća da DNIC kompleksi u organizmu nastanu iz proteinskih SH grupa, jer njih ima najviše, pa zatim od SH grupa iz glutationa, na osnovu ovih rezultata se čini da bi oni mogli imati važnu protektivnu ulogu u uklanjanju viška NO u svim fiziološkim i/ili patološkim stanjima.

Nezavisno od tipa liganda, kinetika dismutacije i nastajanja/raspadnja DNIC pokazuje dostizanje jednog platoa što korelira sa iznetim objašnjenjem da se

Slika 5. Kinetika potrošnje SH grupa A) i nastajanje hidroksilamina B) iz glutatonskog DNIC napravljenog u 50 mM HEPES puferu pH 7.4 (kvadratići) i 50 mM KPi pH 7.4 (kružići).

Figure 5. Kinetics of SH groups disappearance A) and production of hydroxylamine B) from glutathione DNIC made in 50 mM HEPES buffer pH 7.4 (squares) and in KPi pH 7.4 (circles).

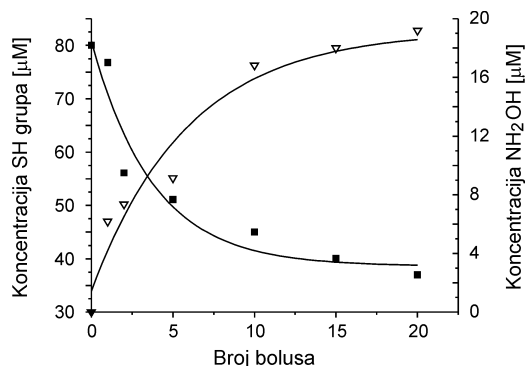
tokom dismutacije troše SH grupe tako da je pri svakom sledećem ciklusu količina nastalog DNIC manja, pa i količina obrnutog NO po ciklusu.

U radu je takođe ispitivan i efekat pufera na DNIC-om posredovanu dismutaciju NO (slike 4–6). Naime, svi pomenuti eksperimenti su rađeni u 50 mM HEPES puferu pH 7.4 koji je najkorišćeniji pufer za ispitivanje reakcija DNIC jer ne interferira sa njihovim nastajanjem ni na koji način. Međutim, kako fosfatni pufer više odgovara fiziološkoj sredini nego HEPES, paralelni eksperimenti su izvedeni za cisteinske i glutatonske DNIC u 50 mM fosfatnom

puferu pH 7.4. Rezultati pokazuju da je dismutacija u ovakvom sistemu smanjena u odnosu na onaj sa HEPES puferom, odnosno da SH grupe mnogo brže podležu oksidaciji te je time i količina nastalog hidroksilamina manja. Ovo se može objasniti radovima Vanin *et al.* 1996 koji pokazuju da fosfatni jon i sam može biti ligand za građenje DNIC, posebno za slučaj kada količina drugog liganda u ovom slučaju nosioca SH grupa, počne da opada.

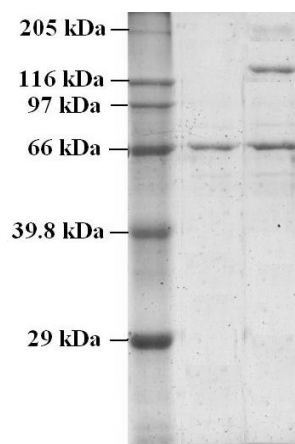
Na slici 8 je sumiran ciklus dismutacije NO posredovan DNIC kompleksima. Skoriji radovi Stojanović *et al.* 2004 pokazali su da se reakcija odvija po ovom navedenom mehanizmu, a ne uz predominantno produkovanje N₂O kako se ranije mislilo. Nastali NO⁺ bi odmah reagovao sa SH grupama i nagradio RSNO (Vanin *et al.* 1997). RSNO je dugo smatran fiziološkom alternativom za NO, ili produženom rukom“ azot monoksida za delovanje na krvne sudove (Vanin *et al.* 1991, Vanin *et al.* 1998). S druge strane nastali NO⁻, može da reaguje sa SH grupama i gradi hidroksilamin, koji sam ima fiziološke uloge, ali može i kao takav da deluje na nervne završetke i dovede do oslobađanja CGRP (calcitonin gene related peptide) koji je najjači poznati vazodilatator do sada. U skladu sa našim rezultatima, proteinski DNIC kompleksi bi, suprotno očekivanim rezultatima i važećem stavu, ovde mogli odigrati važnu ulogu u modulisanju odgovora organizma na NO i povećati njegov efekat preko navedenih mehanizama. S druge strane na ovaj način se ćelija i njena okolina štite od potencijalnog nastajanja peroksinitrita u reakciji prikazanoj na slici 8.

Međutim, pored protektivnih efekata, skoriji radovi Kirsch & de Groot, 2002 pokazuju da NO⁻ može reagovati sa kiseonikom, koga naravno ima u fiziološkim sistemima, i nagraditi peroksinitrit. Kao posledica toga javio bi se nitrotirozin i ditirozin na okolnim proteinima. Da bi ovo proverili mi smo uzorke u kojima je DNIC pravljen od BSA podvrgli SDS poliakrilamidnoj elektroforezi (slika 7). I zaista na elektroforezi se mogu uočiti dve dodatne trake u poređenju sa kontrolom, čije molekulske mase odgovaraju dimernim i trimernim formama BSA. U koliko meri peroksinitrit zaista nastaje u ovoj reakciji ostaje da se vidi u narednim eksperimentima koji bi trebalo da otkriju pravu fiziološku prirodu DNIC-om posredovane dismutacije azot monoksida, odnosno da ukažu na to koji od efekata je predominantan, protektivan ili destruktivan.



Slika 6. Kinetika potrošnje SH grupa (kvadratići) i nastajanja hidroksilamina (trougličići) iz proteinskog (BSA) DNIC napravljenog u 50 mM HEPES puferu pH 7.4

Figure 6. Kinetics of SH groups disappearance (squares) and production of hydroxylamine (triangles) from protein (BSA) DNIC made in 50 mM HEPES

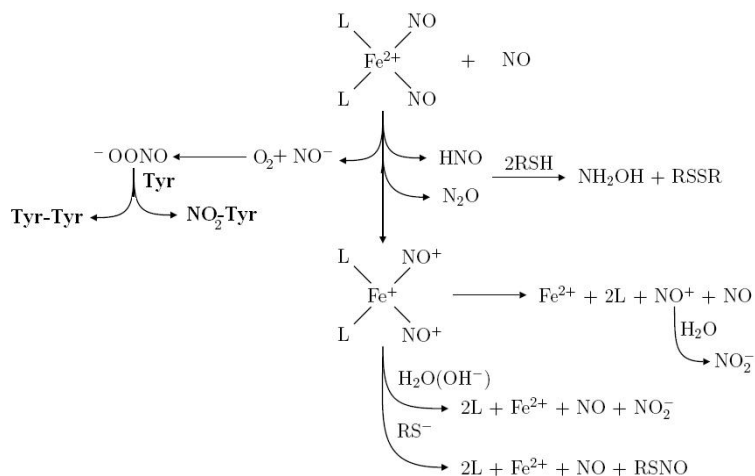


Slika 7. SDS PAGE uzoraka BSA pre i posle dismutacije NO. U prvom nizu se nalaze markeri poznate molekulske mase, u drugom je netretirani BSA, a u trećem uzorak nakon dismutacije NO.

Figure 7. SDS PAGE of BSA samples before and after NO dismutation. Molecular weight are in the first lane, the second lane contains untreated BSA and the third lane contains sample after NO dismutation.

Zaključak

Na osnovu svih dobijenih rezultata možemo sa sigurnošću tvrditi da DNIC kompleksi veoma intenzivno dismutuju NO. Tip liganda direktno utiče



Slika 8. Shematski prikaz DNIC-om posredovane dismutacije NO, sporednih reakcija koje nastaju između novonastalih NO^- i NO^+ sa ligandima (desna strana) kao i reakcija NO^- sa kiseonikom u kojoj nastaje peroksinitrit (ONOO^-). ONOO^- može da nitruje ($\text{NO}_2\text{-Tyr}$) ili oksiduje (Tyr-Tyr) tirozinske ostatke u proteinima (leva strana).

Figure 8. Scheme summarised DNIC mediated NO dismutation and reactions of its dismutation products: NO^- and NO^+ with ligands (right side) and reactions of NO^- with oxygen in which peroxynitrite (ONOO^-) is formed. ONOO^- causes nitration ($\text{NO}_2\text{-Tyr}$) and oxydation of (Tyr-Tyr) tyrosin residues in proteins (left side).

na stabilnost kompleksa, a samim tim i na kinetiku dismutacije, što možemo videti na osnovu dobijenih rezultata. DNIC kompleksi sa cisteinom kao ligandom pokazali su se kao najnestabilniji i sa najmanjom sposobnošću dismutacije. GSH gradi stabilnije DNIC komplekse koji se sporije raspadaju i duže traju, pa je i apsolutna efikasnost ovakvih kompleksa mnogo veća u odnosu na cisteinske komplekse. Najpostojanije i najstabilnije komplekse gradi BSA pa je i dismutaciona moć ovih kompleksa najveća. S obzirom na svoju stabilnost, kompleksi sa BSA najduže traju i najefikasnije dismutuju NO. Dismutacija NO je praćena paralelno u dva pufera: u HEPES puferu koji ni na koji način ne interferira pri sintezi kompleksa i KPi puferu koji i sam može da se veže za gvožđe i zameni organske ligande pa na taj način smanjuje dismutaciju azot monoksida.

Literatura

Arnelle L. & Stamler J. 1996. Detection of hydroxylamine. In *Methods in nitric oxide research* (ed. M. Feelisch M. and J. S. Stamler). Wiley, pp. 541-552

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

Bryar T. R., Eaton D. R. 1992. Electronic configuration and structure of paramagnetic iron dinitrosyl complexes. *Can. J. Chem.*, 70: 1917.

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.

Groves J.T. (1999). Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3: 226.

Habeeb A. 1972. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. In *Methods in Enzymology* (ed. C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff). Academic Press, Vol.25, pp. 457-464.

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

Kirsch M. & de Groot H. 2002. Formation of Peroxynitrite from Reaction of Nitroxyl Anion with Molecular Oxygen. *JBC*, 277: 13379.

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

Lee M., Arosio P., Cozzi A., Chasteen N. D. 1994. Identification of the EPR-active iron-nitrosyl complexes in mammalian ferritins. *Biochemistry*, **33**: 3679.

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

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.

Stojanovic S., Stanic D., Nikolic M., Spasic M., Niketic V. 2004. Iron catalyzed conversion of NO into nitrosonium (NO⁺) and nitroxyl (HNO/NO⁻) species. *Nitric Oxide*, **11**: 256.

Vanin A. F. 1991. Endothelium-derived relaxing factor is a nitrosyl iron complex with thiol ligands. *FEBS Lett.*, **289**: 1.

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.

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., 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.

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.

Vladimir Prokopović

Effects on Different Ligands on Dinitrosyl Iron Complex (DNIC) – Assisted NO Dismutation

Nitric oxide (NO) is considered to be very important inter/intracellular messenger regulating numerous physiological processes. Some of the effects that are connected with NO are actually result of the action of his congeners: nitrosonium (NO⁺) and nitroxyl (NO⁻) species. Free iron, which is loosely bound for the low molecular ligands and proteins in human organism, reacts with NO to give DNIC (dinitrosyl iron complex, Figure 1). It has been shown that these complexes can disproportionate NO. This paper examines the effects of different ligands (cysteine, glutathione and bovine serum albumin) on stability and formation of DNIC as well as on DNIC-mediated NO dismutation. Hydroxylamine production (Figures 3-6) was detected in all samples after first bolus addition of NO. The greatest amount of total hydroxylamine was found in DNIC made from BSA, while those made from cysteine produced the lowest hydroxylamine amount. Independently on the ligand type, dismutation kinetics shows a saturation plateau which corresponds to the disappearance of free SH groups. Experiments done in 50 mM HEPES buffer gave higher amount of total hydroxylamine and more stabile DNIC's than those done in potassium phosphate buffer. SDS PAGE analysis (Figure 7) of the samples containing BSA showed protein aggregation as a consequence of peroxy-nitrite formation. The extent in which peroxy-nitrite is formed in this reaction remains to be solved, giving us a clear picture of the preferential (protective or destructive) effects of DNIC-mediated NO dismutation.