

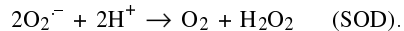
Efikasnost produkcije peroksinitrita (OONO^-) iz različitih dinitrozil gvožđe kompleksa (DNIC) pri aerobnim uslovima

Azot-monoksid (NO) je sveprisutni ćelijski glasnik koji u ljudskom organizmu reguliše veliki broj procesa, ali njegova prekomerna produkcija doprinosi patologiji raznih bolesti. Patološki efekti uglavnom su povezani sa generisanjem reaktivnih azotnih vrsta (RNS-reactive nitrogen species), kao što je peroksinitrit (ONOO^-) koji nastaje u reakciji NO sa superoksid anjon-radikalom (O_2^-). Peroksinitrit, koji je inače jak oksidacioni i nitrujući agens, smatra se glavnim medijatorom NO^- indukovane citotoksičnosti. Nitroksil (NO^-), kao i nitrozonijum (NO^+) vrsta, produkt je dinitrozil-gvožđe kompleksa (DNIC) posredovane dismutacije NO. Cilj rada bio je da se upoređi efikasnost produkcije peroksinitrita iz različitih DNI kompleksa u aerobnim uslovima. Kao ligandi u DNI kompleksima korišćeni su cistein (Cys), glutation (GSH) i goveđi serum albumin (BSA). Formiranje peroksinitrita zabeleženo je već pri prvom dodatku azot monoksida u svim slučajevima, nezavisno od tipa liganda. Cisteinski i glutationski kompleksi pokazali su se kao kompleksi koji indukuju najmanju produkciju peroksinitrita što je uzrokovano nestabilnošću samih kompleksa, dok se iz albuminskog kompleksa formirala najveća količina peroksinitrita. Svi eksperimenti rađeni su paralelno u prisustvu enzima MnSOD koji uklanja O_2^- neophodan za formiranje peroksinitrita. Rezultati ovih eksperimenata potvrdili su postojanje mehanizma nastajanja OONO^- od NO^- i O_2 preko NO i O_2 .

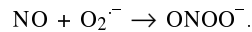
Uvod

Azot-monoksid (NO) je sveprisutni ćelijski glasnik koji reguliše brojne fiziološke procese, ali njegova prekomerna produkcija značajno doprinosi razvoju raznih bolesti (Moncada *et al.* 1991, Eiserich *et al.* 1998). Patološki efekti su povezani sa generisanjem reaktivnih azotnih vrsta (RNS, reactive nitrogen species) kao što je peroksinitrit (ONOO^-) koji nastaje u reakciji NO sa superoksid anjon-radikalom (O_2^-). Peroksinitrit, koji je inače jak oksidacioni i nitrujući agens, smatra se glavnim medijatorom NO^- indukovane citotoksičnosti (Eiserich *et al.* 1998, Groves 1999).

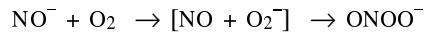
Superoksid anjon-radikal (O_2^-) nastaje kao sporedni proizvod u normalnom aerobnom metabolizmu, a njegova produkcija može biti povećana u raznim patološkim stanjima. Uloga enzima superoksid dismutaze (SOD) je da katalizuje disproporcionisanje superoksid anjon radikala u kiseonik i vodonik-peroksid (Fridovich 1983, Fridovich 1986):



Eksperimenti *in vitro* su pokazali da NO i O_2^- reaguju brzo (konstanta brzine $7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, tako da je reakcija kontrolisana brzinom difuzije reaktanata), pri čemu nastaje izuzetno reaktivni proizvod, peroksinitrit (Huie i Padmaja 1993):



Međutim, peroksinitrit može nastati i na alternativni način u reakciji NO^- sa kiseonikom. Smatra se da ova reakcija teče preko intermedijera (NO i O_2^-).



Direktni dokazi za nastajanje peroksinitrita *in vivo* za sada ne postoje, dok su indirektni dokazi kontradiktorni. Količina peroksinitrita koji bi mogao da

Vladimir Prokopović (1988), Leskovac, Voždova 33, učenik 3. razreda Gimnazije u Leskovcu

MENTOR:
Miloš Filipović, Hemijski fakultet u Beogradu

nastane *in vivo* zavisice od koncentracije NO i superoksid anjon radikala, koje ce opet zavisiti, s jedne strane od produkcije ovih radikala, a sa druge, od njihovih reakcija sa biomolekulima (Fukuto i Ignarro 1997).

Peroksinitritni anjon ONOO^- je veoma reaktivna vrsta. Na fiziološkom pH ONOO^- brzo se 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. Peroksinitritni anjon dodat celijama, tkivima ili telesnim tečnostima, brzo se protonuje do peroksiazotaste kiseline, što dovodi do oksidacije SH grupa i drugih antioksidanasa, oksidacije lipida, cepanja lanaca DNK, nitrovanja i dezaminacije nukleinskih baza. Najviše izučavana reakcija peroksinitrita sa proteinima je reakcija nitrovanja ostataka tirozina gde se dobija nitrotirozin. Nitrovanje ostataka tirozina *in vivo* često se uzima kao indikacija generisanja peroksinitrita, pod datim (patološkim) fiziološkim uslovima. Sve ove reakcije mogu imati potencijalno štetne posledice za biološke sisteme (Koppenol *et al.* 1992, Koppenol 1998, Halliwell i Gutteridge 1999).

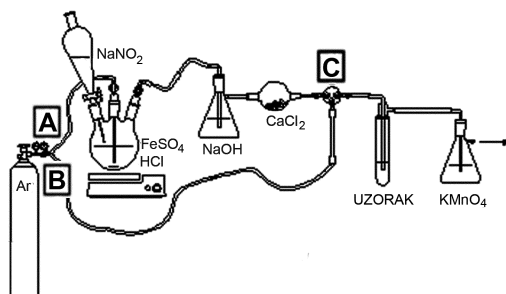
U prethodnom ispitivanju (Prokopović 2005) o dismutaciji (proces istovremene oksidacije i redukcije) azot monoksida posredstvom različitih DNIC (eng. dinitrosyl iron complex) pokazano je da nastaje nitroksil anjon (NO^-). Takođe, bilo je indikacija da nastaje i peroksinitrit. Zbog toga, ideja i cilj rada bili su da se ispita da li pri dismutaciji azot-monoksida posredstvom različitih kompleksa dinitrozilgvožđa pri aerobnim uslovima nastaje i peroksinitrit i da li u slučaju proteinskih DNI kompleksa nastaje nitrotirozin kao direktna posledica formiranja peroksinitrita. Takođe, ispitano je i da li se radi o gore pomenutom mehanizmu formiranja peroksinitrita.

Materijal i metode

Sve supstance korišćene u eksperimentima bile su p.a. 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 prikazana je na slici 1.

Ukratko, kroz aparaturu se najpre 2 h propušta argon kako bi se uklonio sav prisutan kiseonik, a zatim se ukapava rastvor natrijum-nitrita u kiseli



Slika 1. Aparatura za dobijanje i uvođenje NO

Figure 1. Apparatus for preparation of NO solutions.

rastvor FeSO_4 uz neprekidano mešanje. NO koji se izdvaja se uvodi u gas-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.

U cilju izvođenja ogleda sintetisani su cisteinski, glutationski i albuminski DNI kompleksi u koje je dodavan rastvor NADH. Svi eksperimenti rađeni su i u prisustvu enzima MnSOD sa ciljem da se ispita mehanizam formiranja peroksinitrita od NO^- i O_2 preko NO i O_2 .

Sinteza kompleksa i određivanje koncentracije NADH, odnosno koncentracije NAD^+ bez prisustva enzima

Sa Cys i GSH: u 50 mM HEPES pufera dodat je ligand do 200 M i kiseli rastvor FeSO_4 do 200 M. Ovaj rastvor korišćen je kao slepa proba na 340 nm, tj. na talasnoj dužini na kojoj NADH ima maksimum apsorpcije. Nakon snimanja slepe probe u rastvor je dodat NADH do 160 M. Zatim je u rastvor na svakih pet minuta dodavano po 15 l 1.2 mM rastvora NO i merena je apsorbancna na 340 nm. Apsorpcioni koeficijent NADH na 340 nm je $6200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. U svaki uzorak dodato je ukupno po 15 bolusa NO (bolus – unapred određena zapremina vodenog rastvora gasa poznate koncentracije).

Sa BSA: Sinteza kompleksa sa albuminom identična je sintezi prethodna dva kompleksa. Posle sinteze snimljen je spektar u opsegu talasnih dužina 300-700 nm sa ciljem da se pored apsorbance NADH na 340 nm detektuje i apsorpcija na 420 nm koja bi poticala od nitrotirozina, za čije su formiranje postojale indikacije u prethodnom radu. Ap-

sorpcioni koeficijent nitrotirozina na 420 nm je $4200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

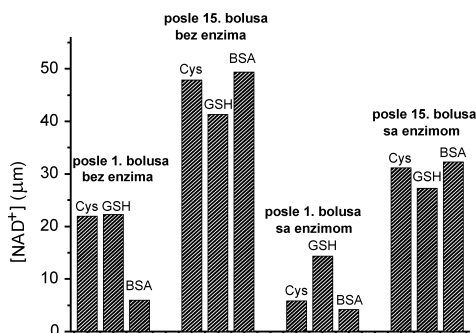
Sinteza kompleksa i određivanje koncentracije NADH, odnosno koncentracije NAD^+ u prisustvu enzima

Sa Cys i GSH: sinteza kompleksa u prisustvu enzima razlikuje se od sinteze kompleksa bez prisustva enzima po tome što je HEPES puferu dodat i enzim aktivnosti 56 U mg^{-1} (odnos zapremina rastvora i dodatog enzima bila je 1:50), a koncentracija NADH je određivana na isti način kao i u uzorku bez enzima.

Sa BSA: sinteza kompleksa sa albuminom identična je sintezi prethodna dva kompleksa u prisustvu enzima, a određivanje koncentracije NADH izvodi se na isti način kao i u albuminskom DNI kompleksu bez prisustva enzima.

Rezultati i diskusija

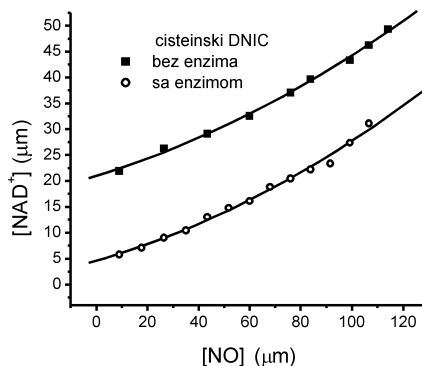
Nakon svih urađenih eksperimenata zaključili smo da su rezultati opravdali teorijska očekivanja. Na slikama 3, 4 i 5 u svim slučajevima nezavisno od tipa liganda detektovan je rast koncentracije NAD^+ . Porast koncentracije NAD^+ uslovljen je oksidovanjem



Slika 2. Sumirani prikaz koncentracija NAD^+ nastalih iz različitih DNIC u uslovima sa i bez enzima. DNIC kompleksi napravljeni su iz cisteina, glutatona i BSA i u uzorcima je određivana koncentracija NAD^+ . Svi eksperimenti radeni u 50 mM HEPES puferu pH 7.4.

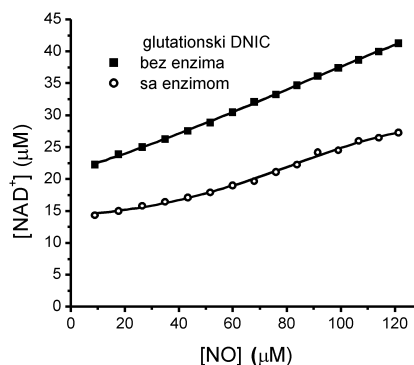
Figure 2. Scheme of summarized concentrations of NAD^+ formed from various DNICs in conditions with and without MnSOD. DNICs are made from cysteine, glutathione and BSA and concentrations of NAD^+ . All experiments were done in 50 mM HEPES buffer pH 7.4.

NADH. Ovo potvrđuje ranije nalaze (Koppenol 1998) da je NADH oksidovan od strane peroksintrita koji nastaje u reakciji proizvoda dismutacije NO, preciznije od nitroksil vrste, i kiseonika. Proteinski DNIC, kao najstabilniji DNIC, posle prvog bolusa rastvora NO neposredno formira najmanju



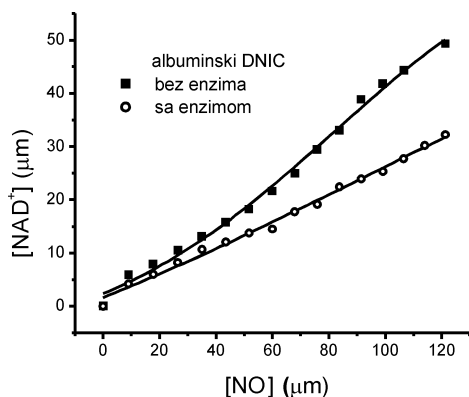
Slika 3. Kinetika nastajanja NAD^+ oksidovanjem NADH u zavisnosti od koncentracije NO u rastvoru cisteinskih DNI kompleksa bez enzima (kvadratići) i u prisustvu enzima (kružići) u HEPES puferu pH 7.4.

Figure 3. Kinetics of NAD^+ formation depending on concentrations of NO in cysteine DNIC solutions with MnSOD (circles) and without MnSOD (squares). Experiments were done in 50 mM HEPES buffer pH 7.4.



Slika 4. Kinetika nastajanja NAD^+ oksidovanjem NADH u zavisnosti od koncentracije NO u rastvoru glutatonskih DNI kompleksa bez enzima (kvadratići) i u prisustvu enzima (kružići) u HEPES puferu pH 7.4.

Figure 4. Kinetics of NAD^+ formation depending on concentrations of NO in glutathione DNIC solutions with MnSOD (circles) and without MnSOD (squares). All experiments were done in 50 mM HEPES buffer pH 7.4.



Slika 5. Kinetika nastajanja NAD^+ oksidovanjem NADH u zavisnosti od koncentracije NO dodate albuminskim DNI kompleksima bez enzima (kvadratići) i u prisustvu enzima (kružići) u HEPES puferu pH 7.4.

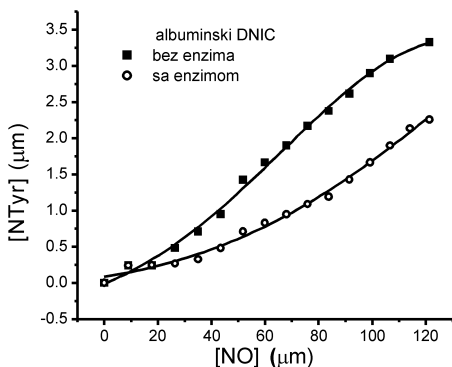
Figure 5. Kinetics of NAD^+ formation depending on concentrations of NO in albumin DNIC solutions with MnSOD (circles) and without MnSOD (squares). All experiments were done in 50 mM HEPES buffer pH 7.4.

koncentraciju peroksinitrira što rezultuje i najnižom koncentracijom NAD^+ . Najniža produkcija NAD^+ iz proteinskih DNIC prouzrokovana je najvišom stabilnošću ovih kompleksa jer se proizvodi najmanja količina peroksinitrira. Na drugoj strani imamo cisteinske i glutationske komplekse koji na početku formiraju mnogo veću količinu OONO^- . Ovo se objašnjava manjom stabilnošću niskomolekulskih DNI kompleksa u odnosu na albuminske komplekse. Relativni odnos količina formiranog peroksinitrira iz različitih DNI kompleksa pri istim koncentracijama dodatog NO ostaje isti nezavisno od toga da li se u rastvoru nalazio enzim MnSOD ili ne. Razlika je u apsolutnoj količini formiranog peroksinitrira. Razlog ovome je činjenica da enzim deluje tako što iz sistema izvlači superoksid anjon-radikal i smanjuje formiranje peroksinitrira, a samim tim i umanjuje oksidaciju NADH te proporcionalno tome nastaje i srazmerno manja količina NAD^+ . Međutim, dodavanjem većeg broja bolusa prava priroda kompleksa dolazi do izražaja. Nestabilni cisteinski i u ovom slučaju još nestabilniji glutationski kompleksi, koji u početku indukuju najviše peroksinitrira, vremenom se (odnosno brzom potrošnjom SH grupa) raspadaju i njihova dismutaciona sposobnost smanjuje se uslovljavajući da se i ukupna količina produkovanog peroksinitrira vremenom tek neznatno povećava. Al-

buminski kompleksi ostaju stabilni i posle 15 dodatih bolusa (kumulovano 0.027 mol u 2 mL reakcionog rastvora) pa se njihova dismutaciona sposobnost ne smanjuje, time direktno utičući na povećanje koncentracije produkovanog peroksinitrira.

Kako posle prvog tako i posle petnaestog bolus dodatka azot-monoksida u rastvor koji pored DNI kompleksa sadrži i enzim, produkcija NAD^+ , u odnosu na produkciju NAD^+ u rastvorima bez enzima, manja je za 30-40%. Ovo direktno pokazuje koliki je protektivni značaj enzima MnSOD koji uklanja superoksid anjon-radikal, za koji je pretpostavljeno da nastaje kao međuproizvod u mehanizmu koji je predstavljen u teorijskom delu. Smanjena produkcija superoksid anjon-radikala direktno smanjuje i količinu formiranog peroksinitrira jer stvaranje peroksinitrira direktno zavisi od stvorenog O_2^- . Na slici 2 se vidi i da je sposobnost dismutacije kompleksa, koja direktno utiče na količinu peroksinitrira, posle prvog i posle petnaestog bolusa potpuno obrnuta. Naime, nakon prvog bolusa azot-monoksida najviše OONO^- bilo je formirano iz glutationskih i cisteinskih pa tek onda iz albuminskih kompleksa, dok je posle 15 bolusa proteinski kompleks pokazao višu efikasnost produkcije od niskomolekulskih kompleksa.

Takođe, na spektrima proteinskih kompleksa detektovane su apsorbance i na 420 nm koje u potpunosti odgovaraju apsorpciji tirozinskih ostataka govedeg serum albumina. Na ovaj način je nedvosmisleno potvrđena pretpostavka da je peroksinitrir u stanju da preko brojnih intermedijera nitruje tirozin i formira nitrotirozin (NTyr). Koncentracije nitrotirozina rastu sa vremenom, odnosno sa dodatom količinom NO (slika 6) jer dodata količina NO odgovara količini peroksinitrira. Kada se uporede rastuće koncentracije nitrotirozina u rastvorima albuminskih DNI kompleksa sa i bez enzima, ponovo se može zaključiti da je nastala količina nitrotirozina u prisustvu enzima manja od one koja se formirala samo u HEPES puferu bez enzima. Kao i u slučaju odnosa koncentracija NAD^+ u uzorku sa i bez enzima, i koncentracija NTyr u uzorku sa i bez enzima manja je za oko 30-40%. Ovo još jednom direktno pokazuje da enzim, vršeći ulogu uklanjanja superoksid anjon-radikala iz rastvora, smanjuje ukupnu količinu formiranog NTyr zbog toga što direktno umanjuje koncentraciju peroksinitrira preko jedinog mogućeg mehanizma (navedenog u uvodu),



Slika 6. Kinetika nastajanja nitrotirozina nitrovanjem tirozinskih ostataka u proteinskim DNI kompleksima u zavisnosti od koncentracije NO u rastvor proteinskog kompleksa u HEPES puferu pH 7.4.

Figure 6. Kinetics of nitrotyrosine formation, that is caused by nitration of tyrosine residues in protein DNICs, depending on NO concentration. These experiments were done in 50 mM HEPES buffer pH 7.4 with MnSOD (circles) and without MnSOD (squares).

odnosno govori nam da mehanizam formiranja peroksinitrita preko NO i O_2^- zaista postoji.

Na slici 2 prikazana je sumirana produkcija NAD^+ iz različitih dinitrozil-gvožđe kompleksa posle prvog i petnaestog bolusa i sa i bez prisustva enzima. Slika 2 takođe prikazuje i totalnu produkciju peroksinitrita koja je obrnuto proporcionalna koncentraciji NADH jer peroksinitrit oksiduje NADH pa je odnos koncentracija ove dve supstance obrnuto proporcionalan. Nezavisno od toga da li se u rastvoru nalazio enzim ili ne, očigledno je da se peroksinitrit formira u svim slučajevima i da je posle dodatka 15 bolusa rastvora NO najefikasniji u formiranju $OONO^-$ proteinski DNIC, dok se vremenom cisteinskim i glutationskim kompleksima, koji u početku indukuju najveće količine peroksinitrita, smanjuje sposobnost dismutacije, a samim tim i ukupna produkcija peroksinitrita.

Zaključak

Na osnovu svih izloženih rezultata može se tvrditi da se peroksinitrit formira tokom DNIC posredovane dismutacije NO. Iz rezultata je, takođe, očigledno da ligand koji formira kompleks direktno utiče na dismutacionu sposobnost. Najnestabilniji

kompleksi, koji ujedno produkuju i najmanje peroksinitrita, jesu cisteinski i glutationski. Sa druge strane, proteinski kompleksi formirali su najvišu količinu peroksinitrita i samim tim pokazali se kao najstabilniji. U albuminskim kompleksima detektovano je i postojanje nitrotirozina koji je nastao nitrovanjem proteinskih ostataka tirozina od strane formiranog peroksinitrita.

Takođe, pokazano je da i mehanizam nastajanja $OONO^-$ preko NO i O_2^- zaista postoji. Ovo je potvrđeno umanjenom oksidacijom NADH, ali i stvaranjem nitrotirozina u manjim količinama, u svim slučajevima kada je u sistemu prisutan enzim MnSOD koji uklanja O_2^- i time umanjuje ukupnu količinu formiranog peroksinitrita koji oksiduje NADH i nitruje tirozinske ostatke. U narednim eksperimentima ostaje da se otkrije prava fiziološka priroda dismutacije azot-monoksida posredstvom različitih DNI kompleksa, tj. da se ukaže na to koji od efekata je predominantniji, protektivni ili destruktivni.

Literatura

- 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.
- Fridovich I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**: 239.
- Fridovich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**: 1.
- 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.
- Groves J. T. 1999. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**: 226.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: University Press
- Huie R. E., Padmaja S. 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.*, **18**: 195.
- Koppenol W. H. 1998. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.*, **25**: 385.

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.

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

Prokopović V. 2005. Ispitivanje uticaja različitih liganada na dinitrozil gvožđe kompleksom (DNIC) posredovanu dismutaciju azot monoksida (NO). *Petličke sveske*, **58**: 203.

Vladimir Prokopović

Efficiency of Peroxynitrite (OONO⁻) Production from Various Dinitrosyl Iron Complexes (DNIC) under Aerobic Conditions

Nitric oxide (NO) is a very important intracellular messenger that regulates numerous processes in the human organism, whereas its overproduction contributes to the pathology of a variety of diseases.

Pathological effects are mainly related to the formation of reactive nitrogen species (RNS) such as peroxynitrite (ONOO⁻), that is thought to be formed in the reaction of NO with superoxide anion radical O₂⁻. Peroxynitrite, which is a potent oxidative and nitrating agent, is considered to be the major mediator of NO⁻-induced cytotoxicity. Nitroxyl (NO⁻), as well as nitrosonium (NO⁺), is a product of dinitrosyl iron complex (DNIC)-assisted NO dismutation. This paper examines and compares the efficiency of peroxynitrite production from various DNICs under aerobic conditions. Different thiols were used as ligands (Cysteine – Cys, Glutathione – GSH and bovine serum albumin – BSA). Independently from the ligand type, peroxynitrite formation was detected in all samples after the first addition of NO. Cysteine and glutathione complexes were shown to induce diminutive peroxynitrite amounts compared to albumin complexes, which produced the highest amount of ONOO⁻. All experiments were done simultaneously in conditions with and without the MnSOD enzyme that decomposes O₂⁻ required for OONO⁻ formation. The obtained results confirmed the existence of mechanism of OONO⁻ formation from NO⁻ and O₂ via reaction of NO with O₂⁻.