

## Ispitivanje efekta vitamina C i cisteina na oslobađanje azot-monoksida iz natrijum-nitroprusida

---

Azot monoksid (NO) je važan signalni molekul koji u organizmu reguliše veliki broj procesa. U tu svrhu brojne ćelije sintetišu NO koji se koristi za regulaciju krvnog pritiska, neurotransmisiju i agregaciju trombocita. Natrijum nitroprusid (SNP) se dugi niz godina koristi u terapiji akutne hipertenzije, zahvaljujući svom NO donorskom svojstvu, međutim mehanizam njegovog delovanja još uvek je kontraverzan. U ovom radu smo ispitivali efekte vitamina C i cisteina na oslobađanje azot monoksida iz natrijum nitroprusida. Rezultati dobijeni ispitivanjem oslobađanja NO iz natrijum nitroprusida u in vitro uslovima, jasno su ukazali da SNP tokom svog spontanog raspadanja ne oslobađa samo NO već verovatno većim delom  $NO^+$  (prividna konstanta brzine za oslobađanje NO je  $4.16 \times 10^{-4}$  M/min). Cistein i askorbat ubrzavaju oslobađanje NO iz SNP (prividne konstante brzine za reakciju oslobađanja NO posredovanu cisteinom i vitaminom C iznose  $7.61 \times 10^{-3}$  M/min i  $4.81 \times 10^{-3}$  M/min respektivno), ali ne u stehiometrijskoj reakciji kao što je očekivano. Detaljniji mehanizam njihovog dejstva zahtevao bi intenzivniju studiju ovog problema. Rezultati dobijeni u ovom radu imaju potencijalni fiziološki značaj, jer bi upotrebom cisteina ili vitamina C, ili kombinacijom oba sa SNP mogla biti redukovana doza primenjenog NO donora, uz dobjanje istog efekta, a dramatičnog smanjenja toksičnosti usled oslobađanja cijanida u krvotok

---

### Uvod

Azot monoksid je za poslednjih dvadesetak godina prešao put od opasnog polutanta životne sredine do fundamentalnog fiziološkog medijatora i

efektora, za kojeg je pokazano da se sintetizuje u svim živim vrstama, od bakterija do kičmenjaka. Azot monoksid se endogeno sintetizuje u specijalizovanim tkivima iz L-arginina pomoću enzima NO sintaza (NOS), a oslobađa konstitutivno i inducibilno obavljajući svoje funkcije kao fiziološki regulator niza procesa (Moncada *et al.* 1991).

Furchgott i Zawadzki (1980) su prvi pokazali konstrikciono dejstvo acetilholina na vaskularne glatke mišiće, a 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 1989; Moncada i Higgs 1993; Arnal *et al.* 1999).

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 ubranu aterogenezu kod životinja (Cayatte *et al.* 1994).

U skladu sa značajem koji ima po život, nakon njegove identifikacije kao EDRF, krenulo se sa intenzivnim radom na traganju za fiziološki relevantnim donorima NO koji bi se koristili za lečenje hipertenzije. Dva takva, poznata više od stotinu godina, su bili nitroglicerini i natrijum nitroprusid, ujedno i jedina dva, za sada korišćena u kliničkoj praksi (Stamler & Feelisch 1996).

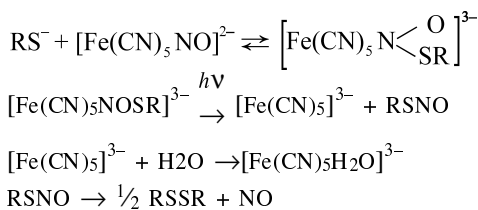
Natrijum nitroprusid (SNP) –  $Na_2[Fe(CN)_5NO]$  se koristi kao lek izbora u akutnoj hipertenzivnoj krizi još od 1929. kada je prvi put primećen njegov hipotenzivni efekat na arterije.

---

Ana Mijušković (1987), Nikšić, Crnogorska  
Po b/61, učenica 4. razreda Gimnazije “Stojan  
Cerović” u Nikšiću

MENTOR: Miloš Filipović, naučni saradnik,  
Hemijski fakultet u Beogradu

SNP je neorganski kompleks sa gvoždem u fero obliku za koji je vezan NO (formalno kao NO<sup>+</sup>). Spontano se raspada dajući NO. Pri svom raspadanju on takođe oslobađa i cijanidne jone (CN<sup>-</sup>) koji su potencijalno toksični za ćelije. Bez obzira na intenzivne studije koje se bave ovim donatorom mehanizam oslobađanja NO iz SNP još uvek je nepoznat (Feelisch i Stamler 1996; Yamamoto i Bing 2000). Kada se meri produkcija NO u *in vitro* uslovima ona je daleko manja od fiziološkog efekta koji se postiže. Neki autori misle da bi fiziološki efekat nitroprusida mogao poticati od njegove interakcije sa tiolima prisutnim u plazmi, pa bi u reakcijama transnitrozilovanja bilo pojačano NO donorsko dejstvo (Feelisch i Stamler 1996, Butler i Megson 2002).



Dalje, brojni efekti koji potiču od SNP se odvijaju preko mehanizma nitrozilacije, koji podrazumeva transfer NO<sup>+</sup>, a ne NO, što je i u skladu sa nekim nalazima da je SNP pretežno NO<sup>+</sup> donor (Butler i Megson 2002).

**Cilj** ovog rada bio je da ispita efekte cisteina (Cys) i vitamina C (AsCH<sup>-</sup>) na produkciju NO iz SNP. Cistein je u ovoj studiji služio kao model sistem za reakciju sa tiolima, dok je vitamin C bio redukujuće sredstvo za NO<sup>+</sup> do NO. Na ovaj način bi se dobio uvid u potencijale reakcije koje se dešavaju u *in vivo* uslovima, ali i otvorilo pitanje kombinovanja ovih supstanci sa SNP u cilju povećanja njegove efikasnosti, a smanjenja doze, tj. toksičnosti.

## Matrijal i metode

U radu su korišćene sledeće supstance: vitamin C, cistein, 50 mM kalijum fosfatni puffer i natrijum nitroprusid. Supstance su nabavljene od Sigmee.

Hemoglobin je dobijen po standardnom postupku iz humane krvi. Ukratko, krv sa antikoagulanom (natrijum citrat) je centrifugovana 5 min na 3000 o/min, nakon čega je odvojena plazma, a talog eritrocita je ispran dva puta hladnim (4°C) fiziološkim rastvorom (0.9% NaCl). Hemoliza eritrocita i odvajanje membrana je vršeno dodatkom dve

zapremine destilovane vode i jedne zapremine hloroforma uz energično mešanje na Vortex-mešalici. Membrane su odvojene centrifugovanjem hemolizata (4000 o/min), a rastvor hemoglobina je odvojen i podvrgnut dijalizi (4°C) naspram Mili-Q vode tokom 24 sata uz višestruku izmenu vode. 40 μM rastvor hemoglobina je korišćen za oksihemoglobinski esej.

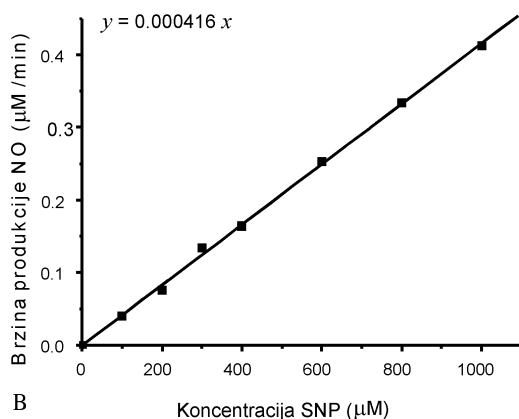
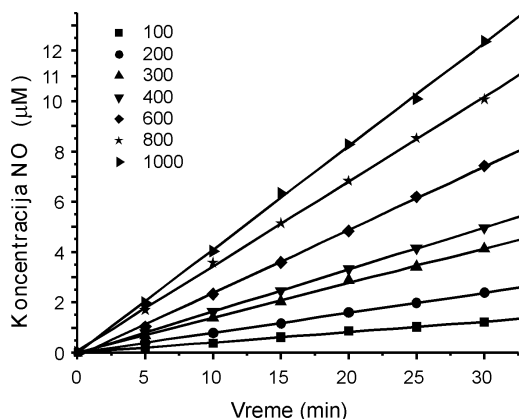
Oksihemoglobinski esej se zasniva na oksidaciji hemoglobina do methemoglobina, u reakciji sa oslobođenim NO, što se odražava na spektralne karakteristike rastvora. U rastvor oksihemoglobina dodavan je SNP u opsegu koncentracija 100-1000 μM, odnosno 400 μM SNP i Cys ili AsCH<sup>-</sup> u opsegu koncentracija 100-600 μM. Snimani su diferencijalni spektri, a koncentracija oslobođenog NO preračunata na osnovu razilke u apsorbcama na 401 i 410 nm ( $E = 39 \text{ mM}^{-1}$ ).

## Rezultati i diskusija

Spontanano oslobađanje NO iz SNP u *in vitro* uslovima u kalijum fosfatnom puferu na pH 7.4 je praćeno oksihemoglobinskim esejem. Primenjujući ekstinkcioni koeficijent od 39 m/M za razliku u apsorbcama na 401 i 410 nm, određena je brzina produkcije NO iz SNP u opsegu koncentracija od 100-1000 μM (slika 1A). Iz grafika zavisnosti brzine od koncentracije SNP (slika 1B) određena je prividna konstanta brzine produkcije NO iz SNP i ona iznosi  $k = 4.16 \times 10^{-4} \text{ M min}^{-1}$ . Ova vrednost je u dobrom slaganju sa podacima koje su dobili Smith i Dasgupta (2001).

Dobijeni rezultati još jednom su potvrdili da je oslobađanje NO iz SNP *in vitro* daleko manje od onog nađenog *in vivo* (Butler i Megson 2002) ukazujući na to da se pri raspadanju NO oslobađa samo jednim delom dok se verovatno veći deo oslobađa u vidu NO<sup>+</sup> koji u vodi biva odmah preveden u nitrit.

Da bi potvrdili ovu hipotezu, a u cilju poboljšanja NO donorske efikasnosti SNP, u 400 μM rastvor natrijum nitroprusida su dodavani cistein ili vitamin C. Slika 2 sumira rezultate koncentracijskog efekta obe supstance na kinetiku oslobođenog NO. Sa slike se vidi da obe supstance značajno povećavaju količinu oslobođenog azot monoksida, pri čemu je efikasnost cisteina u ovom procesu znatno veća. Iz nagiba pravih mogu se preračunati prividne kon-

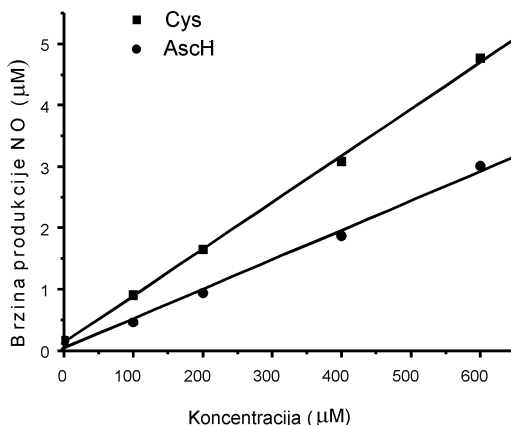


Slika 1. Oslobođanje NO iz SNP praćeno oksihemoglobinskim esejem. A) Produkcija NO tokom vremena iz SNP. B) Brzina produkcije azot monoksida u zavisnosti od koncentracije dodatog SNP. Nagib prave predstavlja prividnu konstantu brzine.

Figure 1. NO release from SNP was measured by oxyhemoglobin assay. A) Rate of NO release from SNP depending on time. B) NO production rate depending on SNP concentration. The slope represents apparent rate constant.

stante brzine za reakciju cisteina i vitamina C sa SNP koje iznose  $7.61 \times 10^{-3} \text{ Mmin}^{-1}$  i  $4.81 \times 10^{-3} \text{ Mmin}^{-1}$  respektivno.

Efekat obe supstance se pokazao linearnim na oslobođanje NO u širokom opsegu koncentracija. Zanimljivo je da i pri koncentracijama većim od koncentracije dodatog SNP dolazi do povećanja produkcije NO, ukazujući da reakcija nije jednostavno



Slika 2. Efekat cisteina i vitamina C na produkciju NO iz SNP. U 400 M rasvort SNP dodavane su koncentracije Cys i AsCH date na x-osi. Nagib pravih predstavlja prividnu konstantu brzine.

Figure 2. The effects of vitamin C and Cys on NO release from SNP. Cys and AsCH were mixed with SNP solution and their concentrations are represented on the x-axis.

stehiometrijska, već verovatno kompleksnija nego što je očekivano.

Veća brzina dobijena za cistein može se objasniti transnitrozilacijom, tj. prenosom  $\text{NO}^+$  grupe sa SNP na Cys uz istovremeno stvaranje nitrozil cisteina (CysNO). Ova reakcija bi mogla biti stehiometrijska, a da ono što mi vidimo kao oslobođanje NO potiče iz CysNO. CysNO je poznat kao nestabilna supstanca koja oslobađa NO (Stamler i Feelisch 1996), posebno u prisustvu jona metala, koji su u našem slučaju neminovnost usled raspadanja SNP. Dalje, reakcija sa Cys bi mogla da objasni veću efikasnost nađenu u *in vivo* eksperimentima, s obzirom na sveprisutnost SH grupa u cirkulaciji.

S druge strane vitamin C, po nekim autorima, može da redukuje  $\text{NO}^+$  do NO sam se oksidujući do askorbil radikala. Međutim ova reakcija se nije pokazala kao stehiometrijska na primeru redukcije  $\text{NO}^+$  oslobođenog iz zakišelnog nitrita (van Dahn 1963).

Bez obzira na brojna pitanja koja rezultati otvaraju, oni takođe pružaju moguće rešenje za problem toksičnosti koji se javlja prilikom upotrebe SNP. Naime, upotreba SNP u kombinaciji sa Cys ili

AscH<sup>-</sup> ili oba, mogla bi da redukuje koncentraciju primenjenog donora i do deset puta, uz postizanje istih efekata. Smanjenje koncentracije SNP smanjilo bi količinu oslobođenog CN<sup>-</sup>, pri čemu ni Cys ni AscH<sup>-</sup> ne bi imali štetne efekte po ćelije.

## Zaključak

Rezultati dobijeni ispitivanjem oslobađanja NO iz natrijum nitroprusida u *in vitro* uslovima, jasno su ukazala da SNP tokom svog spontanog raspadanja ne oslobađa samo NO već verovatno većim delom NO<sup>+</sup>. Cistein i askorbat ubrzavaju oslobađanje NO iz SNP, ali ne u stehiometrijskoj reakciji kao što je očekivano. Detaljniji mehanizam njihovog dejstva zahtevao bi intenzivniju studiju na ovom problemu. Rezultati dobijeni u ovom radu imaju potencijalni fiziološki značaj. Upotreba cisteina ili vitamina C, ili kombinacijom oba sa SNP mogla biti redukovana doza primenjenog NO donora, pri čemu bi se dobio isti efekat. Značajno smanjenje toksičnosti koja nastaje oslobađanjem cijanida u krvotok

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se mentoru Milošu Filipoviću na pomoći prilikom izrade ovog rada.

## Literatura

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.

Butler A. & Megson I. 2002. Non-heme iron nitrosyls in biology, *Chem. Rev.*, **102**: 1155.

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.

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.

Feelisch M. & Stamler J. S. 1996. NO donors. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J. S.). Wiley, pp. 4-18.

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.

Ignarro L. J. 1989. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.*, **65**: 1.

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

Palmer R. M.; Ferrige A. G.; Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524.

Radomski M.W., Zakar T., & Salas E. 1996. Nitric oxide in platelets. *Methods Enzymol.*, **269**: 88.

Smith J. N. & Dasgupta T. 2001. Mechanism of nitric oxide release from nitrovasodilators in aqueous solution. *J. Inorg Biochem.*, **87**: 165.

Yamamoto T. & Bing R. 2000. Nitric oxide donors. *Experimental biology and medicine*. **225**: 200.

---

Ana Mijušković

## The Effects of Vitamin C and Cysteine on NO Release from Sodium Nitroprusside

Nitric oxide (NO) plays important roles as a regulator of physiological functions in the cardiovascular, immune, and nervous systems. However, an imbalance in NO production is implicated in many diseases including hypertension, arteriosclerosis, ischemia-reperfusion injury, diabetes and neurodegenerative disorders. NO is generated in biological tissues by specific nitric oxide synthases (NOS) which metabolize arginine to citrulline with the formation of NO. Nitroprusside (SNP) has a special place among iron-nitrosyl complexes with biological activity. It is a highly effective hypotensive agent with few undesirable side effects, which include cyanide release. In view of what we now know about the biological effect of NO, it is generally assumed that nitroprusside is hypotensive because it is an NO donor drug. However, the complete chemistry lying behind its NO donating properties remain unclear so

far. In this study we investigated the effect of vitamin C and cysteine on NO release from nitroprusside. NO release was measured by oxyhemoglobin assay, which has been proved to be efficient and most used for this type of experiments. From the rates of released NO we calculated the apparent rate constant for this reaction ( $k = 4.16 \times 10^{-4} \text{ Mmin}^{-1}$ ) finding it in good agreement with those described in literature. However, this result clearly indicated that SNP is not only an NO donor, but most likely an  $\text{NO}^+$  donor as well. Following the reaction with cysteine (which can react with  $\text{NO}^+$  yielding CysNO) or

vitamin C (which can reduce  $\text{NO}^+$  to NO) we found an increase of NO released from SNP with apparent rate constants  $7.61 \times 10^{-3} \text{ Mmin}^{-1}$  and  $4.81 \times 10^{-3} \text{ Mmin}^{-1}$ , respectively. Even though the results open a lot of questions to be solved concerning the mechanism of the observed phenomenon, they also offer a possible physiologically relevant solution for SNP induced toxicity. Mixing of SNP with vitamin C, or cysteine, or both prior to its application could increase the amount of released NO several times allowing the concentration of applied drug to be decreased, thus leading to lower cyanide toxicity.