

**NITROKSYL (HNO/NO⁻) – CZĄSTECZKA
O POTENCJALNYM ZNACZENIU
FARMAKOLOGICZNYM**

**NITROXYL (HNO/NO⁻) – THE MOLECULE OF
PHARMACOLOGICAL SIGNIFICANCE**

**Aleksandra Augustyniak¹, Janusz Skolimowski²,
Renata Kontek¹, Alina Błaszczyk^{1*}**

¹ *Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin,
Uniwersytet Łódzki,*

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

² *Katedra Chemii Organicznej, Uniwersytet Łódzki,*

ul. Tamka 12, 91-403 Łódź

**e-mail: ablasz@biol.uni.lodz.pl*

Abstract

Wstęp

1. Nitroksyl jako związek z grupy tlenków azotu
2. Powstawanie nitroksylu w układach biologicznych
3. Donory nitroksylu
4. Detekcja nitroksylu
5. Właściwości biologiczne nitroksylu
6. Znaczenie farmakologiczne nitroksylu

Podsumowanie

mgr Aleksandra Augustyniak, doktorantka w Pracowni Cytogenetyki, Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. Dyplom magistra uzyskała w 2010 r. i obecnie kontynuuje naukę na studiach doktoranckich. W swojej pracy naukowej zajmuje się badaniem właściwości biologicznych nitroksylu. Celem pracy badawczej jest analiza cytotoksycznych, genotoksycznych i mutagennych właściwości tej cząsteczki generowanej przez sól Angeli'ego.

dr Janusz Skolimowski, starszy wykładowca w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego. Dorobek naukowy obejmuje liczne publikacje w czasopismach międzynarodowych (45), komunikaty na konferencjach krajowych i zagranicznych (75), patenty (6), współautorstwo 2 rozdziałów w monografii. Zainteresowania naukowe dotyczą rodników nitroksylowych, pochodnych hydrocyklicznych fosforu, naturalnych i syntetycznych antyoksydantów, leków przeciwnowotworowych, związków acetylenowych oraz nowych biomateriałów mających zastosowanie w biomedycynie. Wielokrotnie odbywał staże naukowe na uniwersytetach amerykańskich, francuskich i japońskich. Uzyskał nagrody naukowe Ministra Edukacji Narodowej, Rektora Uniwersytetu Łódzkiego oraz Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Specjalność naukowa: chemia organiczna

dr Renata Kontek, adiunkt w Pracowni Cytogenetyki, Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. Prowadzone badania dotyczą właściwości biologicznych leków przeciwnowotworowych stosowanych klinicznie i nowo zsyntetyzowanych związków o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym a także powszechnie wykorzystywanych antyoksydantów, stosowanych w połączeniu z badanymi cytostatykami. Specjalność naukowa: genetyka, cytogenetyka.

dr hab. Alina Błaszczyk, prof. nadzw. Uniwersytetu Łódzkiego w Pracowni Cytogenetyki, Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. W swojej pracy naukowej przez wiele lat zajmowała się badaniem w warunkach *in vivo* i *in vitro* mutagenności stosowanych powszechnie pestycydów fosforoorganicznych, czego efektem była praca doktorska pt. „Wpływ insektycydów na powstawanie aberracji chromosomowych i mutacji genowych” (1987). Tematem badań w następnych latach była analiza wpływu antyoksydantów na genotoksyczne efekty działania leku przeciwnowotworowego – chlorometyny, a także analiza osobniczej wrażliwości na działanie tego związku. W ostatnich latach zainteresowania naukowe skupiały się na analizie właściwości biologicznych etoksyquinu – antyoksydantu stosowanego w paszach i karmach dla zwierząt. Wyniki tych badań były tematem rozprawy habilitacyjnej zatytułowanej „Właściwości biologiczne 1,2-dihydro-6-etoksy-2,2,4-trimetylocholinoliny oraz nowych potencjalnych antyoksydantów” (2008). Specjalność naukowa: genetyka, cytogenetyka.

ABSTRACT

Nitrogen compounds, as an essential component of many reactions occurring in living organisms, become the object of an extensive research. These compounds became the focus of interest after the properties of nitric oxide, currently the best known nitrogen oxide, had thoroughly been studied [1–3]. Recently, particular attention has been paid to nitroxyl (HNO/NO⁻), which is the product of one-electron reduction of NO[•] [4]. Formation of nitroxyl *in vivo* is still controversial. It seems that this compound could be formed by the reaction of S-nitrosothiols with other thiol proteins (e.g. GSH), directly through the nitric oxide synthetase (NOS), through the oxidation of hydroxylamine by the peroxidase activity of heme proteins or as a result of reduction of nitric oxide NO[•] [5, 6]. Nitroxyl is a liable compound due to dimerization, so it is necessary to use its donors in experiments. Angeli's salt which forms HNO at physiological pH is the most commonly used donor [7]. Moreover, Piloty's acid, cyanamide, diazonium diolates or a group of acyloxy nitroso compounds are also used. There are some difficulties with detection of nitroxyl in biological systems. So far, nitroxyl was indirectly identified by detection of N₂O, a product of HNO dimerization. Presently, nitroxyl is an object of intensive studies aiming at finding techniques of its direct detection. Recently two such techniques have been designed: one using the reaction of HNO with triarylphosphines, and the other with BOT1 (staining agent) complexed with copper ions, which gives fluorescent signals revealing HNO in living cells [8, 9]. Nitroxyl turned out to have great pharmacological potential [10, 11]. It was demonstrated that this compound affected the activity of many proteins reacting with their thiol groups [12, 13]. Moreover, HNO/NO⁻ influences the contractility of blood vessels and therefore has inotropic and lusitropic effects on myocardium [14]. Nitroxyl seems to be very promising in treating cancerous diseases as it inhibits the activity of an enzyme involved in the process which is the most important for cancer cells – glycolysis [15].

Keywords: nitroxyl, Angeli's salt, nitroxyl donors, nitric oxide

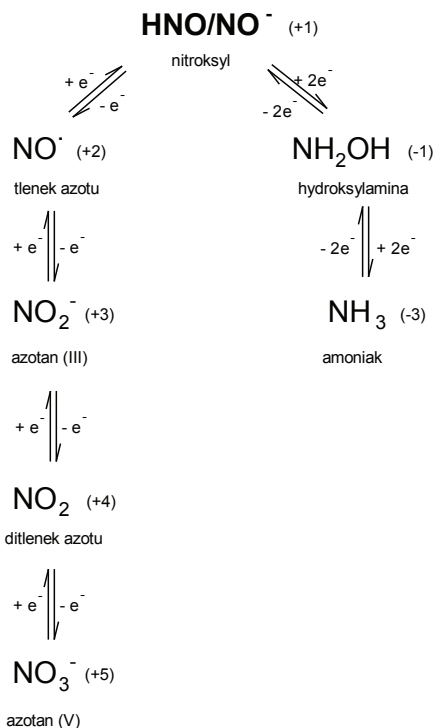
Słowa kluczowe: nitroksyl, sól Angeli'ego, donory nitroksylu, tlenek azotu

WSTĘP

Związki powstające z połączenia atomów tlenu i azotu stanowią ważny składnik wielu reakcji zachodzących w komórkach, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. Na tlenki azotu zwrócono uwagę dzięki badaniom nad nitrogliceryną, którą przez wiele lat stosowano w kardiologii w celu likwidowania bólów wieńcowych nie znając jej mechanizmu działania [16, 17]. Dopiero pod koniec lat 70. stwierdzono, że rozszerzenie naczyń krwionośnych i ustąpienie objawów bólowych następuje na skutek metabolicznej przemiany nitrogliceryny z wytworzeniem tlenku azotu. Badania doprowadziły do odkrycia że śródbłonkowy czynnik rozluźniający powodujący rozkurcz mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych (ang. *endothelium-derived relaxing factor*, EDRF), którego wytwarzanie w organizmie ludzkim zostało odkryte pod koniec lat 80., jest tlenkiem azotu [1–3]. Zainicjowane wówczas intensywne badania pokazały, że bierze on udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych i uczestniczy w wielu fizjologicznych procesach [18, 19]. Jedną z najważniejszych funkcji tej cząsteczki jest rozkurczające działanie na naczynia krwionośne (Tab. 1) [20]. Liczne odkrycia naukowe związane z fizjologiczną rolą tlenku azotu spowodowały, że w 1992 roku został on ogłoszony „cząsteczką roku” przez „Science”, prestiżowy, amerykański tygodnik naukowy [21]. W 1998 roku trzech amerykańscy naukowcy Robert F. Furchgott, Louis Ignarro i Ferid Murad za wyjaśnienie roli tlenku azotu jako środka działającego na mięśnie gładkie układu krwionośnego uhonorowani zostali Nagrodą Nobla. W latach późniejszych przedmiotem wielu badań były także inne produkty utleniania tlenku azotu, takie jak: nadtlenoazotyn (ONOO^-), dwutlenek azotu (NO_2), tritlenek azotu (N_2O_3). W ostatnich latach zwrócono uwagę na kolejny związek azotowy – nitroksyl (HNO/NO^-), który powiązany jest z tlenkiem azotu (NO^*) poprzez jego jednoelektronową redukcję i protonację. Cząsteczce tej przypisuje się ważne biologicznie funkcje, takie jak działanie antykarcinogenne oraz, podobnie jak w przypadku tlenku azotu NO^* , relaksacyjne oddziaływanie na naczynia krwionośne [22]. Porównawcze badania nad cytotoxycznością HNO/NO^- i tlenku azotu NO^* , a także wpływem glutationu (GSH) na cytotoxyczność HNO/NO^- wykazały jednak, że te dwie cząsteczki (tlenek azotu i nitroksyl) mogą, oprócz podobnego efektu końcowego wywieranego na naczynia krwionośne, wykazywać w systemach biologicznych również odmienne działania [23, 24]. Odkrycia te dały impuls do podejmowania badań dotyczących HNO/NO^- – niedocenianej wcześniej formy tlenku azotu. Badania te dotyczą obecnie przede wszystkim mechanizmów powstawania HNO w organizmie człowieka i identyfikacji markerów pozwalających na wykrywanie tej cząsteczki w systemach biologicznych, a także syntezy nowych jej donorów, których właściwości umożliwiłyby ich zastosowanie w praktyce klinicznej.

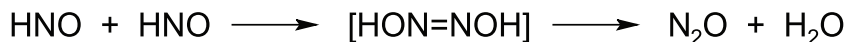
1. NITROKSYL JAKO ZWIĄZEK Z GRUPY TLENKÓW AZOTU

Terminem nitroksyl określana jest cząsteczka HNO (znana jest także jako woderek nitrozyłu), a także jej zdeprotonowana forma NO⁻. Są to najprostsze cząsteczki z azotem na +1 stopniu utlenienia, produkty jednoelektronowej redukcji tlenku azotu (+2) (Schemat 1).



Schemat 1. Schemat redoks dla tlenków azotu
 Scheme 1. Redox scheme for the nitric oxides

Nitroksyl jest cząsteczką wysoce reaktywną, co powoduje, że badania nad jego biologicznymi i fizycznymi właściwościami nie są łatwe. Ulega on bowiem szybkiej, nieodwracalnej dimeryzacji (Schemat 2), w wyniku czego powstaje pośrednio labilny kwas, który ulega dehydratacji uwalniając wodę i podtlenek azotu.



Schemat 2. Reakcja dimeryzacji nitroksylu
 Scheme 2. Dimerization of nitroksyl

Powstawanie podtlenku azotu umożliwia pośrednie wykrywanie obecności nitroksylu w systemach biologicznych po zastosowaniu separatywnej chromatografii gazowej lub spektrometrii gazowej [25]. Właściwości chemiczne nitroksylu w porównaniu z właściwościami tlenku azotu (+2) zestawiono w Tabeli 1. Pierwsze

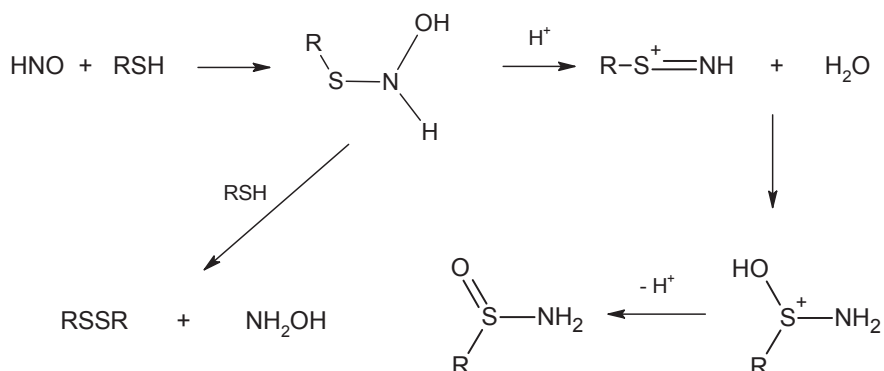
doniesienia o kwasowości HNO mówiły, że wartość pKa wynosi 4,7, co wskazywało na to, że jest to związek kwasowy a jego główną postacią w warunkach fizjologicznych jest anion NO^- [26]. Późniejsze badania wykazały jednak, że wartość pKa wynosi 11,4 [25, 27] – w fizjologicznym zakresie pH dominującą formą nitroksylu jest więc sprotonowana forma $\text{NO}^- - \text{HNO}$ [28].

Tabela. 1. Najważniejsze właściwości i aktywność biologiczna nitroksylu (HNO/NO^-) w porównaniu z tlenkiem azotu, NO^\bullet
Table1. The most important properties and biological activity of nitroxyl (HNO/NO^-) in comparison to nitric oxide, NO^\bullet

HNO/NO-	NO•
Właściwości chemiczne i biochemiczne	
<ul style="list-style-type: none"> – wysoka reaktywność – czas życia wynosi mniej niż 0,1 s – w reakcji z grupami hemowymi preferuje grupy żelazowe (Fe^{3+}) a nie żelazawe (Fe^{2+}) – po reakcji HNO z O_2 powstają oksydanty inne niż ONOO⁻, nie reaguje z $\cdot\text{O}_2^-$ – posiada silne właściwości tiofilowe – indukuje wzrost poziomu cAMP – induktor antyoksydacyjnej oksygenazy hemowej-1 – powstawanie: nie tylko przy udziale syntazy tlenu azotu (NOS), ale także w innych reakcjach 	<ul style="list-style-type: none"> – brak bezpośredniej reaktywności – czas życia wynosi od 10 ms do 1s – w reakcji z grupami hemowymi preferuje grupy żelazawe (Fe^{2+}) – reaguje z $\cdot\text{O}_2^-$ i O_2 generując NO_2, N_2O_3 lub ONOO⁻ – nie reaguje bezpośrednio z grupami tiolowymi – indukuje wzrost poziomu cGMP – induktor antyoksydacyjnej oksygenazy hemowej-1 – powstawanie: głównie w wyniku działania syntazy tlenu azotu
Najważniejsze efekty fizjologiczne	
<ul style="list-style-type: none"> – wpływa na kurczliwość naczyń – zmniejsza tętniczne ciśnienie krwi – działanie inotropowe i lusitropowe – hamuje agregację płytek krwi – chroni przed niedokrwiennym uszkodzeniem mięśnia sercowego – induktor apoptozy i nekrozy 	<ul style="list-style-type: none"> – wpływa na kurczliwość naczyń – zmniejsza tętniczne ciśnienie krwi – efekt izotropowy negatywny lub słaby – hamuje agregację płytek krwi – chroni przed uszkodzeniem mięśnia sercowego, gdy jest wcześniej obecny – inhibitor apoptozy przy niskich stężeniach – działa hamująco na układ współczulny – bierze udział w wytwarzaniu pamięci długotrwałej – regulator odpowiedzi immunologicznej

Nitroksyl jest związkiem wysoce reaktywnym i może działać jako związek elektrofilowy. Nie reaguje jednak ze wszystkimi związkami nukleofilowymi, ale działa wobec nich wybiórczo. Bardzo łatwo reaguje z tiolami, aminami i fosfinami dając, odpowiednio: disulfidy lub sulfonamidy, związki diazenowe i aza-yliidy, ale nie reaguje z nukleofilową wodą i alkoholami. W reakcji z tiolami elektrofilowy atom azotu w cząsteczce nitroksylu jest atakowany przez nukleofilowy atom siarki, co prowadzi przypuszczalnie do powstawania N-hydroksysulfenamidu (Rys. 1) [29, 30]. Reakcja tego związku z nadmiarem tioli może z kolei prowadzić do powstawania

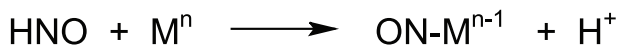
odpowiedniego disiarczku i hydroksylaminy. W innej reakcji N-hydroksylsulfenamid może ulec izomeryzacji do sulfonamidu. Taką reakcję obserwowano podczas enzymatycznej redukcji S-nitrozo-glutationu [31, 32].



Rysunek 1. Reakcja elektrofilowego HNO z tiolami

Figure 1. Reaction of electrophile HNO with thiols

Oprócz reakcji z tiolami nitroksyl może reagować z jonami żelaza hemu Fe³⁺, co powoduje, że w wyniku reakcji nitrozylowania powstaje połączenie nitrozył-żelazo Fe²⁺. Takie reakcje mogą również zachodzić z innymi metalami, np. z miedzią i magnezem.



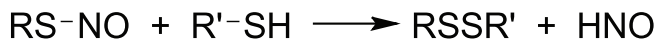
Schemat 3. Reakcje nitroksylu z metalami (M)

Scheme 3. Reactions of nitroxy with metals (M)

Cząsteczka nitroksylu ma zdolność do reagowania z tlenem. Reakcja ta przebiega wolno, a jej wynikiem są reaktywne formy azotu (RFA). Początkowo przypuszczano, że jedną z nich jest nadtlenoazotyn (ONOO⁻), przeprowadzone badania nie potwierdziły jednak tej tezy [33]. Reaktywność nitroksylu zależna jest od jego stanu spinowego. Cząsteczka tripletowa (³NO⁻), powstająca w wyniku fotolizy soli Angelięgo w warunkach tlenowych, reaguje z tlenem w stanie podstawowym dając nadtlenoazotyn [34]. Z soli ulegającej dekompozycji w warunkach fizjologicznych uwalniane są singletowe cząsteczki nitroksylu (¹HNO) [35], które mają zdolność do tworzenia reaktywnych cząstek o naturze innej niż nadtlenoazotyn [36]. Związek ten jest mediatorem w jedno- i dwuelektronowej reakcji oksydacji, natomiast produkt reakcji tlenu z nitroksylem efektywnie uczestniczy tylko w reakcji oksydacji dwuelektronowej. Nadtlenoazotyn jest zdolny do nitrowania niskocząsteczkowych fenoli (głównie tyrozyny, w mniejszym stopniu tryptofanu, histydyny czy metioniny) [37], podczas gdy sól Angelięgo jest raczej czynnikiem hydroksylującym [33].

2. POWSTAWANIE NITROKSYLU W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH

Dotychczasowy brak większego zainteresowania tą formą tlenu azotu wynika prawdopodobnie z faktu, że nie było dowodów na powstawanie nitroksylu (HNO/NO^-) *in vivo* z powodu braku bezpośrednich metod jego detekcji w systemach biologicznych. Możliwości generowania cząsteczki nitroksylu dyskutowali Fukuto i in. [5], według których jednym ze źródeł nitroksylu w komórkach mogą być S-nitrozotiole powstające z reakcji białek lub peptydów tiolowych z endogennie generowanymi tlenkami azotu. S-nitrozowanie białek tiolowych (transnitrozylacja) jest ważnym elementem transdukcji sygnału w komórce i jest „przełącznikiem” zmieniającym aktywność białek enzymatycznych. Wong i in. [29] obserwowali generowanie HNO w wyniku reakcji S-nitrozotiole z innymi cząsteczkami tiolowymi, np. z glutationem, GSH (Schemat 4), w której związek tiolowy atakuje atom siarki cząsteczki S-nitrozotiole.



Schemat 4. Reakcja S-nitrozotiole z cząsteczką tiolową prowadząca do powstania disulfidu i nitroksylu
 Scheme 4. Reaction of S-nitrosothiol with the molecule of thiol resulting in disulphide and nitroxyl formation

Endogenne powstawanie HNO w wyniku dekompozycji S-nitrozotiole, takich jak: S-nitrozoglutation, S-nitrozokaspaza 3, S-nitrozometalotioneina wykazali dość wiadcześnie Stoyanowsky i in. [38]. Autorzy stwierdzili, że w procesie denitrozowania S-nitrozotiole ważną rolę ogrywa tioredoksyna, a także kwas dihydroliponowy, katalizujące ten proces, zarówno w systemach chemicznych jak i biologicznych. Wyniki eksperymentów wskazują więc na to, że komórkowe S-nitrozotiole mogą stanowić istotne źródło powstawania nitroksylu w komórkach.

Niektóre badania wskazują na to, że HNO może być generowany wskutek oksydacyjnej degradacji N-hydroksy-L-argininy (wykrywanej w osoczu w znaczącym stężeniu – powyżej 20 μM) [10, 39, 40] lub w wyniku bezpośredniej aktywności syntazy tlenu azotu – NOS (Rys. 2) [6, 41].

Enzym ten zawiera jako grupę prostetyczną tetrahydrobiopterynę (BH_4), aktywującą przyłączenie do hemu tlenu poprzez przekazanie jednego elektronu, który później odzyskany umożliwia uwolnienie zsyntetyzowanej cząsteczki NO^\bullet . Adak i in. [42] wykorzystując neuronalną syntazę tlenu azotu (nNOS) pozbawioną tetrahydrobiopteryny analizowali znaczenie udziału hemu i tetrahydrobiopteryny dla syntezy tlenu azotu. Autorzy stwierdzili, że kofaktor ten nie jest niezbędny w procesie syntezy tlenu azotu, chociaż wzmacnia aktywność enzymu. Ustalili również, że nNOS pozbawiona tetrahydrobiopteryny może prowadzić do powstawania nitroksylu (HNO), a wyłączną i najważniejszą rolę BH_4 jest umożliwienie nNOS generowania NO^\bullet zamiast HNO.

pula cytochromu c. Taka sytuacja ma miejsce podczas miejscowego niedokrwienia (ischemii). Niedobór tlenu sprawia wtedy, że oksydaza cytochromowa nie może utlenić tego cytochromu, co prowadzi do wzrostu poziomu NO•.

3. DONORY NITROKSYLU

Ze względu na niestabilność i szybką dimeryzację nitroksylu w roztworach wodnych, w badaniach zarówno chemicznych jak i biologicznych właściwości nitroksylu, konieczne jest stosowanie związków mających zdolność generowania HNO/NO⁻ (Tab. 2). Najczęściej używany jest triokso diazotan sodu (Na₂N₂O₃, CAS 13826-64-7). Część ta, nazywana solą Angelięgo, została zsyntetyzowana po raz pierwszy ponad 100 lat temu przez włoskiego chemika Angelo Angelięgo, który zaproponował wykorzystanie jej jako donora HNO. Przez wiele następných lat fizjologiczne właściwości nitroksylu nie były znane, jednakże obecnie dostępne dane na temat farmakologicznych efektów nitroksylu pochodzą z badań prowadzonych głównie z wykorzystaniem soli Angelięgo jako źródła HNO/NO⁻. Generowanie nitroksylu przez ten związek jest zależne od pH środowiska (Tab. 2). Podczas dekompozycji soli Angelięgo ma miejsce najpierw protonacja dianionu, a następnie tautomeryzacja i heterolityczne przecięcie wiązania między atomami azotu: N–N [24, 50–56].

Tabela 2. Związki będące donorami nitroksylu (HNO/NO⁻)
Table 2. Nitroxyl (HNO/NO⁻) donors

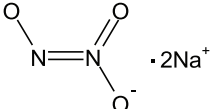
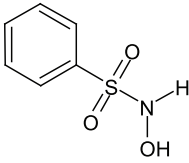
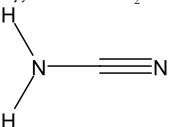
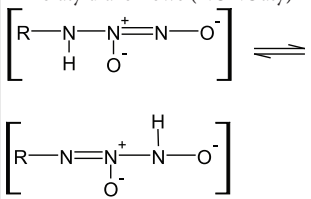
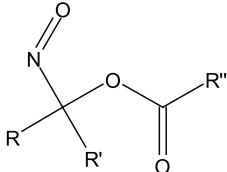
Donory HNO	Schemat reakcji powstawania HNO	Warunki generowania nitroksylu
Sól Angelięgo, Na ₂ N ₂ O ₃ 	$\text{N}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HNO} + \text{NO}_2^-$	– pH 4–8 – w pH > 8 sól jest stabilna – w pH < 4 generowany jest NO
Kwas Pilotyęgo, (C ₆ H ₅)S(O ₂)NHOH 	$\text{R-S(O)}_2\text{NHOH} + \text{HO}^- \rightarrow \text{R-S(O)}\text{O}^- + \text{HNO} + \text{H}_2\text{O}$	– pH wyższe niż fizjologiczne – stabilny przy niskim pH – w fizjologicznym pH jest donorem głównie NO•
Cyjanamid, NH ₂ CN 	$\text{NH}_2\text{CN} \rightarrow (\text{HONHCN}) \rightarrow \text{HNO} + \text{CN}^- + \text{H}^+$	– pH fizjologiczne

Tabela 2. Związki będące donorami nitroksylu (HNO/NO⁻)Table 2. Nitroxyl (HNO/NO⁻) donors

Donory HNO	Schemat reakcji powstawania HNO	Warunki generowania nitroksylu
Diolaty diazoniowe (NONOaty) 	$[RNH-N(O)=NO]^- \rightarrow$ $[RH=N(O)-NHO]^- \rightarrow$ $HNO + RNNO^-$	– diolaty oparte na aminach I-rzędowych: <u>pH fizjologiczne</u> – diolaty z izopropylaminą (IPA/NO): <u>pH 5–13</u> (w niższym pH generują NO ⁻)
Związki nitrozowe z grupą acyloksy 	$NOCRR'OCOR'' \rightarrow$ $HNO + RCOR' + R''COOH$	– <u>pH fizjologiczne</u>

Dobrze scharakteryzowanym donorem HNO jest kwas benzenosulfohydroksamowy (kwas Piloty'ego, (C₆H₆)S(O₂)NHOH, CAS 599-71-3). W przeciwieństwie do soli Angeli'ego kwas ten jest stabilny przy niskich wartościach pH, a powstawanie z niego nitroksylu ma miejsce w warunkach zasadowych, w związku z czym raczej nie wykorzystuje się go w badaniach biologicznych. Dekompozycja kwasu Piloty'ego polega na deprotonacji a następnie heterolitycznym przecięciu wiązania między atomem siarki i azotu: S–N. W warunkach fizjologicznych kwas Piloty'ego ulega łatwo jednoelektronowemu procesowi utleniania, co sprawia, że zamiast nitroksylu powstaje tlenek azotu, NO[•].

Do generujących nitroksyl związków mających znaczenie farmakologiczne należy natomiast cyjanamid stosowany w leczeniu choroby alkoholowej (H₂NCN, CAS 420-04-2). Po zastosowaniu znakowanego ¹³C-cyjanamidu stwierdzono, że produktem jego bioaktywacji jest cyjanid (HCN), bowiem przy udziale katalazy ulega utlenieniu do niestabilnego *N*-hydroksycyjanamidu, który spontanicznie rozkłada się do HCN i HNO (Tab. 2) [57]. Zastosowanie cyjanamidu w leczeniu choroby alkoholowej związane jest ze zdolnością HNO do hamowania aktywności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), enzymu biorącego udział w metabolizmie etanolu. Podejmowano próby zsyntetyzowania stabilnej cząsteczki *N*-hydroksycyjanamidu (zwanej także *N*-cyjanohydroksyaminą), co pozwoliłoby na ominięcie koniecznej bioaktywacji cyjanamidu przez katalazę. Jedną z prób stabilizacji cząsteczki *N*-hydroksycyjanamidu była *N,O*-bis-acylacja, która doprowadziła do syntezy *N,O*-dibenzoil-*N*-hydroksycyjanamidu (DBHC) z bromku cyjanogenu i *N,O*-dibenzoilhydroksylaminy (DBHA). W obecności esterazy DBHA jest przekształcany poprzez niestabilne związki pośrednie do HNO i kwasu benzoesowego. Ponieważ dehydro-

genaza aldehydowa posiada aktywność esterazy mogłaby ona sama katalizować wyzwalenie HNO z DBHA. Niekorzystną cechą z punktu widzenia klinicznego zastosowania DBHC jest jednak powstawanie oprócz nitroksylu cyjanidu. Próby zsyntetyzowania *N*-podstawionych pochodnych hydroksylaminy grupami innymi niż cyjanid, mogłyby doprowadzić do uzyskania donorów HNO/NO⁻, które miałyby szansę szerszego zastosowania w praktyce klinicznej.

Do innych związków, które generują nitroksyl w warunkach fizjologicznych należą α -acyloksy-C-nitrozo związki, syntetyzowane w laboratorium prof. Kinga [58]. α -Acyloksy-C-nitrozo związki powstają w reakcji utleniania oksymów w obecności kwasów karboksylowych. Hydroliza tych donorów HNO prowadzi do powstania nietrwałego produktu pośredniego a następnie uwalniania nitroksylu i odpowiedniego ketonu (Tab. 2). Szybkość uwalniania HNO zależy od pH i struktury grupy acylowej acyloksynitrozo związku, co może być ważną właściwością mającą wpływ na możliwości farmakologicznego zastosowania tych cząsteczek.

Dużą grupą związków generujących HNO/NO⁻ są diazeniodiole o ogólnej budowie X[N(O)NO]⁻, w której X jest grupą silnie nukleofilową taką jak grupa aminylowa (R₁R₂N) lub oksylowa (O⁻) [59]. Są to związki o biologicznej aktywności podobnej do tej jaką wykazuje sól Angelięgo, jest ona bowiem diazeniodiolem z atomem tlenu wymienionym na inną grupę pełniącą funkcję aminy. Początkowo związki te znane były jako generujące tlenek azotu (NO[•]) – były to diazeniodiole zsyntetyzowane w reakcji drugorzędowych amin z tlenkiem azotu. Z kolei diazeniodiole zsyntetyzowane z pierwszorzędowych amin mogą być wykorzystywane do generowania nitroksylu. Diazeniodiol powstały z izopropylowej aminy, zwany IPA-NO, jest donorem nitroksylu w zakresie pH 5–13 [60, 61] i wykazuje aktywność biologiczną podobną do soli Angelięgo. Podobnie jak sól Angelięgo, IPA-NO przy niskim pH wyzwala tlenek azotu – NO[•].

4. DETEKCJA NITROKSYLU

Właściwości chemiczne nitroksylu, m.in. uleganie szybkiej dimeryzacji, wpływają na trudności w detekcji tej cząsteczki w układach biologicznych. Do tej pory nitroksyl był pośrednio wykrywany poprzez detekcję podtlenku azotu N₂O, produktu dimeryzacji HNO. Prowadzone ostatnio badania skupiają się na próbach opracowania metod bezpośredniej detekcji tej cząsteczki.

Jedna z opisanych niedawno metod wykrywania obecności HNO wykorzystuje tiofilowe właściwości HNO. Donzelli i in. [62] wykazali, że w biologicznych warunkach w obecności donorów nitroksylu glutation (GSH) jest przekształcany w sulfinaamid [GS(O)NH₂] i utlenioną formę glutationu (GSSG). Wydaje się, że sulfinaamid jest unikalnym produktem reakcji nitroksylu z tiolami, ponieważ nie obserwowano jego powstawania w obecności innych tlenków azotu takich jak NO, N₂O₃, NO₂, ONOO⁻ [29, 62].

Samuni i in. [63] opisali sposób detekcji nitroksylu metodą spektrometrii EPR z wykorzystaniem nitronylo-nitroksydów (stabilnych rodników nitroksylowych), np. *N*-tlenku 2-(4-karboksyfenylo)-4,4,5,5-tetrametyloimidazolin-1-oksylu (C-PTIO). Autorzy stwierdzili, że związek taki jest łatwo redukowany przez HNO do nitronylo-hydroksylaminy, która zamieniana jest na imino-nitroksyd lub imino-hydroksylaminę. Ilość tej ostatniej wzrasta wraz ze wzrostem ilości soli Angelięgo w stosunku do nitronylo-nitroksydu. Ponieważ reakcja NO^{*} z nitronylo-nitroksydem również prowadzi do powstawania imino nitroksylu, to zastosowanie nitronylo-nitroksydu do rozróżniania obecności NO^{*} i HNO jest możliwe tylko wtedy, gdy NO^{*} jest stosowany w stężeniach dużo niższych niż całkowita produkcja HNO.

W 2009 roku zespół prof. Kinga z Wake Forest University opisał nieznane dotąd właściwości nitroksylu, które mogą stać się podstawą nowej, bezpośredniej metody wykrywania tej cząsteczki [8]. Autorzy eksperymentalnie wykazali, że nitroksyl reaguje z triarylofosforami (fosfinami III-rzędu) dając odpowiedni triarylooksofosfor (tlenek fosfiny) i aza-ylid (R₃P=NH). W obecności związku elektrofilowego, aza-ylid podlega reakcji Staudingera, w wyniku której powstaje stabilna amidowa pochodna HNO z atomem azotu pochodzącym z cząsteczki nitroksylu. Metoda detekcji nitroksylu wykorzystująca reakcje zachodzące pomiędzy HNO a związkami fosforoorganicznymi stanowi nowy sposób wykrywania tej cząsteczki w układach biologicznych.

Rosenthal i Lippard [9] opisali z kolei metodę syntezy, właściwości fotofizyczne i zastosowanie w badaniach biologicznych barwnika BOT1 zsyntetyzowanego przy wykorzystaniu 8-(chlorometyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametyl-4-bora3a,4a-diaza-s-indacenu (TM-BODIPY-CH₂Cl) oraz *N,N*-bis(2-pirydylometylo)-*N*-propalgilaminę. Barwnik ten w roztworach wodnych może tworzyć kompleksy z jonami miedzi Cu²⁺ (Cu²⁺[BOT1]). Autorzy wykonali badania z użyciem komórek HeLa poddanych działaniu soli Angelięgo w stężeniu 200 μM. Po 10 min inkubacji komórek z badanym związkiem obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym specyficzną dla nitroksylu czerwoną fluorescencję analizowanych komórek. Eksperymenty te wykazały więc, że kompleks Cu²⁺[BOT1] przechodzi przez błony komórkowe i może być stosowany do wykrywania obecności HNO w żywych komórkach. Dodatkowo w warunkach fizjologicznych fluorescencja pojawia się tylko w przypadku obecności HNO a nie NO^{*}, co jest ważne z punktu widzenia dalszych badań nad cząsteczką nitroksylu [9].

5. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE NITROKSYLU

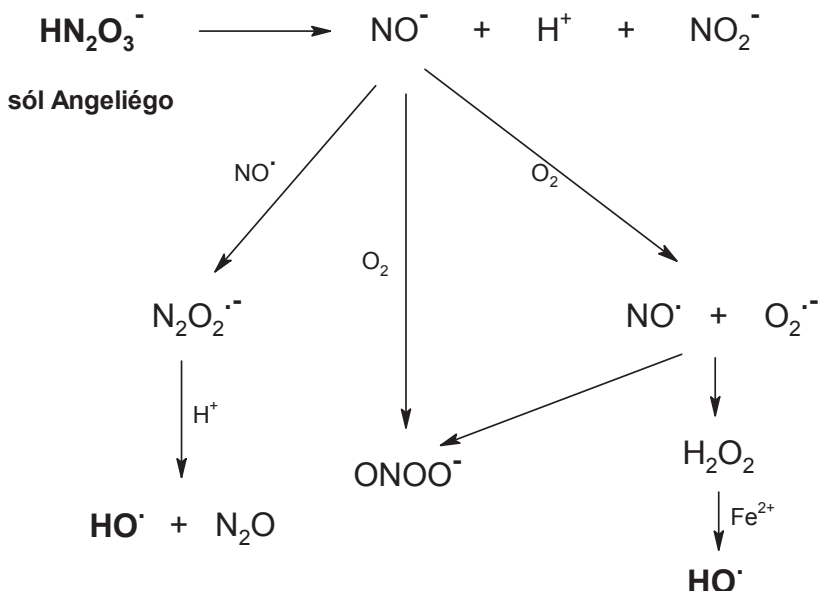
Biologiczne właściwości nitroksylu są słabo poznane. Wykonywanie eksperymentów z wykorzystaniem donorów HNO przysparza bowiem badaczom sporo problemów w związku z jego nietrwałością i trudnościami w detekcji. Badania wymagają zastosowania wielu prób kontrolnych, które dają pewność, że zaobserwowane zmiany pochodzą z działalności nitroksylu. W przypadku najczęściej

używanej w badaniach biologicznych soli Angelięgo (HNO/NO^-) jedną z nich jest kontrola z solą, która uległa dekompozycji, ponieważ błędne wnioski można wyciągnąć w związku z aktywnością NO_2^- powstającym równocześnie z HNO. W eksperymentach biologicznych duże znaczenie ma również wartość pH, od którego zależy generowanie HNO/NO^- przez różne związki. W przypadku soli Angelięgo nitroksyl generowany jest w zakresie pH od 4 do 8, a ponieważ sól jest stabilna w środowisku zasadowym (pH = 12) rozpuszcza się ją w 10 mM NaOH. Rozcieńczając próbkę w celu uzyskania właściwego stężenia stosowanego w danym eksperymencie należy pamiętać o tym, aby użyć świeżego roztworu soli i wykorzystywać go bezpośrednio po przygotowaniu. Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie związku po jego rozpuszczeniu może doprowadzić do jego dekompozycji. Podobnych trudności dostarczają badania na innych donorach nitroksylu.

W badaniach mających na celu ocenę biologicznych właściwości HNO/NO^- analizowano do tej pory przede wszystkim jego cytotoksyczność w doświadczeniach *in vitro*. Jednymi z pierwszych badań były eksperymenty Winka i in. [23], które wykazały, że HNO ma działanie cytotoksyczne, przy czym jego toksyczność jest znacznie wyższa w warunkach tlenowych niż przy niedoborze tlenu. Badania wykonywano na komórkach V79 (fibroblasty płuc chomika chińskiego) z wykorzystaniem testu klonogenego, polegającego na ocenie wpływu HNO/NO^- generowanego przez sól Angelięgo (1–5 mM) na przeżywalność i proliferację komórek oraz zdolność do tworzenia przez nie kolonii. Wraz ze wzrostem stężenia związku obserwowano spadek przeżywalności komórek, a także indukcję złamań podwójnej nici DNA. Zarówno cytotoksyczność, mierzona przeżywalnością komórek, jak i indukcja uszkodzeń DNA była zahamowana w obecności ferrycjanidu i Tempolu (4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylo-piperydino-1-oksylu). Indukowanie podwójnych złamań DNA przez sól Angelięgo było w tamtym czasie dla Autorów badań zaskakujące, ponieważ takie uszkodzenia nie są powodowane ani przez ONOO^- , ani przez H_2O_2 , w związku z czym cząsteczki te nie mogły być odpowiedzialne za obserwowane uszkodzenia DNA [23].

Cytotoksyczność HNO badano także w teście dehydrogenazy mleczanowej (test LDH) przeprowadzonym z wykorzystaniem ludzkich komórek raka piersi MCF-7 [64]. Komórki poddawano działaniu soli Angelięgo (5 mM) przez 4,5 godziny. Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest cytozolowym enzymem, który w warunkach fizjologicznych nie jest uwalniany do środowiska. Mechaniczne uszkodzenie błony plazmatycznej oraz śmierć komórki spowodowana działaniem czynników szkodliwych powoduje uwolnienie LDH z komórek do środowiska zewnętrznego. Test LDH opiera się na reakcjach enzymatycznych, w wyniku których powstaje barwny produkt, oznaczany za pomocą spektrofotometru, a oznaczenie aktywności LDH w supernatancie jest miarą toksyczności badanej substancji względem hodowanych komórek. Autorzy badań stwierdzili, że ponad czterogodzinna inkubacja komórek z solą Angelięgo nie powoduje silnego efektu cytotoksycznego ale wzrasta on, gdy komórki analizowane są po 8 godzinach od początku inkubacji – może to

być związane z wchodzeniem komórek na drogę programowanej śmierci komórkowej (apoptozy). Efekt cytotoksyczny soli Angelięgo był natomiast silny w obecności H₂O₂ i jonów metali przejściowych już po inkubacji 4,5 godzinnej. Obserwowano wówczas powstawanie pęknięć pojedynczej nici DNA (DNA plazmidu pBR322) oraz wzrost poziomu 8-oxo-2'-deoxyguanozyny (8-oxo-dG) w DNA z grasicy cięcej [64]. Indukcja przez nitroksyl jednoniciowych pęknięć w DNA oraz oksydacji zasad purynowych związana jest prawdopodobnie z powstawaniem rodników hydroksylowych i innych potencjalnych oksydantów. Wiązanie pomiędzy atomami azotu i wodoru jest w tej cząsteczce stosunkowo słabe (50 kcal/mol), co sprawia, że nitroksyl jest dobrym donorem atomu wodoru podczas reakcji z innymi cząsteczkami. Reakcja jonu NO⁻ z tlenem prowadzi do wytworzenia nadtlenoazotynu lub tlenku azotu, a ten ostatni może być źródłem nadtlenku wodoru i rodnika hydroksylowego (Rys. 3). O tym, czy powstanie nadtlenoazotyn czy tlenek azotu decyduje stan spinowy cząsteczki nitroksylu (cząsteczka tripletowa ³NO⁻ daje nadtlenoazotyn, natomiast singletowy ¹HNO – inne pochodne). NO⁻ szybko wchodzi w reakcję z tlenkiem azotu NO[•] tworząc NO₂⁻ i NO₃⁻. W warunkach *in vivo* stężenie NO⁻ nie jest wystarczająco wysokie, aby mogło dojść do utworzenia NO₃⁻, może za to powstawać NO₂⁻. Ta ostatnia cząstka może być źródłem tlenku azotu N₂O i groźnego oksydanta – rodnika hydroksylowego HO[•] [65].



Rysunek 3. Reakcje prowadzące do powstania rodnika hydroksylowego (wg Ohshima i in., [65])
 Figure 3. Generation of hydroxyl radical (according to Ohshima et al., [65])

Uszkodzenia DNA spowodowane działaniem nitroksylu analizowano również w tymocytach myszy [66]. Badano cytotoksyczny efekt takich uszkodzeń stosując metodę cytometrii przepływowej umożliwiającej, dzięki różnicom w intensywności fluorescencji, ilościowe rozróżnienie żywych komórek nieapoptotycznych, komórek apoptotycznych i komórek nekrotycznych. Badania prowadzono z zastosowaniem polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) biorącej udział w naprawie DNA oraz jej inhibitorów w celu sprawdzenia czy aktywność enzymu ma wpływ na rodzaj śmierci komórkowej powodowanej przez HNO (apoptozy bądź nekrozy). Komórki inkubowano z solą Angelięgo przez 3 godziny (0,1–0,25 mM). Stężenia soli Angelięgo 0,15 mM, 0,2 mM oraz 0,25 mM były silnie toksyczne dla badanych komórek – cytotoksyczność wynosiła aż 70–90%. [66]. Autorzy stwierdzili, że nitroksyl może w obecności aktywnego enzymu PARP powodować zarówno nekrotyczną śmierć komórkową jak i śmierć apoptotyczną (stosunek liczby komórek nekrotycznych do apoptotycznych wyniósł 2,5 : 1). Obserwowano aktywację kaspaz (kluczowych enzymów apoptozy) oraz indukcję apoptotycznej fragmentacji DNA. Zastosowanie inhibitorów enzymu PARP powodowało wchodzenie większej liczby komórek na drogę apoptozy (stosunek liczby komórek nekrotycznych do apoptotycznych wyniósł 1:1), obserwowano także większą liczbę komórek żywych. Całkowite zahamowanie aktywności PARP nie chroniło jednak całkowicie komórek przed cytotoksycznym działaniem nitroksylu, co świadczy o tym, że główne mechanizmy cytotoksycznego działania HNO/NO⁻ nie są zależne od aktywności tego enzymu [66].

Cytotoksyczność nitroksylu jest uzależniona od pH środowiska [67, 68]. W fibroblastach człowieka i komórkach neuroblastomy (SK-N-SH) analizowano cytotoksyczne efekty nitroksylu, generowanego przez sól Angelięgo w pH = 6,2 i w pH = 7,4. Po 30-minutowej inkubacji komórek z solą Angelięgo i 4-godzinnej postinkubacji w podłożu hodowlanym nie zawierającym tego związku efekt cytotoksyczny obserwowano dla komórek traktowanych związkiem przy pH = 6,2. Stosując pH = 7,4 efekt cytotoksyczny obserwowano dopiero po dalszej wielogodzinnej inkubacji, co prawdopodobnie związane było wchodzeniem komórek na drogę apoptozy [67–70]. Ta różnica w cytotoksyczności jest według Autorów spowodowana zwiększonym generowaniem rodnika hydroksylowego w bardziej kwaśnym środowisku. Fakt ten ma potencjalnie duże znaczenie terapeutyczne w leczeniu chorób nowotworowych, ponieważ komórki guzów intensywnie metabolizują glukozę do kwasu mlekowego, co wraz z hydrolizą ATP w warunkach hipoksji prowadzi do zakwaszenia mikrośrodowiska komórek rakowych [71].

Poza właściwościami cytotoksycznymi badania wskazują także na mutagenne działanie nitroksylu [72], co zaobserwowano w doświadczeniach wykorzystujących dwa szczepy drożdży: RS112 (szczep diploidalny) oraz Y433 (szczep haploidalny) i zastosowaniu metody pozwalającej ocenić częstotliwość rewersji zaburzonego genu *his3* na drodze homologicznej intrachromosomalnej rekombinacji (DEL assay) [73] oraz metody analizy oporności szczepu na toksyczne działanie kanawaniny, analogu argininy (CAN assay) [74]. Nitroksyl generowany przez sól Angelięgo (0,8 mM,

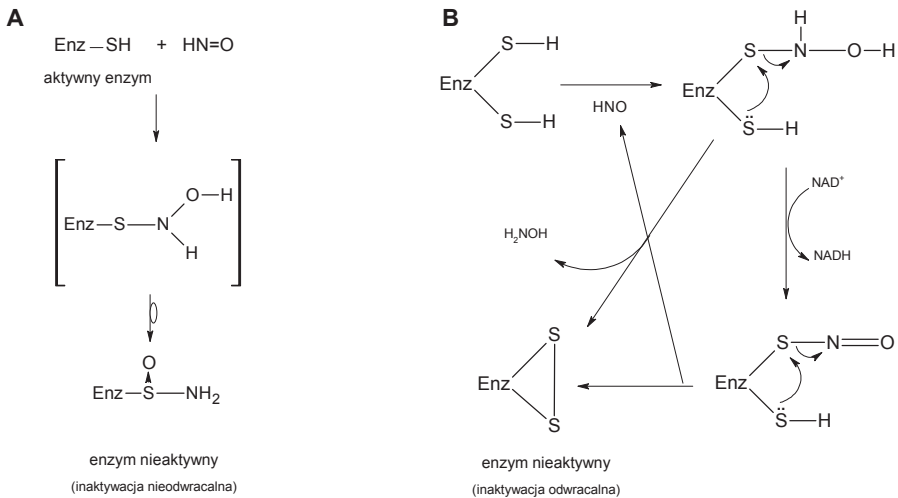
3 godz. traktowanie) powodował delecje DNA i rekombinacje, co według Autorów badań związane było z pęknięciami nici DNA a nie z uszkodzeniami pojedynczych zasad (nie obserwowano indukcji mutacji punktowych).

Badania nad właściwościami nitroksylu wskazują także, że może on pełnić funkcję antyoksydacyjną. Cząsteczka HNO/NO⁻ jest zdolna do hamowania peroksydacji lipidów, co doświadczalnie zostało potwierdzone z wykorzystaniem modelu badawczego *Saccharomyces cerevisiae* przez Lopez i in. [75]. Właściwości antyoksydacyjne nitroksylu wynikają z tego, że może on funkcjonować jako jednoelektronowy reduktor i źródło NO[•] wykazującego właściwości przeciwutleniające w środowisku lipidowym. Stężenie nitroksylu i charakter środowiska decydują o zachowaniu HNO i jego działaniu pro- lub antyoksydacyjnym. Wyniki Lopez i in. [75] wskazują jednakże, iż nitroksyl może również sam, niezależnie od powstawania tlenu azotu wykazywać działanie antyoksydacyjne. Autorzy badań porównali antyoksydacyjne efekty soli Angelięgo i DEANO (kompleks dietylaminy i tlenu azotu wykorzystywany do kontrolowanego wyzwalaania tlenu azotu w roztworach – wyzwala 2 cząsteczki NO[•] w podobnym tempie jak sól Angelięgo wyzwala HNO). W przypadku DEANO obserwowano efekty antyoksydacyjne, jednakże były one bardzo zmienne przy niskich stężeniach NO[•], natomiast w stężeniach wysokich obserwowano efekt prooksydacyjny. Z drugiej strony wyniki uzyskane dla HNO/NO⁻ pochodzącego z soli Angelięgo były zawsze stałe i wskazywały na efekty antyoksydacyjne tej cząsteczki. W obecności glutationu, związku tiolowego będącego „zmiataczem” HNO, antyoksydacyjne efekty tego związku były mniejsze. Badania Lopez i in. [75] wskazują więc, że antyoksydacyjne właściwości nitroksylu nie są spowodowane konwersją HNO do NO[•].

6. ZNACZENIE FARMAKOLOGICZNE NITROKSYLU

Pierwsze doniesienia o wykorzystaniu klinicznym cząsteczki HNO dotyczą zastosowania jednego z jej donorów – cyjanamidu jako środka w terapii osób uzależnionych od alkoholu [57]. Lek ten do tej pory używany jest w Europie, Kanadzie (pod nazwami handlowymi Dipsan[®], Apstem[®] i Temposil[®]) oraz w Japonii (Cyanamide Yoshitomi[®]). Cyjanamid po podaniu doustnym szybko przenika bariery układu pokarmowego i zaczyna działać poprzez hamowanie aktywności mitochondrialnego enzymu – dehydrogenazy aldehydowej (ALDH; EC 1.2.1.3.). Enzym ten odpowiada za katalizowanie reakcji utleniania aldehydów powstałych w organizmie po spożyciu alkoholu. Wywołuje reakcję pomiędzy karbimidem a alkoholem, która naśladuje lepiej poznaną reakcję alkoholu z disulfiraniem, lekiem stosowanym wcześniej w terapii awersyjnej alkoholizmu (Anticol[®], Esperal[®], Antabus[®]). Spożycie alkoholu po zażyciu cyjanamidu wywołuje nieprzyjemne skutki będące wynikiem zatrucia przez kumulujący się w organizmie aldehyd octowy (nieaktywna dehydrogenaza aldehydowa nie przekształca go w kwas octowy). W ten sposób cyjanamid poprzez skutki jego zażycia zniechęca do dalszego spożywania alkoholu. Zdolność

do hamowania aktywności dehydrogenazy aldehydowej stwierdzono w eksperymentach z wykorzystaniem drożdżowego enzymu ALDH i soli Angeli'ego jako donoru HNO/NO^- . Hamowanie aktywności dehydrogenazy zależy od czasu traktowania oraz stężenia związku. Stężenie, przy którym następuje zahamowanie połowy aktywności enzymu (IC_{50}) wynosi poniżej $2 \mu\text{M}$ [76]. Dehydrogenaza występująca w komórkach drożdży, jak i ta z komórek ssaków, zawierają w swoim centrum aktywnym grupy sulfhydrylowe a cysteina z tych grup jest celem dla cząsteczki nitroksylu. Oksydacja tych grup tiolowych skutkuje powstaniem wiązań disiarczkowych wewnątrz podjednostki enzymu i zahamowaniem aktywności. Reakcja nitroksylu z centrum aktywnym enzymu prowadzi do powstania jego dwóch nieaktywnych form. Przy wartości $\text{pH} = 7$ i niższej powstaje forma z nieodwracalnie zahamowaną zdolnością katalityczną (Rys. 4A). W $\text{pH} = 8,5$ oraz wyższym tworzona jest forma enzymu z możliwością przywrócenia jej działalności enzymatycznej (Rys. 4B).



Rysunek 4. Mechanizmy nieodwracalnej (A) i odwracalnej (B) inaktywacji ALDH przez nitroksyl (według DeMaster i in., [76])

Figure 4. Mechanisms of the irreversible and reversible inactivation of ALDH by nitroxyl (according to DeMaster et al., [76])

Podobny mechanizm ma miejsce w przypadku nieodwracalnego zahamowania aktywności glikolitycznej enzymu dehydrogenazy 3-fosfoglicerolowej (GAPDH, EC 1.2.1.12). Dzięki tej własności nitroksyl może stać się ważnym narzędziem w walce z chorobami nowotworowymi. Brak aktywności GAPDH ogranicza zachodzenie niezbędnego dla komórek nowotworowych procesu glikolizy [75]. GAPDH posiada w swym centrum aktywnym grupy tiolowe z cysteiną, które atakowane są przez cząsteczki nitroksylu. Zmiana konformacyjna prowadzi do zahamowania aktywności enzymatycznej dehydrogenazy. Dodatkowo, eksperymenty wskazały na wybiórczość działania nitroksylu - HNO wchodził w reakcję z enzymem, pomimo wysokiego stężenia glutationu (GSH) w komórkach [15]. Aktywność antykarcyngenowa

nitroksylu związana jest również z hamowaniem angiogenezy i proliferacji komórek nowotworowych, co zaobserwowano w badaniach na komórkach raka piersi i neuroblastomy [68, 77]. Stwierdzono również, że traktowanie komórek raka piersi solą Angelięgo powoduje zahamowanie aktywności polimerazy PARP. Enzym ten jest ważnym składnikiem systemu naprawy uszkodzeń komórkowych (odpowiada za odwracalne post-translacyjne modyfikacje białek u Eucaryota). Wykorzystanie w praktyce zdolności HNO do hamowania aktywności PARP może skutecznie wspomóc terapie antykancerogenne oparte na wywoływaniu uszkodzeń w DNA komórek nowotworowych [24].

Jednym z najważniejszych i stosunkowo niedawno stwierdzonych fizjologicznych efektów działania nitroksylu (HNO/NO⁻) jest jego wpływ na relaksację naczyń krwionośnych (Tab. 1). Nie jest dokładnie znany mechanizm tego działania, ale przypuszcza się, że może odbywać się to w dwojaki sposób [10, 78]. Po pierwsze, może to być rezultatem konwersji nitroksylu do tlenku azotu NO^{*}, posiadającego zdolność do aktywacji (400-krotny wzrost aktywności) rozpuszczalnej cyklazy guanilowej (rCG), która katalizuje przekształcenie GTP (guanozynomonofosforan) w GMP (cykliczny guanozynomonofosforan). cGMP aktywuje mechanizmy prowadzące do rozszerzenia naczyń krwionośnych. Zdolność do aktywowania rCG przez tlenek azotu została stwierdzona przez Diekrsa i Burstyna w 1996 roku [79]. Przeprowadzone w 2009 roku badania Zeller i in. [80] również potwierdziły fakt aktywacji rCG przez nitroksyl generowany z soli Angelięgo. Naukowcy udowodnili, że podstawą tego zjawiska jest przekształcenie cząsteczki nitroksylu w tlenek azotu NO^{*}. Aktywacja enzymu przy udziale samego donora HNO była niewielka, ale gwałtownie rosła po dodaniu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), przy udziale której następowało przekształcanie HNO w NO^{*}, można więc było wnioskować, że osiągnięta aktywacja rCG jest efektem działania tlenku azotu [80].

Wpływ nitroksylu na układ sercowo-naczyniowy może być także skutkiem jego bezpośredniej aktywności. Cząsteczka HNO ma zdolność do uwalniania peptydu związanego z genem kalcytoniny (CGRP) z neuronów NANC (nieadrenergiczne, niecholinergiczne neurony uwalniające ze swoich zakończeń NO^{*}) [14]. Białko CGRP, poprzez przyłączenie się do receptora CRLR (receptor o budowie zbliżonej do receptora dla kalcytoniny), prowadzi do aktywacji cyklazy adenilowej, wskutek czego dochodzi do podwyższenia poziomu komórkowego cAMP (cyklicznego adenozyneomonofosforanu). Ten wzrost stężenia cAMP powoduje aktywację kinazy proteinowej A (PKA), która odpowiada za fosforylację białek kanałów wapniowych, czego rezultatem jest rozszerzenie naczyń krwionośnych [30, 81]. Bezpośrednią aktywność HNO w odniesieniu do układu sercowo-naczyniowego obserwowano w eksperymentach na psach, które pokazały, że zastosowanie donorów nitroksylu zwiększa siłę mięśnia sercowego (działanie inotropowe) i poprawia jego funkcję rozkurczową (działanie lusitropowe) [14]. Możliwość zastosowania donorów nitroksylu jako leków stosowanych w niewydolności układu sercowo-naczyniowego sprawia, że badań nad nowymi cząsteczkami generującymi HNO/NO⁻ podejmuje się

coraz więcej zespołów naukowych. Przykładem nowej intensywnie badanej obecnie cząsteczki jest octan 1-nitrozocykloheksylu, który generuje nitroksyl w zakresie pH 4-8 i wykazuje działanie inotropowe [82]. Innym związkiem będącym już na etapie badań klinicznych jest w tej chwili cząsteczka o nieujawnionej jeszcze strukturze – CXL-1020, która w przyszłości ma być stosowana jako lek przy niewydolności serca [83].

Oprócz oddziaływania na naczynia krwionośne i pracę mięśnia sercowego nitroksyl ma także wpływ na agregację płytek krwi [84]. Bermejo i in. [84] stwierdzili, że HNO efektywnie działa jako inhibitor agregacji płytek krwi człowieka w sposób zależny od czasu i stężenia. Obserwowano bowiem po zastosowaniu soli Angelięgo spadek poziomu epitopów glikoprotein aktywujących płytki krwi (CD62P, CD63, PAC-1) oraz znaczące zwiększenie stężenia cGMP.

PODSUMOWANIE

Omówione w niniejszej pracy właściwości HNO/NO⁻ wskazują, że wiele cech tej cząsteczki i aktywność biologiczna są różne od tych, które wykazuje tlenek azotu NO[•] (Tab. 1). Mimo tego, że w tej chwili szlaki sygnałowe nitroksylu nie są jeszcze dokładnie poznane, wiadomo jednak, że wpływa on na różne procesy fizjologiczne, takie jak: metabolizm alkoholu, relaksacja naczyń, kurczliwość mięśnia sercowego i zahamowanie glikolizy. Wszystko to sprawia, że możliwe jest jego zastosowanie w leczeniu alkoholizmu, chorób serca oraz nowotworów. Badania, które są obecnie prowadzone dążą więc do szczegółowego poznania właściwości nitroksylu i jego aktywności w układach biologicznych, a także opracowania prostej, bezpośredniej metody wykrywania obecności tej cząsteczki w komórkach. Możliwość zastosowania nitroksylu w diagnostyce klinicznej wymusza w tej chwili także poszukiwanie nowych, bardziej stabilnych niż najczęściej stosowana w badaniach eksperymentalnych sól Angelięgo, związków generujących HNO/NO⁻ w warunkach fizjologicznych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, *Nature*, 1980, **288**, 373.
- [2] R.F. Furchgott, *Biosci. Rep.*, 1999, **19**, 235.
- [3] L.J. Ignarro, G.M. Buga, R.E. Byrns, K.S. Wood, G. Chaudhuri, *Circulation*, 1987, **76**, 51.
- [4] J.M. Fukuto, M.D. Bartberger, A.S. Dutton, N. Paolucci, D.A. Wink, K.N. Houk, *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, **18**, 790.
- [5] J.M. Fukuto, A.S. Dutton, K.N. Houk, *Chembiochem*, 2005, **6**, 612.
- [6] K.M. Rusche, M.M. Spiering, M.A. Marletta, *Biochemistry*, 1998, **37**, 15503.
- [7] J.M. Fukuto, M.I. Jackson, N. Kaludercic, N. Paolucci, *Methods Enzymol.*, 2003, **140**, 411.
- [8] J.A. Reisz, E.B. Klorig, M.W. Wright, S.B. King, *Organic Lett.*, 2009, **11**, 2719.
- [9] J. Rosenthal, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 5536.
- [10] J.M. Fukuto, K. Chiang, R. Hsieh, P. Wong, G. Chaudhuri, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, **263**, 546.

- [11] J.M. Fukuto, C.H. Switzer, K.M. Miranda, D.A. Wink, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005, **45**, 335.
- [12] T.W. Miller, M.M. Cherney, A.J. Lee, N.E. Francoleon, P.J. Farmer, S.B. King, A.J. Hobbs, K.M. Miranda, J.N. Burstyn, J.M. Fukuto, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 21788.
- [13] J.A. Reisz, E. Bechtold, S.B. King, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 5203.
- [14] N. Paolucci, W.F. Saavedra, K.M. Miranda, C. Martignani, T. Isoda, J.M. Hare, M.G. Espey, J.M. Fukuto, M. Feelisch, D.A. Wink, D.A. Kass, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 10463.
- [15] B.E. Lopez, C.E. Rodriguez, M. Pribadi, N.M. Cook, M. Shinyashiki, J.M. Fukuto, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, **442**, 140.
- [16] L.J. Ignarro, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 7816..
- [17] L.J. Ignarro, *J. Physiol. Pharm.*, 2002, **53**, 503.
- [18] J.B. Mannick, C.M. Schonhoff, *Free Rad. Res.*, 2004, **38**, 1.
- [19] H.T. Chung, H.O. Pae, B.M. Choi, T.R. Billiar, Y.M. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2001, **282**, 1075.
- [20] G.A. Blaise, D. Gauvin, M. Gangal, S. Authier, *Toxicology*, 2005, **208**, 177.
- [21] D.E. Koshland, *Science*, 1992, **258**, 1861.
- [22] M.L. Bullen, A.A. Miller, K.L. Andrews, J.C. Irvine, R.H. Ritchie, C.G. Sobey, B.K. Kemp-Harper, *Antioxid. Redox Signal*, 2010, doi:10.1089/ars.2010.3327.
- [23] D.A. Wink, M. Feelisch, J. Fukuto, D. Chistodoulou, D. Jourd'heuil, M.B. Grisham, Y. Vodovotz, J.A. Cook, M. Krishna, W.G. DeGraff, S. Kim, J. Gamson, J.B. Mitchell, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, **351**, 66.
- [24] D.A. Wink, K.M. Miranda, T. Katori, D. Mancardi, D.D. Thomas, L. Ridnour, M.G. Espey, M. Feelisch, C.A. Colton, J.M. Fukuto, P. Pagliaro, D.A. Kass, N. Paolucci, *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, 2003, **285**, H2264.
- [25] V. Shafirovich, S.V. Lyamar, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 7340.
- [26] M. Gratzel, Taniguchi, S. A. Henglein, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 1970, **74**, 1003.
- [27] M.D. Bartberger, W. Liu, E. Ford, K.M. Miranda, C. Switzer, J.M. Fukuto, P.J. Farmer, D.A. Wink, K.N. Houk, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 10958..
- [28] J.M. Fukuto, M.I. Jackson, N. Kaludercic, N. Paolucci, *Methods Enzymol.*, 2008, **440**, 411.
- [29] P.S.Y. Wong, J. Hyun, J.M. Fukuto, F.N. Shirota, E.G. DeMaster, D.W. Shoeman, H.T. Nagasawa, *Biochemistry*, 1998, **37**, 18129.
- [30] J.M. Fukuto, C.L. Bianco, T.A. Chavez, *Free Rad. Biol. Med.*, 2009, **47**, 1318.
- [31] N. Paolucci, M.I. Jackson, B.E. Lopez, K. Miranda, C.G. Tocchetti, D.A. Wink, A.J. Hobbs, J.M. Fukuto, *Pharmacol. Therap.*, 2007, **113**, 442.
- [32] P.J. Farmer, F. Sulc, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 166.
- [33] K.M. Miranda, K. Yamada, M.G. Espey, D.D. Thomas, W. DeGraff, J.B. Mitchell, M.C. Krishna, C.A. Colton, D.A. Wink, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, **401**, 134.
- [34] C.E. Donald, M.N. Hughes, J.M. Thompson, F.T. Bonner, *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 2676.
- [35] T. Ishiwata, H. Akimoto, I. Tanaka, *Chem. Phys. Lett.*, 1974, **27**, 260.
- [36] K.M. Miranda, M.G. Espey, K. Yamada, M. Krishna, N. Ludwick, S. Kim, D. Jourd'heuil, M.B. Grisham, M. Feelisch, J.M. Fukuto, D.A. Wink, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 1720.
- [37] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet, *Physiol. Rev.*, 2007, **87**, 315.
- [38] D.A. Stoyanovsky, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, D. Anand, D.N. Mandavia, D. Gius, J. Ivanova, B. Pitt, T.R. Billiar, V.E. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15815.
- [39] J. Yoo, J.M. Fukuto, *Biochem. Pharmacol.*, 1995, **50**, 1995.
- [40] J.Y. Cho, A. Dutton, T. Miller, K.N. Houk, J.M. Fukuto, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **417**, 65.
- [41] J.C. Irvine, R.H. Ritchie, J.L. Favaloro, K.L. Andrews, R.E. Widdop, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2008, **29**, 601.

- [42] S. Adak, Q. Wang, D.J. Stuehr, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 33554.
- [43] C.H. Switzer, W. Flores-Santana, D. Mancardi, S. Donzelli, D. Basudhar, L.A. Ridnour, K.M. Miranda, J.M. Fukuto, N. Paolucci, D.A. Wink, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1787**, 835.
- [44] R.B. Clarkson, S.W. Norby, A. Smirnov, S. Boyer, N. Vahidi, R.W. Nims, D.A. Wink, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1243**, 496.
- [45] X.J. Zhao, V. Sampath, W.S. Caughey, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, **212**, 1054.
- [46] J.J. Poderoso, C. Lisdero, F. Schopfer, N. Riobo, M.C. Carreras, E. Cadenas, A. Boveris, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 37709.
- [47] M.A. Sharpe, C.E. Cooper, *Biochem. J.*, 1998, **332**, 9.
- [48] V. Niketic, S. Stojanovic, A. Nikolic, M. Spasic, A.M. Michelson, *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, **27**, 992.
- [49] M. Saleem, H. Ohshima, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2004, **315**, 455.
- [50] C.M. Maragos, D. Morley, D.A. Wink, T.M. Dunams, J.E. Saavedra, A. Hoffman, A.A. Bove, L. Isaac, J.A. Hrabie, L.K. Keefer, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 3242.
- [51] N. Paolucci, T. Katori, H.C. Champion, M.E. St John, K.M. Miranda, J.M. Fukuto, D.A. Wink, D.A. Kass, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 5537.
- [52] M. Feelisch, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 4978.
- [53] V.G. Lee, M.L. Johnson, J. Baust, V.E. Laubach, S.C. Watkins, T.R. Billiar, Shock, 2001, **16**, 355.
- [54] M.R. Siegfried, J. Erhardt, T. Rider, X.L. Ma, A.M. Lefer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, **260**, 668.
- [55] R.B. Mason, R.M. Pluta, S. Walbridge, D.A. Wink, E.H. Oldfield, R.J. Boock, *J. Neurosurg.*, 2000, **93**, 99.
- [56] P. Kubes, M. Suzuki, D.N. Granger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 4651.
- [57] E.G. DeMaster, E. Kaplan, F.N. Shirota, H.T. Nagasawa, *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 1982, **107**, 1333.
- [58] X. Sha, T.S. Isbell, R.P. Patel, C.S. Day, S.B. King, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9687.
- [59] J.A. Hrabie, L.K. Keefer, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1135.
- [60] K.M. Miranda, H.T. Nagasawa, J.P. Toscano, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2005, **5**, 649.
- [61] A.S. Dutton, C.P. Suhrada, K.M. Miranda, D.A. Wink, J.M. Fukuto, K.N. Houk, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2448.
- [62] S. Donzelli, M.G. Espey, D.D. Thomas, D. Mancardi, C.G. Tocchetti, L.A. Ridnour, N. Paolucci, S.B. King, K.M. Miranda, G. Lazzarino, J.M. Fukuto, D.A. Wink, *Free Rad. Biol. Med.*, 2006, **40**, 1056.
- [63] U. Samuni, Y. Samuni, S. Goldstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8428.
- [64] L. Chazotte-Aubert, S. Oikawa, I. Gilibert, F. Bianchini, S. Kawanishi, H. Ohshima, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 20909.
- [65] H. Ohshima, I. Gilibert, F. Bianchini, *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, **26**, 1305.
- [66] P. Bai, E. Bakondi, E. Szabo, P. Gergely, C. Szabo, L. Virag, *Free Rad. Biol. Med.*, 2001, **31**, 1616.
- [67] J. Ivanova, G. Salama, R.M. Clancy, N.F. Schor, K.D. Nylander, D.A. Stoyanovsky, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 42761.
- [68] D.A. Stoyanovsky, N.F. Schor, K.D. Nylander, G. Salama, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 210.
- [69] G.B. Pierce, R.E. Parchment, A.L. Lewellyn, *Differentiation*, 1991, **46**, 181.
- [70] D.M. Hockenbery, Z.N. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer, *Cell*, 1993, **75**, 241.
- [71] M. Stubbs, P.M.J. McSheehy, J.R. Griffiths, C.L. Bashford, *Mol. Med. Today*, 2000, **6**, 15.
- [72] Z. Sobol, N.M. Cook, R.H. Schiestl, *Mutat. Res.*, 2008, **638**, 83.
- [73] R.J. Brennan, R.H. Schiestl, *Methods Mol. Biol.*, 2004, **262**, 111.
- [74] C.E. Rodriguez, Z. Sobol, R.H. Schiestl, *Toxicol. in Vitro*, 2008, **22**, 296.
- [75] B.E. Lopez, M. Shinyashiki, T.H. Han, J.M. Fukuto, *Free Rad. Biol. Med.*, 2007, **42**, 482.
- [76] E.G. DeMaster, B. Redfern, H.T. Nagasawa, *Biochem. Pharmacol.*, 1998, **55**, 2007.

- [77] A.J. Norris, M.R. Sartippour, M. Lu, T. Park, J.Y. Rao, M.I. Jackson, J.M. Fukuto, M.N. Brooks, *Int. J. Cancer*, 2008, **122**, 1905.
- [78] J.M. Fukuto, A.J. Hobbs, L.J. Ignarro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **196**, 707.
- [79] E.A. Dierks, J.N. Burstyn, *Biochem. Pharmacol.*, 1996, **51**, 1593.
- [80] A. Zeller, M.V. Wenzl, M. Beretta, H. Stessel, M. Russwurm, D. Koesling, K. Schmidt, B. Mayer, *Mol. Pharmacol.*, 2009, **76**, 1115.
- [81] C.G. Tocchetti, W. Wang, J.P. Froehlich, S. Huke, M.A. Aon, G.M. Wilson, G. Di Benedetto, B. O'Rourke, W.D. Gao, D.A. Wink, J.P. Toscano, M. Zaccolo, D.M. Bers, H.H. Valdivia, H.P. Cheng, D.A. Kass, N. Paolucci, *Circ. Res.*, 2007, **100**, 96.
- [82] A. El-Armouche, A. Wahab, K. Wittkopper, T. Schulze, F. Bottcher, L. Pohlmann, S.B. King, J.F. DuMond, C. Gerloff, R.H. Boger, T. Eschenhagen, L. Carrier, S. Donzelli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **402**, 340.
- [83] M.J. Wang, R. Mazhari, I. Ihsar, A. Wang, M.S. Sabbah, H.N. Sabbah, *J. Cardiac Failure*, 2009, **15**, 241.
- [84] E. Bermejo, D.A. Saenz, F. Alberto, R.E. Rosenstein, S.E. Bari, M.A. Lazzari, *Thromb. Haemostasis*, 2005, **94**, 578.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 stycznia 2011

