

**NADTLENOAZOTYN – SILNY BIOLOGICZNY
UTLENIACZ**

PEROXYNITRITE A STRONG BIOLOGICAL OXIDANT

**Michał Bijak*, Michał Błażej Ponczek, Joanna Saluk,
Marta Chabielska, Julita Stępnia, Paweł Nowak**

*Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: mbijak@biol.uni.lodz.pl

Abstract

Wstęp

1. Powstawanie i ogólna charakterystyka nadtlenoazotynu
2. Prekursory nadtlenoazotynu
3. Reaktywność nadtlenoazotynu
4. Biologiczne działanie nadtlenoazotynu

Piśmiennictwo cytowane

mgr Michał Bijak w 2010 roku ukończył studia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Badania prowadzone w ramach przygotowywania pracy magisterskiej zatytułowanej: „Ocena działania polifenolowych ekstraktów roślinnych na aktywność koagulacyjną osocza i trombiny” stały się podstawą jego dalszej działalności naukowej. Od 2010 roku jest doktorantem Studium Doktoranckiego Biochemiczno-Biofizycznego Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę doktorską wykonuje w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ. Celem jego pracy jest zbadanie oddziaływania związków polifenolowych z enzymami kaskady krzepnięcia krwi.

dr Michał Ponczek urodzony w 1975 roku w Łodzi biochemik, bioinformatyk, obecnie adiunkt zatrudniony od 2008 w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego. Finalista 39 i 40 Olimpiady Chemicznej w 1994 i 1995 roku. Studiował Medycynę. Ukończył studia magisterskie z biologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, a następnie Podyplomowe Studium z Informatyki oraz Doktoranckie Studium Biochemiczno-Biofizyczne na Uniwersytecie Łódzkim. Obronił doktorat z biochemii w 2007 roku. Przebywał w 2008 roku na 3 miesięcznym stażu podoktorskim na Uniwersytecie Kalifornijskim San Diego, ufundowanym przez Europejską Organizację Biologii Molekularnej. Jest autorem i współautorem 13 artykułów naukowych w języku angielskim i 5 prac poglądowych w języku polskim obejmujących zagadnienia związane z bioinformatyką, filogenetyką molekularną i biochemią układu hemostazy oraz stresem oksydacyjnym. Jego zainteresowania badawcze obejmują szczególnie zagadnienia związane z ewolucją białek.

dr Joanna Saluk od roku 2000 jest zatrudniona w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego, gdzie obecnie pracuje na stanowisku adiunkta. W roku 2001 uzyskała stopień doktora na podstawie rozprawy zatytułowanej: „Zmiany aktywności biologicznej płytek krwi wywołane działaniem lipopolisacharydów *Proteus mirabilis*”. Jej naukowe zainteresowania koncentrują się wokół zagadnień związanych z rolą płytek krwi w rozwoju reakcji zapalnych, głównie na oddziaływaniu płytek z toksyną bakterii Gramujemnych. Drugi nurt prowadzonych przez nią badań to poszukiwanie aktywnych biologicznie związków naturalnych dostępnych w diecie, które mogłyby funkcjonować jako naturalne antyoksydanty egzogenne o właściwościach przeciwpłytkowych. W roku 2010 została laureatką konkursu na stypendium habilitacyjne L'Oréal Polska dla Kobiet i Nauki przyznawane przy wsparciu Polskiego Komitetu ds. UNESCO.

Marta Chabielska, studentka dwuletnich uzupełniających studiów magisterskich na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska, na kierunku biologia, specjalność: biochemia. Obecnie wykonuje prace magisterską w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ, której celem jest zbadanie wybranych ekstraktów roślinnych (*Asteraceae*) jako potencjalnych antyoksydantów, chroniących układ hemostazy przed działaniem reaktywnych form tlenu i azotu.

mgr Julita Stępniak ukończyła studia na wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego; kierunek biologia (specjalność biochemia). Celem jej pracy magisterskiej było zbadanie wpływu nadtlenoazotynu na strukturę i licę włókniaka.

dr hab. Paweł Nowak, prof. nadzw. UŁ, biochemik, specjalista w zakresie biochemii krzepnięcia krwi. Jest współautorem 48 prac doświadczalnych opublikowanych w czasopismach indeksowanych przez filadelfijski Instytut Informacji Naukowej, 1 podręcznika akademickiego i 5 prac przeglądowych. Rezultaty swoich badań prezentował na ponad 50 konferencjach krajowych i zagranicznych. W ciągu ostatnich 10 lat zasadniczy nurt Jego aktywności naukowej związany jest z wyjaśnieniem molekularnych mechanizmów zaburzeń w układzie hemostazy spowodowanych przez reaktywne formy tlenu i azotu, a w szczególności z badaniami zaburzeń funkcji płytek krwi, plazminogenu i fibrynogenu wywołanych przez nadtlenoazotyn.

ABSTRACT

As demonstrated in recent years, one of the major factors of oxidative stress, generated in the circulatory system, in both acute and chronic pathological conditions, is peroxynitrite (ONOO^-) [4]. Peroxynitrite is a strong biological oxidant and nitrating compound, generated *in vivo* from a rapid reaction of two relatively less reactive, but commonly found, of free radicals: nitrogen monoxide (NO) and superoxide (O_2^-) [8]. This reaction occurs spontaneously and is not catalyzed by any enzyme. A fundamental reaction of ONOO^- in biological systems is its fast reaction with carbon dioxide ($k = 5,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and yields a short-lived intermediate, nitrosoperoxycarbonate (ONOOCO_2^-), which homolyzes leads to the formation of carbonate (CO_3^-) and nitrogen dioxide (NO_2) radicals (yield ~35%) [29, 30] (Fig. 1), which are one-electron oxidants. ONOO^- is responsible for oxidative modifications in a wide variety of biomolecules and is capable to induce of nitrative changes in sulfur and aromatic amino acids, especially 3-nitrotyrosine and dityrosine formation [17] (Fig. 2). This article describes the formation, reactivity and biological action of peroxynitrite.

Keywords: peroxynitrite, oxidative stress, 3-nitrotyrosine

Słowa kluczowe: nadtlenoazotyn, stres oksydacyjny, 3-nitrotyrozyna

WSTĘP

Jednym z nieodłącznych elementów tlenowego metabolizmu komórki jest generowanie reaktywnych form tlenu (RFT) i reaktywnych form azotu (RFA). Mogą to być zarówno jony, jak i związki bez ładunku elektrycznego, ze sparowanymi elektronami, jak również wolne rodniki, których cechą wspólną jest duża reaktywność. Źródłem RFT/RFA są produkty pośrednie utleniania przenośników elektronów, związki generowane w czasie rozwoju reakcji zapalnych, peroksydacja lipidów oraz reakcje katalizowane przez oksydazy i jony metali (Fe^{3+} , Cu^{2+}) [1]. RFT i RFA stanowią ważny element procesów związanych z odpowiedzią immunologiczną, działają jako bezpośrednie czynniki bakteriobójcze (wybuch tlenowy fagocytów), a także uczestniczą w szlakach przekazywania sygnałów w komórkach [2]. Stan, w którym zostaje zaburzona równowaga pomiędzy szybkością powstawania RFT i RFA, a biologiczną zdolnością do szybkiej detekcji i unieczynnienia reaktywnych produktów pośrednich i/lub naprawy powstałych uszkodzeń przez układy antyoksydacyjne nosi nazwę stresu oksydacyjnego, który w skrajnych przypadkach może powodować nieodwracalne uszkodzenia komórek. Istotne znaczenie zaburzonej równowagi statusu oksydacyjnego zaobserwowano w wielu jednostkach chorobowych związanych z układem krążenia: między innymi w nadciśnieniu tętniczym, miażdżycy czy restenozie po zabiegach angioplastyki [3]. Wolnorodnikowe uszkodzenia białek, lipidów, węglowodanów oraz DNA stanowią jeden z głównych czynników etiopatologii wielu chorób [4]. Jak wykazano w ostatnich latach, jednym z głównych czynników stresu oksydacyjnego powstających w układzie krążenia w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych oraz niedokrwienno-reperfuzyjnych jest nadtlenoazotyn [5,6]. Nadtlenoazotyn (ONOO^-) jest silnym związkiem utleniającym i nitrującym, tworzonym przez komórki śródbłonna, aktywowane makrofagii oraz neutrofile [7]. W ciągu ostatnich lat bardzo szybko wzrasta liczba publikacji związanych z określeniem fizjologicznej i patofizjologicznej roli nadtlenoazotynu w organizmie, co świadczy o dużym zainteresowaniu tym czynnikiem stresu oksydacyjnego.

1. POWSTAWANIE I OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA NADTLENOAZOTYNU

Beckman i in. [8] w 1990 roku opisali reakcje powstawania nadtlenoazotynu w warunkach *in vivo*. W układach biologicznych ONOO^- jest tworzony w wyniku reakcji dwóch stosunkowo mało reaktywnych, lecz powszechnie występujących wolnych rodników: anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i tlenku azotu (NO^{\cdot}). Reakcja ta zachodzi spontanicznie i nie jest katalizowana przez żaden enzym. Stała szybkości reakcji powstawania nadtlenoazotynu jest około 3–8 razy większa niż rozkład anionorodnika ponadtlenkowego katalizowany przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) i wynosi $k = 6,7 \times 10^9 \text{ mol/l} \times \text{s}$ [9, 10]. W związku z tym, że obydwa prekursorzy nadtlenoazotynu mają bardzo krótki okres półtrwania (NO^{\cdot} – 1–30 sekund; $\text{O}_2^{\cdot-}$

– milisekundy), nadlenoazotyn może powstawać w tym samym przedziale komórkowym przy jednoczesnym generowaniu jego prekursorów. Wewnątrz komórek stężenie rodnika tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego wynosi odpowiednio 10–100 nM i 0,1–1 nM, co jest niewystarczające, aby mogła zajść synteza nadlenoazotynu. Zupełnie odmienne warunki panują w pobliżu komórek generujących rodniki (np. komórki śródbłonna, aktywowane makrofagi, neutrofile), wtedy ich lokalne stężenie wzrasta aż do 1–10 μM [11]. Hydrofobowy tlenek azotu może przenikać swobodnie przez błony komórkowe, natomiast posiadający ładunek $\text{O}_2^{\cdot-}$ jest zdolny przemieszczać się jedynie poprzez kanały jonowe. Dlatego powstawanie nadlenoazotynu w głównej mierze zależy od miejsca generowania anionorodnika ponadtlenkowego. Czas półtrwania nadlenoazotynu w warunkach biologicznych wynosi nieco mniej niż 1 s. Czas ten jest jednak na tyle wystarczająco długi aby związek ten mógł przenikać przez błony komórkowe, dyfundując na odległość jednej do dwóch średnic komórkowych ($\sim 5\text{--}20 \mu\text{m}$), co oznacza, że wytwarzany w jednej komórce może mieć wpływ na inne, sąsiadujące komórki [7, 12, 13]. Ponadto nadlenoazotyn może przenikać przez błony biologiczne za pośrednictwem kanałów anionowych. ONOO^- znajduje się w stanie równowagi ze swoją uprotonowaną formą – kwasem nadlenoazotawym (ONOOH). W biologicznych warunkach stosunek ten zależy od lokalnego pH (w pH = 7,4 80% nadlenoazotynu występować będzie w formie anionowej) [14].

Istnieje kilka laboratoryjnych metod syntezy nadlenoazotynu. Związek ten można otrzymać w reakcji tlenu azotu z nadtlenkiem tetrametyloamonowym lub nadtlenkiem potasu, jak również poprzez fotolizę i radiolizę azotanu, utlenianie hydroksyloaminy oraz utlenianie organicznych azotanów [15]. Do badań chemicznych powszechnie wykorzystuje się metodę szybkiej reakcji azotynu z nadtlenkiem wodoru w kwaśnym pH, gdzie medium jest zakwaszane kwasem solnym, azotowym lub siarkowym, a następnie szybko uzasadawiane [16]. Ten rodzaj syntezy jest bardzo szybki, wydajny i niekłopotliwy do przeprowadzenia, jednak pewien problem stanowi pozostałość H_2O_2 i efektywność jego usuwania z medium reakcyjnego. Do badań biologicznych powszechnie stosowaną jest metoda ozonowania roztworu azydku sodu opisana w 1995 roku przez Pryora i in. [17]. Metoda ta pozwala na uzyskiwanie preparatu nadlenoazotynu o niskiej sile jonowej, bez zanieczyszczeń nadtlenkiem wodoru, ze śladową ilością pozostałego azydku i o stosunkowo wysokim stężeniu (do 80 mM).

Nadtlenoazotyn, zaliczany do reaktywnych form azotu, nie jest wolnym rodnikiem. Niesparowane elektrony, które pochodzą od dwóch rodników – tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego formują w cząsteczce ONOO^- nowe wiązanie [18]. Nadlenoazotyn posiada dwa stany konformacyjne: *cis* i *trans*, a forma *cis* uważana jest za formę bardziej stabilną. Ma ona zdolność do przechodzenia w formę *trans* podczas rozpadu ONOO^- do azotanu [19].

2. PREKURSORY NADTLENOAZOTYNU

W warunkach fizjologicznych pewna część O_2 (ok. 1–5%) ulega w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym nie czteroelektronowej, a jednoelektronowej redukcji. W wyniku takiej redukcji powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$). Przemiana ta polega na przyłączeniu elektronu do cząsteczki tlenu i przekształceniu jej w wolny rodnik. Enzymami, które biorą udział w tej reakcji są dehydrogenaza NADH i koenzym Q [20].

Duże ilości $O_2^{\cdot-}$ są wytwarzane także przy udziale oksydazy NAD(P)H fagocytów, oksydazy ksantynowej czy lipooksygenazy 12/15 leukocytów – enzymu odpowiadającego za powstawanie kwasu 12(S)-hydroksyeikozatetraenowego (12(S)HETE) oraz kwasu 15(S)-hydroksyeikozatetraenowego (15(S)HETE) [2]. Anionorodnik ponadtlenkowy może także powstawać podczas metabolizmu ksenobiotyków w mikrosomach, w reakcji utleniania ksantyny do kwasu moczowego katalizowanej przez oksydazę ksantynową przy udziale reduktazy NADPH i cytochromu P-450. W wyniku zachodzącej w erytrocytach autooksydacji hemoglobiny do methemoglobiny powstaje 250×10^{15} cząsteczek anionorodnika ponadtlenkowego w ciągu doby [21, 22]. Źródłem $O_2^{\cdot-}$ mogą także być płytki krwi, w których obecna jest jedna z izoform oksydazy NAD(P)H, a także oksydaza ksantynowa czy cyklooksygenaza [23].

Anionorodnik ponadtlenkowy może zachowywać się zarówno jako utleniacz jak i reduktor, w zależności od charakteru substancji z jaką reaguje. Niskie stężenie anionorodnika ponadtlenkowego utrzymywane jest w układach biologicznych przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD), która obecna jest w mitochondriach, cytoplazmie i przestrzeni międzykomórkowej. Enzym ten powoduje przemianę $O_2^{\cdot-}$ w mniej szkodliwy nadtlenek wodoru, który następnie ulega rozkładowi przez katalazę i peroksydazę [18, 24].

Tlenek azotu w temperaturze pokojowej jest bezbarwnym, trującym gazem [25]. Posiada jeden niesparowany elektron na atomie tlenu, stąd jego niestabilność i wysoka reaktywność. W powietrzu samorzutnie reaguje z tlenem tworząc ditlenek azotu (NO_2). Czas półtrwania ($t_{1/2}$) cząsteczki NO^{\cdot} wynosi 1–30 s [18, 24].

Tlenek azotu okazał się być bardzo ważną cząsteczką sygnałową w układach biologicznych. Furchgott i Zawadzki zaobserwowali w 1980 roku nieznanego wcześniej czynnik rozszerzający naczynia krwionośne, który nazwali śródbłonkowym czynnikiem relaksującym (EDRF) [26]. Siedem lat później odkryto, że opisywany jako EDRF, czynnik rozszerzający naczynia krwionośne, to właśnie tlenek azotu [27]. Odkrycie faktu, że tlenek azotu jest cząsteczką powodującą rozluźnianie ściany naczyń krwionośnych zaowocowało w 1998 roku przyznaniem w Nobla z dziedziny medycyny i fizjologii trzem naukowcom (Furchgott, Ignarro, Murad). Tlenek azotu powstaje z L-argininy przy udziale syntazy tlenku azotu (E.C. 1.14.13.39, ang. *nitric oxide synthase*, NOS) – enzymu o aktywności NADPH-zależnej dioksygenazy wprowadzającej dwa atomy tlenu do cząsteczki L-argininy. Reakcja przebiega dwuetapowo, związkiem pośrednim jest N^{ω} -hydroksy-L-arginina (NOH-L-Arg), a produk-

tami końcowymi $\cdot\text{NO}$ i L-cytrulina. Dodatkowo do zajścia reakcji konieczna jest obecność kofaktorów, tj.: FAD, FMN, tetrahydrobiopteryny oraz hemu [13, 28].

W ludzkim organizmie istnieją 3 izoformy syntazy tlenu azotu: neuronalna nNOS (typ I), indukowalna iNOS (typ II) i endotelialna (śródbłonkowa) eNOS (typ III). Izofomy NOS różnią się między sobą masą cząsteczkową, strukturą, miejscem występowania w komórce oraz kinetyką reakcji. Neuronalna i endotelialna NOS uważane są za enzymy konstytutywne, a jako kofaktorów wymagają jonów wapnia i kalmoduliny. Indukowalna NOS ulega ekspresji w makrofagach, neutrofilach, komórkach śródbłonka, fibroblastach, mięśniach gładkich naczyń krwionośnych, miocytach oraz hepatocytach, w odpowiedzi na cytokiny lub inne czynniki zapalne. Jej aktywność nie zależy od poziomu jonów wapnia. iNOS wytwarza tlenek azotu w 100–1000-krotnie wyższych ilościach niż formy konstytutywne [18, 22].

Tlenek azotu produkowany w komórkach śródbłonka w wyniku działania różnych bodźców (stres, trombina, ADP, serotonina, bradykinina, histamina) powoduje rozszerzanie naczyń krwionośnych i reguluje ciśnienie krwi. $\text{NO}\cdot$ hamuje nadmierną aktywację i agregację płytek krwi, co związane jest z jego działalnością przeciwzakrzepową i przeciwmiażdżycową. W mózgu i obwodowym układzie nerwowym, tlenek azotu pełni rolę neuroprzekaźnika. Uczestniczy on w procesie uczenia się i zapamiętywania, a także reguluje wydzielanie hormonów przysadki mózgowej [10, 29].

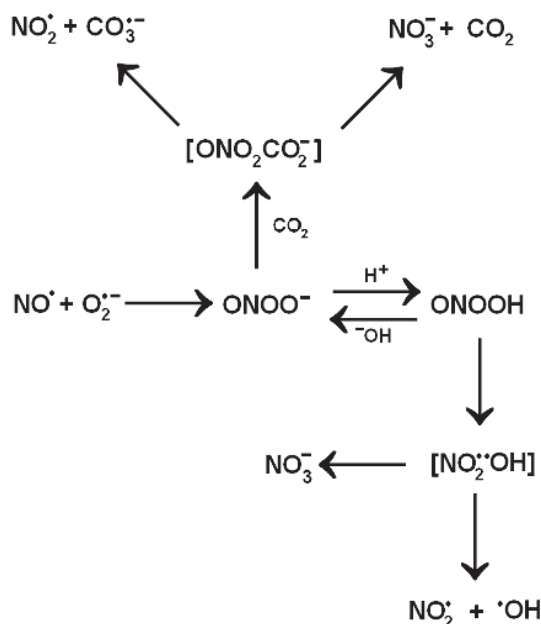
3. REAKTYWNOŚĆ NADTLENOAZOTYNU

Reakcje, w których uczestniczy nadtlendioazotyn można podzielić na: bezpośrednie reakcje redoks, reakcje z udziałem ditlenku węgla oraz reakcje związane z rozpadem sprzężonego z nadtlendioazotynem słabego kwasu – ONOOH. W tych pierwszych nadtlendioazotyn bierze udział w reakcjach jedno- lub dwu-elektronowego utleniania. Reakcja CO_2 z nadtlendioazotynem zachodzi z dużą szybkością ($k = 4,6 \times 10^4 - 5,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$; pH = 7,4, temp. 37°C) [30]. W wyniku tej przemiany powstaje nietrwały produkt pośredni – nitrozonadtlenowęglan (ONOOCO_2^-) ($t_{1/2} = 1 \mu\text{s}$), który ulega homolitycznemu rozpadowi dając ditlenek azotu ($\text{NO}_2\cdot$) i rodnik węglanowy ($\text{CO}_3\cdot$). Nitrozonadtlenowęglan może ulegać także izomeryzacji do $\text{O}_2\text{ONCO}_2^-$, a to prowadzi do odtworzenia ditlenku węgla oraz powstania azotanu (NO_3^-). Wtórne wolne rodniki ($\text{NO}_2\cdot$ i $\text{CO}_3\cdot$), które powstają w reakcji między ditlenkiem węgla a nadtlendioazotynem przyczyniają się do aż 4-krotnego zwiększenia potencjału nitrującego ONOO^- [31]. Wydajność tworzenia rodników podczas rozpadu ONOOCO_2^- wydaje się być dyskusyjna. Większość autorów podaje, że addukt nadtlendioazotynu z CO_2 w około 65% rozpada się bezpośrednio do NO_3^- i CO_2 , natomiast w 35% do rodników $\text{CO}_3\cdot$ i $\cdot\text{NO}_2$ [7, 32, 33].

Trzeci rodzaj reakcji związany jest z powstawaniem rodnika hydroksylowego i rodnika ditlenku azotu podczas rozpadu kwasu nadtlendioazotowego [15]. Nadtlendioazotyn może ulegać protonacji ($\text{pK}_a = 6,8$), dając kwas nadtlendioazotowy [34, 35].

Uważa się, że cząsteczka ONOOH ulega homolizie z rozerwaniem wiązania O–O tworząc parę rodników – rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$) i ditlenek azotu ($\cdot\text{NO}_2$) [7, 33, 36]. Wcześniej uważano, że ditlenek azotu obecny jest w organizmie jedynie po ekspozycji na dym papierosowy lub zanieczyszczenia powietrza [18].

Powstająca para rodnikowa $\cdot\text{OH}/\cdot\text{NO}_2$ zamknięta jest w swoistej klatce, otoczonej cząsteczkami wody i może dyfundować na zewnątrz komórki (zachodzi to w ok. 30% przypadków) lub rekombinować bezpośrednio do NO_3^- (takiej reakcji ulega około 70% par rodnikowych) [18, 33, 37]. Ze względu na wysokie stężenie ditlenku węgla w komórkach i płynach pozakomórkowych (1,3–1,5 mM, tj. około 10000 razy większe niż stężenie jonów wodorowych), jest on jednym z najważniejszych substratów dla nadtlenoazotynu [38]. Zatem najbardziej prawdopodobne jest, że nadtlenoazotyn w warunkach *in vivo* przereaguje właśnie z ditlenkiem węgla, niż ulegnie przekształceniu do HONOO, dając z kolei rodniki hydroksylowe.



Rysunek 1. Reakcje nadtlenoazotynu
Figure 1. Reaction of peroxynitrite

4. BIOLOGICZNE DZIAŁANIE NADTLENOAZOTYNU

Nadtlenoazotyn jest czynnikiem o szerokim spektrum działania w stosunku do biomolekuł. Biologiczne skutki modyfikacji oksydacyjnych wywołanych przez ONOO⁻ są liczne, ale ważne jest, aby pamiętać, że w dużym stopniu zależą one od stężenia tworzonych nadtlenoazotynu i jego komórkowej lokalizacji. Związek

ten i jego pochodne reagują zarówno z aminokwasami (m.in. tyrozyną, cysteiną, metioniną, tryptofanem), lipidami (fosfolipidy błon, lipoproteiny frakcji LDL), kwasami nukleinowymi, a także różnymi antyoksydantami. Nadtlenoazotyn powoduje tworzenie grup karbonylowych, dimeryzację, nitrowanie i nitrozylację aminokwasów, alkoholi, węglowodanów i związków tiolowych. Może działać jako jedno- lub dwuelektronowy utleniacz, z istotną rolą jonów metali przejściowych, spełniających funkcję katalizatorów. Jego aktywność, z jednej strony prowadzi do negatywnych następstw, takich jak utrata funkcji białek, a z drugiej, do powstawania związków będących donorami tlenu azotu, odgrywających rolę w rozkurczaniu naczyń krwionośnych [15].

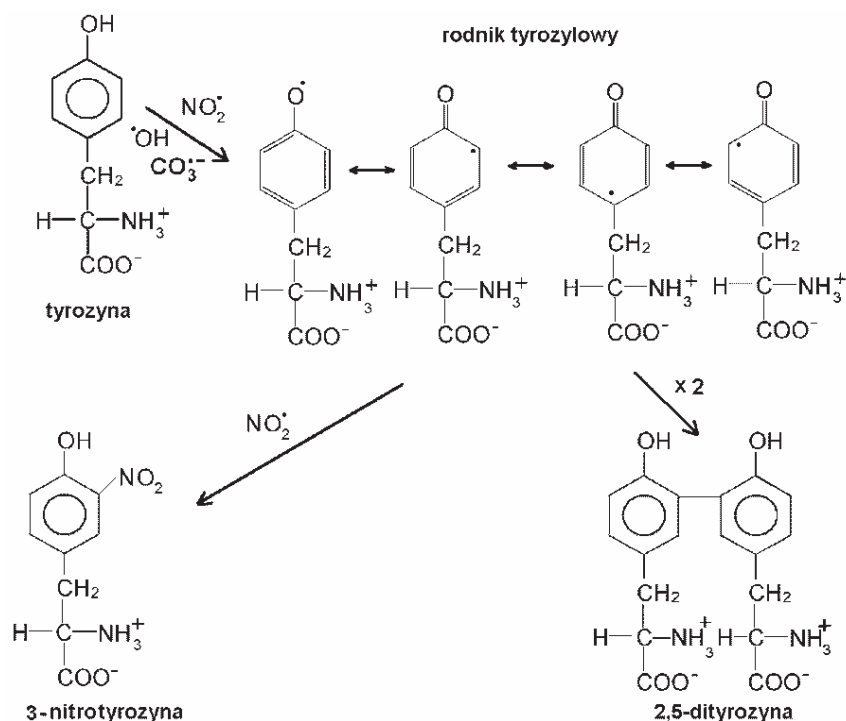
Liczne badania dowodzą, że powstający w naczyniach krwionośnych nad-tlenoazotyn jest zarówno silnym oksydantem jak i czynnikiem nitrującym. Modyfikacje białek spowodowane działaniem nad-tlenoazotynu powodują zmiany w strukturze i funkcji tych biomolekuł, których występowanie stwierdzono w wielu stanach chorobowych [39].

Nadtlenoazotyn wywołuje nitrowanie reszt aminokwasów alifatycznych takich jak: cysteina, metionina oraz aminokwasów aromatycznych: tryptofan i tyrozyna. Najbardziej podatne na utlenianie są aminokwasy siarkowe (cysteina, metionina), a także tyrozyna, tryptofan, fenyloalanina i histydyna [40]. Działanie nad-tlenoazotynu na białka ma bardzo istotne znaczenie w modulowaniu funkcjonowania enzymów. Szczególnie narażone na działanie ONOO^- są grupy prostetyczne zawierające jony metali przejściowych bądź hem. W wyniku ich utleniania dochodzi do zahamowania aktywności enzymatycznej m.in. mieloperoksydazy, ceruloplazminy, dysmutazy ponadtlenkowej [38]. Wolne rodniki powstające w wyniku homolizy nad-tlenoazotynu, bądź podczas jego reakcji z CO_2 (NO_2^\cdot , OH^\cdot , NO_2^\cdot , CO_3^\cdot), również mają zdolność do oddziaływania z białkami, co prowadzi do ich modyfikacji. Utlenianie przez ONOO^- wolnych grup tiolowych prowadzi m.in. do zaburzenia funkcji enzymów zaangażowanych w metabolizm energetyczny komórki (dehydrogenazy bursztynianowej, reduktazy fumaranu) [10].

Szczególną uwagę należy zwrócić na udział nad-tlenoazotynu w procesie nitrowania tyrozyny (Rys. 2). Nitrowanie tyrozyny prowadzi do kowalencyjnej modyfikacji białka w wyniku dodania grupy nitrowej ($-\text{NO}_2$) w sąsiedztwie grupy hydroksylowej w pierścieniu aromatycznym reszt tyrozynowych. Choć nad-tlenoazotyn bezpośrednio nie może reagować z grupą fenolową, to produkty jego rozpadu – rodnik hydroksylowy i ditlenek azotu wykazują taką aktywność. Dodatkowo, nietrwały nitrozonadtlenowęglan (ONOOOCO_2^-), powstający w reakcji ONOO^- z CO_2 , jest źródłem silnie reaktywnego rodnika węglanowego, który podobnie jak OH^\cdot może powodować tworzenie rodników tyrozylowych reagujących dalej z NO_2^\cdot . ONOOOCO_2^- ma czas półtrwania krótszy niż 3 ms i reaguje z tyrozyną ze stałą reakcji większą od $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [41, 42]. Rodniki CO_3^\cdot reagują z resztą tyrozyny poprzez oderwanie wodoru od grupy hydroksylowej, natomiast w odróżnieniu od rodników OH^\cdot , nie przyłączają się do pierścienia aromatycznego. Dzięki temu, może powstawać więcej rodników tyrozylowych, oddziałujących następnie z NO_2^\cdot do postaci

3-nitrotyrozyny. Co prawda rodniki $\cdot\text{NO}_2$ również reagują z resztą tyrozyny poprzez oderwanie atomu wodoru z grupy hydroksylowej, jednak stała szybkości tej reakcji jest 2–3 rzędy wielkości mniejsza od stałej szybkości reakcji rodników $\cdot\text{OH}$ czy $\text{CO}_3^{\cdot-}$ [43–45].

Wielu autorów uważa, że markerem działania nadtlenoazotynu w organizmie jest obecność znitrowanej tyrozyny w białkach. W osoczu osób zdrowych poziom 3-nitrotyrozyny jest stosunkowo niski ($< 0,1$ nmol/mg białka), ale znacząco wzrasta w przebiegu wielu chorób związanych z ostrym lub przewlekłym stanem zapalnym (posocznica, zespół ostrej niewydolności płuc, choroba niedokrwienna serca, chroniczna niewydolność nerek, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca, nowotwory płuc), a także u osób palących [46–49].

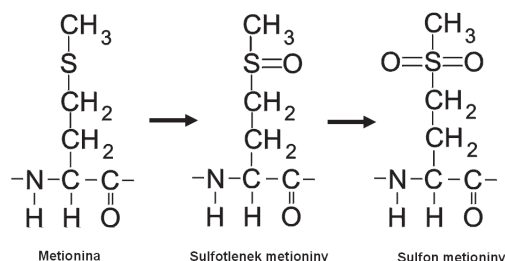


Rysunek 2. Powstawanie nitrotyrozyny i dityrozyny przy udziale nadtlenoazotynu
Figure 2. Formation of nitrotyrosine and dityrosine by peroxynitrite

Nadtlenoazotyn nie tylko silnie działa na tyrozinę, ale również na aminokwasy siarkowe (cysteinę i metioninę) [50]. W przypadku Cys ONOO^- jest odpowiedzialny za proces dwuelektronowego utleniania prowadzący do wytworzenia wiązań disiarczkowych, co może być ważnym mechanizmem inaktywacji wielu enzymów. W temperaturze pokojowej, w pH fizjologicznym nadtlenoazotyn utlenia grupy $-\text{SH}$ około 1000 razy szybciej niż nadtlenek wodoru. Reakcja ONOO^- z grupami tiolowymi przebiega z wytworzeniem produktów pośrednich, głównie S-nitrolioli

(RSNO₂) oraz niewielkich ilości S-nitrozotioili (RSNO). Te drugie są ważnym składnikiem metabolizmu tlenu azotu i odgrywają istotną rolę w przekształcaniu toksycznego ONOO⁻ do tlenu azotu [51].

Metionina jest utleniana przez nadtlendioazotyn [52], jak również przez inne reaktywne formy tlenu, takie jak nadtlendioek wodoru, ozon, kwas chlorowy(I), do sulfotlenku metioniny (MeSOX) i dalej do sulfonu metioniny (Me₂SOX) (Rys. 3). *In vivo* działanie nadtlendioazotynu na metioninę ograniczone jest prawdopodobnie do dwuelektronowego utleniania jej do MeSOX. Powyższa reakcja zachodzi, jeśli w jej środowisku nie występuje ditlenek węgla. Utlenianie metioniny hamowane jest więc przez obecność ditlenku węgla, niezależnie od pH roztworu w przeciwieństwie do reakcji nitrowania tyrozyny. Nitrowanie tyrozyny i utlenianie metioniny, są zatem reakcjami konkurencyjnymi i zależą od dostępności ditlenku węgla [53, 54].



Rysunek 3. Proces wywołanego przez nadtlendioazotyn utleniania metioniny
 Figure 3. The process of peroxynitrite-induced oxidation of methionine

Nadtlendioazotyn powoduje także modyfikację związków lipidowych: fosfolipidów błon, liposomów i lipoprotein [34]. Peroksydacja lipidów z udziałem ONOO⁻ polega na odłączeniu atomu wodoru od nienasyconych kwasów tłuszczowych. Nie jest przy tym wymagana obecność jonów metali przejściowych jako katalizatorów reakcji. Produktami utleniania lipidów są wodoronadtlenki lipidów, skoniugowane dieny i aldehydy. Produkty pośrednie peroksydacji (wodoronadtlenki lipidów, dialdehyd malonowy, izoprostany, 4-hydroksynonenal) mogą prowadzić do dalszych uszkodzeń oksydacyjnych w komórce. Utlenianie fosfolipidów oraz cholesterolu jest przyczyną zmian płynności i przepuszczalności błon komórkowych, co ma poważne konsekwencje dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Utlenianie lipidów tworzących otoczkę mielinową neuronów prowadzi do demielinizacji i rozwoju chorób układu nerwowego [13, 18, 55]. Nitrowanie fosfolipidów błon wpływa na zaburzenie transdukcji sygnału w komórce [7].

Lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) są szczególnie podatne na utleniające i nitrujące działanie nadtlendioazotynu. Akumulacja utlenionego cholesterolu i LDL jest przyczyną rozwoju miażdżycy [56].

Nadtlendioazotyn jako silny związek utleniający i nitrujący jest w stanie wywoływać modyfikacje zasad azotowych. Spośród 4 zasad azotowych nukleotydów największą wrażliwość na jego toksyczne działanie wykazuje guanina. W wyniku

jej utleniania powstaje 8-oksoguanina, która następnie może zostać przekształcona do kwasu cyjanurowego i oksazolonu. W konsekwencji dochodzi do rozerwania pierścienia imidazolowego guaniny i powstania trwałej mutacji. Nadtlenoazotyn powoduje również nitrowanie guaniny, czego produktem jest 8-nitroguanina, traktowana jako specyficzny marker uszkodzeń DNA wywołanych przez ONOO^- [57, 58]. Nadtlenoazotyn poprzez swoje toksyczne działanie przyczynia się do powstawania jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA. W wyniku odłączenia atomu wodoru od deoksyrybozy dochodzi do rozerwania pierścienia cukrowego i przzerwania nici DNA. Powstawanie jednoniciowych pęknięć DNA spowodowanych działaniem ONOO^- obserwuje się głównie w pH zasadowym, podczas gdy liczba uszkodzeń w pH kwaśnym i obojętnym jest dużo niższa. Jednoniciowe pęknięcia DNA powstające na skutek uszkadzającego wpływu nadtlenoazotynu mogą nadmiernie aktywować jądrowy enzym – polimerazę poli(ADP-rybozy) (PARP), co w konsekwencji prowadzi do nekrotycznej śmierci komórki w warunkach stresu oksydacyjnego [59–61].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E.R. Stadtman, R.L. Levine, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, **899**, 191.
- [2] N.R. Madamanchi, A. Vendrov, M.S. Runge, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, **25**, 29.
- [3] K.K. Griending, G.A. FitzGerald, *Circulation*, 2003, **108**, 1912.
- [4] R. Radi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, **101**, 4003.
- [5] H. Ischiropoulos, L. Zhu, J.S. Beckman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **298**, 446.
- [6] D. Salvemini, S. Cuzzocrea, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **33**, 1173.
- [7] C. Szabo, H. Ischiropoulos, R. Radi, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007, **6**, 662.
- [8] J.S. Beckman, T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall, B.A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, **87**, 1620.
- [9] P.C. Dedon, S.R. Tannenbaum, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, **423**, 12.
- [10] J.P. Kamat, *Indian J. Exp. Biol.*, 2006, **44**, 436.
- [11] J.T. Groves, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, **3**, 226.
- [12] L. Liaudet, G. Vassalli, P. Pacher, *Front Biosci.*, 2009, **14**, 4809.
- [13] A. Denicola, R. Radi, *Toxicology*, 2005, **208**, 273.
- [14] R. Radi, G. Peluffo, M.N. Alvarez, M. Naviliat, A. Cayota, *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 463.
- [15] C. Ducrocq, B. Blanchard, B. Pignatelli, H. Ohshima, *Cell Mol. Life Sci.*, 1999, **55**, 1068.
- [16] J.S. Beckman, J. Chen, H. Ischiropoulos, J.P. Crow, *Methods Enzymol.*, 1994, **233**, 229.
- [17] W.A. Pryor, G.L. Squadrito, *Am. J. Physiol.*, 1995, **268**, 699.
- [18] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet, *Physiol. Rev.*, 2007, **87**, 315.
- [19] M.C. Symons, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **78**, 299.
- [20] E. Potargowicz, E. Szerszenowicz, M. Staniszevska, D. Nowak, *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2005, **59**, 259.
- [21] A. Gendzwill, *Pol. Merkur. Lekarski*, 2007, **23**, 280.
- [22] R. Rutkowski, S.A. Panciewicz, K. Rutkowska, J. Rutkowska, *Pol. Merkur. Lekarski*, 2007, **23**, 131.
- [23] F. Krotz, H.Y. Sohn, U. Pohl, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, **24**, 1988.
- [24] R.P. Patel, J. McAndrew, H. Sellak, C.R. White, H. Jo, B.A. Freeman, V.M. Darley-Usmar, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1411**, 385.
- [25] H. Puzanowska-Tarasiewicz, L. Kuzmicka, M. Tarasiewicz, *Pol. Merkur. Lekarski*, 2009, **27**, 338.

- [26] R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, *Nature*, 1980, **288**, 373.
- [27] R.M. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada, *Nature*, 1987, **327**, 524.
- [28] M.C. Carreras, J.J. Poderoso, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2007, **292**, 1569.
- [29] M. Mielczarek-Putka, A. Chrzanowska, W. Grabon, A. Baranczyk-Kuzma, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2008, **62**, 214.
- [30] B. Alvarez, R. Radi, *Amino. Acids*, 2003, **25**, 295.
- [31] R. Meli, T. Nauser, P. Latal, W.H. Koppenol, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2002, **7**, 31.
- [32] O. Augusto, M.G. Bonini, A.M. Amanso, E. Linares, C.C. Santos, S.L. De Menezes, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 841.
- [33] J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 14210.
- [34] R. Radi, J.S. Beckman, K.M. Bush, B.A. Freeman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, **288**, 481.
- [35] H. Gunaydin, K.N. Houk, *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, **22**, 894.
- [36] M.P. Jensen, D.P. Riley, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 4788.
- [37] A. Korkmaz, S. Oter, M. Seyrek, T. Topal, *Interdiscip. Toxicol.*, 2009, **2**, 219.
- [38] G. Ferrer-Sueta, R. Radi, *ACS Chem. Biol.*, 2009, **4**, 161.
- [39] P. Nowak, B. Olas, B. Wachowicz, *Postepy Biochem.*, 2010, **56**, 239.
- [40] C. Szabo, *Toxicol. Lett.*, 2003, **140-141**, 105.
- [41] S.V. Lymar, Q. Jiang, J.K. Hurst, *Biochemistry*, 1996, **35**, 7855.
- [42] S. Zhu, K.F. Basiouny, J.P. Crow, S. Matalon, *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, 2000, **278**, 1025.
- [43] J.M. Souza, G. Peluffo, R. Radi, *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, **45**, 357.
- [44] L. Gebicka, J. Didik, *Postepy Biochem.*, 2010, **56**, 103.
- [45] S. Bartesaghi, G. Ferrer-Sueta, G. Peluffo, V. Valez, H. Zhang, B. Kalyanaraman, R. Radi, *Amino. Acids*, 2007, **32**, 501.
- [46] C. Vadseth, J.M. Souza, L. Thomson, A. Seagraves, C. Nagaswami, T. Scheiner, J. Torbet, G. Vilaire, J.S. Bennett, J.C. Murciano, V. Muzykantov, M.S. Penn, S.L. Hazen, J.W. Weisel, H. Ischiropoulos, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 8820.
- [47] B. Pignatelli, C.Q. Li, P. Boffetta, Q. Chen, W. Ahrens, F. Nyberg, A. Mukeria, I. Bruske-Hohlfeld, C. Fortes, V. Constantinescu, H. Ischiropoulos, H. Ohshima, *Cancer Res.*, 2001, **61**, 778.
- [48] N.W. Kooy, J.A. Royall, Y.Z. Ye, D.R. Kelly, J.S. Beckman, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **151**, 1250.
- [49] B. Lipinski, *J. Diabetes Complications*, 2001, **15**, 203.
- [50] B. Alvarez, G. Ferrer-Sueta, B.A. Freeman, R. Radi, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 842.
- [51] A. van der Vliet, P.A. Hoen, P.S. Wong, A. Bast, C.E. Cross, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 30255.
- [52] W.A. Pryor, X. Jin, G.L. Squadrito, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 11173.
- [53] B.S. Berlett, R.L. Levine, E.R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, **95**, 2784.
- [54] M. Tien, B.S. Berlett, R.L. Levine, P.B. Chock, E.R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 7809.
- [55] R.G. Brannan, E.A. Decker, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 3074.
- [56] H. Botti, A. Trostchansky, C. Batthyany, H. Rubbo, *IUBMB. Life*, 2005, **57**, 407.
- [57] T. Douki, J. Cadet, *Free Radic. Res.*, 1996, **24**, 369.
- [58] V. Yermilov, J. Rubio, H. Ohshima, *FEBS Lett.*, 1995, **376**, 207.
- [59] H. Ohshima, L. Virag, J. Souza, V. Yermilov, B. Pignatelli, M. Masuda, C. Szabo, *Methods Mol. Biol.*, 2002, **186**, 77.
- [60] C. Szabo, H. Ohshima, *Nitric. Oxide.*, 1997, **1**, 373.
- [61] C. Szabo, *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, **21**, 855.