



Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju

Mr sci Višnja Bogdanović

**REDOKS REGULACIJA ĆELIJSKOG CIKLUSA AZOT
OKSIDOM**

- doktorska disertacija -

Novi Sad, 2007.

Zahvalnica

Eksperimentalni deo istraživanja ove doktorske disertacije je urađen u Laboratoriji Zavoda za Eksperimentalnu onkologiju Instituta u Sremskoj kamenici i Departmanu za biohemiju Instituta za biologiju Prirodno-Matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Ovom prilikom se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Gordani Grubor-Lajšić, kao i prof. dr Kseniji Kuhajdi bez čije pomoći, vođstva, stručnih i prijateljskih saveta ovaj rad ne bi nikada bio završen.

Iskrenu zahvalnost upućujem načelnici zavoda za Eksperimentalnu onkologiju dr Gordani Bogdanović na stručnoj pomoći, dubokom razumevanju i toplom odnosu koji je tokom desetogodišnje saradnje odavno prevazišao granice službenog.

Duboko poštovanje i zahvalnost za početnu ideju, veru u uspeh, uvažavanje, nesebično deljenje znanja i empatiju kroz sve ove godine i sve etape nastanka teze dugujem prof.dr Mihajlu B. Spasiću.

Svim svojim kolegama sa Instituta za onkologiju i Departmana za biohemiju, a posebno, Jasmini Mrđanović, Slavici Šolajić i Bojani Stanić zahvaljujem se na podršci koju su mi pružali i pružaju mi je kao saradnici i prijatelji.

Kolegama Dimitru Jakimovu i dr Dušku Blagojeviću hvala na trudu da ovaj rad izgleda što bolje.

Porodici i prijateljima hvala što su uz mene i daju mi oslonac da ustrajem u svom radu.

Hvala Branislavu i deci, mojim zvezdama vodiljama, uz koje svaki uspeh ima veći sjaj.

U Novom Sadu, 2007.

Višnja V. Bogdanović

Sadržaj:

Zahvalnica.....	2
Skraćenice.....	6
1. Uvod.....	9
1.1. Čelija kao redoks sistem	10
1.2. Glutation (GSH) sistem i ćelijsko redoks okruženje	11
1.3. Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH/NAD ⁺) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfatni sistem (NADPH/ NADP ⁺).....	11
1.4. Tiodredoksin sistem (TrxSS/Trx(SH) ₂)	12
1.5. Uloga proteinskih tiola u ćelijskom redoks statusu	13
1.6. Čelijska redoks homeostaza i ćelijski ciklus	13
1.7. Oksidativno-antioksidativni sistem održavanja redoks homeostaze	16
1.8. Reaktivne vrste kiseonika (ROS).....	17
1.8.1. Superoksid anjon radikal (O ₂ ⁻)	18
1.8.2. Vodonik peroksid (H ₂ O ₂).....	18
1.8.3. Hidroksil radikal (·OH)	19
1.8.4. Singlet kiseonik ¹ O ₂ *	19
1.9. Proces lipidne peroksidacije	19
1.10. Antioksidativni zaštitni sistem (AOS).....	20
1.10.1. Enzimske komponente AOS.....	20
1.10.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD) E.C.1.15.1.1.....	20
1.10.1.2. Glutation peroksidaza (GSH-Px) EC 1.11.1.9.....	21
1.10.1.3. Katalaza (CAT) E.C.1.11.1.6.	22
1.10.2. Neenzimske komponente AOS.....	22
1.10.2.1. Antioksidanti male molekulske mase	22
Vitamin E (α tokoferol)	22
Vitamin C (askorbinska kiselina)	23
Mokraćna kiselina.....	23
Glutation (GSH).....	23
1.11. Uloga proteina u antioksidativnoj zaštiti ćelije	24
1.12. Azot monoksid (NO)	24
1.12.1. Biosinteza NO.....	25
1.12.2. Neenzimsko nastajanje azot monoksida	26
1.12.3. Biohemijski i molekularni mehanizmi delovanja azot monoksida.....	26
1.12.4. Direktno dejstvo azot monoksida	28
1.12.4.1. Reakcije NO u prelaznim metalima bioloških sistema.....	28
1.12.4.2. Reakcije NO sa proteinima koji sadrže hem	29
1.12.4.3. Reakcija azot monoksida sa nehemski vezanim gvoždem	30
1.12.4.4. Dinitrozil kompleksi gvožđa (DNIC) u biološkim sistemima.....	30
1.12.4.5. S-nitrozilovanje	31
1.12.4.6. Nitrovanje tirozina <i>in vivo</i>	32

1.12.5. Indirektni efekti azot monoksida	35
1.12.5.1. Reaktivne vrste NO (RNOS)	35
1.12.5.2. Reakcija NO sa O ₂ : NO _x	36
1.12.5.3. Reakcija nastanka peroksinitrita.....	36
1.12.5.4. Redoks-srodnici NO: NO ⁺ i NO ⁻ vrste	38
1.12.5.5. DNIC kompleksi i nastajanje NO ⁺ i NO ⁻ vrsta.....	39
1.12.5.6. Reakcije NO ⁺ vrste u biološkim sistemima.....	40
1.12.5.7. O-Nitrozovanje	40
1.12.5.8. S-Nitrozovanje.....	40
1.12.5.9. N-Nitrozovanje primarnih i sekundarnih amina.....	41
1.12.5.10. C-Nitrozovanje	42
1.12.5.11. Reakcije HNO/NO ⁻ vrste u biološkim sistemima.....	42
1.12.6. Uloge azot monoksida u fiziologiji i patofiziologiji ćelije.....	44
1.12.6.1. Jedinjenja koja oslobađaju azot monoksid	46
Natrijum nitroprusid	47
2. Cilj.....	48
3. Materijal i metode	49
3.1. Ćelijske kulture i njihovo održavanje	49
3.1.1. Priprema ćelija	49
3.1.2. Priprema SNP.....	49
3.1.3. Priprema SOD	49
3.2. Opis eksperimenta	49
3.3. Metode korišćene u eksperimentu	50
3.3.1. DET test	50
3.3.2. SRB test	51
3.3.3. MTT test.....	51
3.3.4. Test inkorporacije ³ H timidina.....	52
3.3.5. Određivanje ukupnih proteina.....	52
Princip metode	52
Reagensi.....	52
Postupak.....	52
3.3.6. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (SOD).....	52
Princip metode	53
Reagensi.....	53
Rastvor A:.....	53
Rastvor B:	53
Reakciona smeša:.....	53
Izračunavanje	53
3.3.7. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH + GSSG).....	53
Princip metode	53
Reagensi.....	54
Reakciona smeša:.....	54
Izračunavanje	54
3.3.8. Određivanje slobodnih tiolnih grupa.....	54
Rastvori.....	54
Eksperimentalni postupak.....	54

3.4. Statistička obrada podataka	54
4. Rezultati	55
4.1. Eksperiment sa ćelijama mišijih fibroblasta (L929)	55
4.1.1. Efekti natrijum-nitroprusida na broj ćelija praćeni testom odbacivanja boje (DET) na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)	55
4.1.2. Citotoksićnost natrijum-nitroprusida praćena SRB testom na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)	56
4.1.3. Citotoksićnost natrijum-nitroprusida praćena MTT testom na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)	57
4.1.4. Efekti natrijum-nitroprusida na broj ćelija, vijabilnost i preživljavanje na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)	58
4.1.5. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina u ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)	60
4.1.6. Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD u uzorcima ćelijske linije mišijih fibroblasta (L929)	62
4.1.7. Efekti SNP na koncentraciju ukupnog glutaciona (GSH +GSSG) u uzorcima ćelijske linije mišijih fibroblasta (L929)	63
4.1.8. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa u uzorcima ćelijske linije mišijih fibroblasta (L929)	64
4.2. Eksperiment sa ćelijama humane eritroleukemije (K562)	66
4.2.1. Efekti natrijum-nitroprusida na broj ćelija praćeni testom odbacivanja boje (DET) na ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)	66
4.2.2. Citotoksićnost natrijum-nitroprusida praćena SRB testom na ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)	67
4.2.3. Citotoksićnost natrijum-nitroprusida praćena MTT testom na ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)	68
4.2.4. Indeks proliferacije ćelija humane eritroleukemije (K562) praćen inkorporacijom ³ H timidina	69
4.2.5. Efekti natrijum-nitroprusida na broj ćelija, vijabilnost i preživljavanje na ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)	70
4.2.6. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina u ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)	72
4.2.7. Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD u uzorcima ćelijske linije humane eritroleukemije (K562)	74
4.2.8. Efekti SNP na koncentraciju ukupnog glutaciona (GSH+GSSG) u uzorcima ćelijske linije humane eritroleukemije (K562)	75
4.2.9. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa u uzorcima ćelijske linije humane eritroleukemije (K562)	76
4.3. Rezultati dvofaktorske analize varijanse (two-way ANOVA)	78
5. Diskusija	86
6. Zakljućci	93
7. Literatura	95

Skraćenice

$^1\text{O}_2^*$	- singlet kiseonik
$^3\text{H-Thy}$	- ^3H timidin
8-OH dG	- 8-hidroksi deoksoguanozin
AOS	- antioksidativni zaštitni sistem odbrane
AP-1	- aktivator protein 1
ATP	- adenzin trifosfat
CaM	- kalmodulin
CAT	- katalaza
cGMP	- ciklični gvanozin-monofosfat
CGRP	- kalcitonin gen-srodni peptid
Cis	- cistein
CN^-	- cijanidni jon
CO	- ugljen-monoksid
CO_2	- ugljen-dioksid
CPR	- citohrom P450
Cu,Zn-SOD	- superoksid dismutaza koja sadrži Cu, Zn
DET, MTT i SRB	- testovi citotoksičnosti
DNIC	- dinitrozil kompleks gvožđa
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB	- 5,5-ditio-bis-nitrobenzoeva kiselina
EC-SOD	- ekstracelularna forma enzima
EDTA	- etilen diamin tetrasirćetna kiselina
EGF	- epidermalni faktor rasta
eNOS	- endotelna NO-sintaza
ER	- endoplazmatski retikulum
FAD	- flavin adenin dinukleotid
FADH_2	- redukovani flavin adenin dinukleotid
FCS	- fetalni teleći serum
Fe^{2+} (Fe^{3+})	- fero i feri oblik atoma gvožđa
Fe-SOD	- superoksid dismutaza koja sadrži Fe
FMN	- flavin adenin mononukleotid
Glu	- glutamin
Gly	- glicin
GMP	- gvanozin-monofosfat
GR	- glutation reduktaza
GSH	- redukovani glutation
GSH-Px	- glutation peroksidaza
GSNO	- s-nitrozoglutation
GSSG	- oksidovani glutation
GTP	- gvanozin-trifosfat
H^+	- hidronijum jon
H_2O_2	- vodonik peroksid
H4B	- tetrahidrobiopterin
Hb	- hemoglobin
HbNO	- nitrozil hemoglobin
HbO_2	- oksihemoglobin
HOCl	- hipohlorit

HP-Fe ³⁺	- feril π katjon radikal
iNOS	- inducibilna NO-sintaza
K562	- kultura čelija humane eritroleukemije
L929	- kultura čelija mišijih fibroblasta
LOOH	- lipidni hidroperoksid
MDA	- malondialdehid
metHb	- methemoglobin
MNO	- metal-nitrozil kompleks
Mn-SOD	- superoksid dismutaza koja sadrži Mn
MPO	- mijeloperoksidaze
mRNK	- informaciona ribonukleinska kiselina
NAD ⁺	- nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	- redukovani nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH/NADP ⁺	- nikotinamid adenin dinukleotid fosfatni sistem
TrxSS/Trx(SH) ₂	- tioredoksin sistem
NF- κ B	- nuklearni faktor κ B
Ni-SOD	- superoksid dismutaza koja sadrži Ni
NMDA	- N-metil-d-aspartat
nNOS	- neuronalna NO-sintaza
NO	- azot oksid
NO ⁻	- nitroksil anjon
NO ⁺	- nitrozonijum katjon
NO \cdot	- azot oksid radikal
NO ₂	- azot dioksid
NO ₂ Cl	- nitril hlorid
NOS	- NO-sintaza
NO _x	- viši oksidi azota
NT-paza	- enzim nukleotransportaza
O ₂ ⁻	- superoksid anjon radikal
OH	- hidroksil radikal
ONOO ⁻	- peroksinitritni anjon
ONOOH	- peroksinit
ONOOH*	- ekscitovani konformer peroksinita
OxP	- oksidativna fosforilacija
PDI	- protein disulfid izomeraza
Ph GSH-Px	- fosfolipid-hidroperoksid glutation–peroksidaza
PO ₄ -Tyr	- fosfotirozin
PS-SG	- mešani disulfid
PS-SP	- disulfid
PTEN	- supresor proteina
RNK	- ribonukleinska kiselina
RNS	- reaktivne azotne vrste
ROS	- reaktivne kiseonične vrste
RPMI 1640, DMEM	- medijumi za održavanje čelijskih kultura
RR'N-NO	- nitrozamini
RS \cdot	- tiol radikal
RSNO	- S-nitrozotioli
sCG	- solubilna gvanilat ciklaza
-SH	- tiolna grupa
SNP	- natrijum-nitroprusid

SOD-Cu ²⁺ -OH·	- superoksid anjon radikal
TCA	- trihlorsirćetna kiselina
TNB	- 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina
Tyr	- tirozil radikal
XOD	- ksantin oksidaza

1. Uvod

U aerobnoj ćeliji je pretežno redukovana sredina koja pogoduje odvijanju ćelijskog metabolizma u granicama homeostaze. Balans redoks potencijala u živoj ćeliji predstavlja imperativ održavanja zdravog fenotipa, i u krajnjem, njenog preživljavanja (1). Oksidativno okruženje ćelije nametnulo je aerobnim organizmima potrebu za razvijanjem mehanizama održavanja postojećeg redoks stanja unutar ćelije, a potom i za odbranu od oksidacionog oštećenja. Nitrozativni stres može ozbiljno narušiti ćelijsku redoks homeostazu i, u kombinaciji sa oksidativnim stresom, uticati na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, a u nekim slučajevima i na aktivaciju maligne transformacije (2).

Ćelije koje započinju sa neoplastičnom transformacijom prolaze kroz niz izmena u metabolizmu. Jedna od univerzalnih karakteristika svih malignih ćelija je defekt u metabolizmu glukoze (3). Ćelije tumora imaju povišen nivo glikolize u kombinaciji sa sniženom respiracijom (4). Ove promene u metabolizmu praćene su povišenim oksidativnim stresom poreklom od superoksida nastalog u mitohondrijama (5). Kao rezultat ove pojave u ćeliji se javlja oksidovano stanje koje pogoduje imortalizaciji, stimuliše proliferaciju i podržava razvoj malignog fenotipa (3). Pro-oksidanti stimulišu ćelijsku proliferaciju, mutacije i genomsku nestabilnost, dok antioksidanti inhibiraju ove procese. Većina mutacija bitna za aktivaciju onkogeni uključuje redoks-senzitivna regulatorna mesta, što dovodi do gubitka normalne redoks kontrole ćelijskog rasta i razvoja (6-10).

Apoptoza je potencijalno protektivni mehanizam u odnosu na egzogene karcinogene i inflamatorna stanja koji je delimično regulisan ćelijskim redoks statusom. Generalno, ćelijski redoks stanje ima značajan uticaj na kontrolu ćelijskog preživljavanja, apoptoze i ekspresiju tumor supresornih gena (2,11-15).

Kao predmetu aktuelnih istraživanja u medicini i biohemiji i temi mnogobrojnih publikacija, azot oksidu (NO) često se pripisuje kontroverzna uloga. NO izaziva različite efekte u zavisnosti od eksperimentalnog modela, svoje relativne koncentracije kao i okruženja u kojem nastaje (16). Dobro proučeni mehanizmi regulacije procesa kao što su kontrola vaskularnog tonusa i adhezija krvnih pločica koji su posredovani azot oksidom na molekularnom nivou uključuju aktivaciju solubilne guanilat ciklaze (sGC) i povećanje nivoa cikličnog GMP koji je drugi glasnik i amplifikator mnogih fizioloških odgovora što spada u direktne efekte ovog molekula (6,17). Širok spektar drugih, indirektnih efekata koje izaziva azot oksid, do toksičnih, nije posredovan prethodnim mehanizmom (7).

Hemijska priroda azot oksida ukazuje na mogućnost reakcija sa reaktivnim vrstama nastalim iz molekularnog kiseonika i to je predmet intenzivnog proučavanja. Ispitivanja mogućnosti direktne transformacije azot oksida u redoks aktivne vrste kao što su nitrozonijum katjon (NO^+) i nitroksil anjon (NO^-/HNO) i direktni efekti tih redoks potomaka u ćeliji tek su u začetku. Njihov značaj raste paralelno sa porastom interesovanja za redoks regulaciju ćelijskog ciklusa (8).

Kultura ćelija kao sistem sa kontrolisanim uslovima predstavlja pogodan model za izučavanje elementarnih procesa rasta, razvoja i deobe ćelija, kao i biohemijskih i populacionih fenomena. Ćelije u kulturi zadržavaju mnoge osobine tkiva od kojeg su potekle, međutim, stiču i neke specifičnosti vezane za gajenje *in vitro*. Zbog rasta u sudovima za kulturu, one uglavnom opstaju u jednoslojnoj ("monolayer") grupaciji ćelija. Za razliku od tumorskog tkiva u organizmu, koje je stalno izloženo varijacijama u nivou kiseonika, ćelijske linije u *in vitro* uslovima neprekidno su eksponirane podjednako visokom nivou kiseonika i nemaju komunikaciju sa drugim tipovima ćelija. U ovakvim uslovima, u samim ćelijama je vrlo niska produkcija oksidanata, i, posledično, niska aktivnost antioksidativnih enzima (9,10,16,17).

U ovom radu ispitivani su efekti donora NO natrijum-nitroprusida (koji se i klinički koristi u tretmanu akutnih hipertenzivnih kriza) na dve ćelijske linije u kulturi: ćelije mišijih fibroblasta (L929) koje su transformisane, sa potencijalnim kapacitetom da izazovu fibrosarkom i ćelije humane eritroleukemije (K562) koje su sa malignim karakteristikama (18,19). Obe ćelijske linije su asinhrono, brzoproliferišuće, sa kratkim vremenom udvajanja (doubling time) koje iznosi 20-30 sati. Natrijum- nitroprusid (SNP) je fotoreativan molekul sa veoma kratkim poluživotom koji izaziva koncentraciono - zavisnu proliferaciju ili inhibiciju ćelijskog rasta *in vitro* (9).

Činjenice na kojima se zasnivaju polazne postavke ovog eksperimenta su da SNP daje smešu NO i NO⁺ u odnosu 1: 2.3 (16). Superoksid dismutaza koja sadrži Mn (Mn-SOD) katalizuje transformaciju NO u redoks aktivne jone NO⁺ i NO⁻. Ovo se ne dešava u prisustvu Cu,Zn-SOD. Paralelnom primenom ovih enzima sa SNP postiže se da aktivne vrste čije se delovanje na ćelije ispituje budu NO i NO⁺ u eksperimentalnoj grupi tretiranoj sa SNP, NO, NO⁺ i H₂O₂ u grupi gde je dodat i Cu,Zn-SOD i NO⁺, NO⁻ i H₂O₂ u grupi uzoraka pretretiranih sa Mn-SOD. Pritom, očekivano je se da se u seriji eksperimenata dobiju podaci o efektima NO i njegovih redoks potomaka na transformisanu i malignu ćelijsku liniju.

U prvom delu eksperimenta smo pomoću testa odbacivanja boje (DET), i dva kolorimetrijska testa (MTT i SRB) na obe ćelijske linije odredili koncentraciju natrijum nitroprusida i optimalno vreme njegovog delovanja. Nakon dodavanja natrijum nitroprusida određene koncentracije u datom vremenskom periodu u kombinaciji sa Mn-SOD i Cu,Zn-SOD, pratili smo broj, vijabilnost i procenat preživljavanja ćelija testom odbacivanja boje (DET), kao i aktivnost ukupnog SOD. Praćenjem intracelularnih markera kao što je količina slobodnih tiolnih grupa i glutationa pretpostavljeno je da će se dobiti uvid i u molekulske mehanizme za objašnjenje efekata azot oksida i njegovih redoks potomaka i objašnjenje za eventualne razlike u odgovoru transformisanih i malignih ćelijskih linija.

1.1. Ćelija kao redoks sistem

Živa ćelija je složen sistem koji funkcioniše zahvaljujući stalnoj entropiji i protoku energije. U organizmu ona se obezbeđuje iz oksidacionih procesa i služi da:

- izgrađuje strukture ćelije i organizma
- održava njihovu funkcionalnost
- obezbedi energiju za sve procese u ćeliji i organizmu .

Kretanjem elektrona od oksidujućih organskih molekula do kiseonika oslobađa se energija, što održava ukupnu redukujuću sredinu u ćelijama i tkivima. Redoks parovi odgovorni za protok elektrona vezani su tako da funkcionišu kao setovi zavisni jedni od drugih (16).

Redoks sredina povezanih redoks parova u biološkim tečnostima, organelama, ćelijama ili tkivima je zbir produkata redukcionog potencijala i redukujućeg kapaciteta (16,17).

Redoks status redoks para je definisan polućelijskim redukcionim potencijalom i redukujućim kapacitetom tog para. Redukcioni potencijal se izražava Nernstovom jednačinom:

$\Delta E = \Delta E^{\circ} - RT/nF \ln Q$ pri čemu je:

R - gasna konstanta = 8.314 JK⁻¹mol⁻¹

T- temperatura (K)

F- Faradejeva konstanta = 9,6485 x 10⁴ C mol⁻¹

Nernstova jednačina na T=37°C (310 K) je:

$\Delta E = \Delta E^{\circ} - 61.5 \text{ mV}/n \log Q$.

Sa termodinamičke tačke gledišta, živa ćelija nije u ravnoteži sa okolinom. Ravnoteža se uspostavlja sa ćelijskom smrću, pri čemu $\Delta E=0$. Unutar ćelije odvijaju se hemijske reakcije kojima se teži postizanje nultog potencijala. Većina reakcija se održava u stanju neravnoteže. Međutim, čim je koncentracija redoks parova kraće vreme stabilna, može se izračunati Nernstova jednačina, kako za svaku pojedinačnu polućeliju, tako i za čitav sistem. Većina redoks reakcija je pH-zavisna. S obzirom da dramatično može promeniti polućelijski potencijal, i koncentracija H^+ jona se mora uzeti u obzir prilikom razmatranja redoks statusa jedne ćelije (16).

1.2. Glutation (GSH) sistem i ćelijsko redoks okruženje

Par redukovani/oksidovani glutacion (2GSH/GSSG) u ćeliji obezbeđuje vrlo visok pul redukujućih ekvivalenata i predstavlja ćelijski redoks pufer. Zbog toga, redoks status ovog para može služiti kao indikator redoks sredine u ćeliji.

GSH i GSSG se nalaze i van ćelije, ali u vrlo malim količinama. Ekstraćelijski glutacion učestvuje u procesima detoksifikacije, ali je njegova koncentracija 100 do 1000 puta manja nego u ćeliji. Jetra je glavni organ za sintezu i eksport GSH u plazmu u fiziološkom metabolizmu. Takođe, do transporta GSSG dolazi i kada su ćelije i tkiva u oksidativnom stresu (7).

Najveća koncentracija intraćelijskog glutaciona je u citosolu koji je i mesto njegove biosinteze (6). Između GSH u citosolu i u drugim delovima ćelije dolazi do izmene, a postoje i ćeljski kompartmenti koji imaju sopstveni pul GSH, nezavisan od citosolskog. GSH u jedru održava redoks status proteinskih tiola koji su neophodni za ekspresiju i reparaciju nukleinskih kiselina.

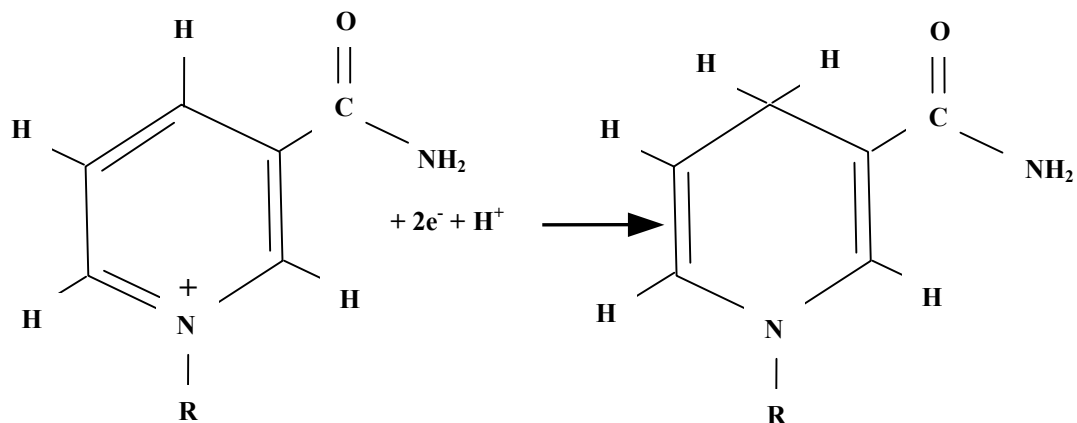
Za razliku od mitohondrija i jedra, endoplazmatski retikulum predstavlja oksidovanu sredinu. U njemu je odnos GSH/GSSG 1:1 do 3:1. Ovo je veoma nisko u odnosu na ukupan odnos u ćeliji koji iznosi od 30 do 100:1. Oksidovano okruženje u endoplazmatskom retikulumu je neophodno zbog produkcije proteina sa disulfidnim vezama.

Oksidativni stres dovodi do formiranja GSSG na račun GSH. Ova promena odnosa GSH/GSSG menja redoks status ka pozitivnijem potencijalu. Ako je promena isuviše velika, ona može biti kobna za ćeliju. Eksport GSSG može sprečiti ovu promenu i zato je sposobnost transporta ovog molekula veoma bitan faktor u osetljivosti ćelija na oksidativni stres. Uloga GSH u održavanju ćelijske redoks - homeostaze je ključna jer on održava druge antioksidante (npr. α tokoferol i β karoten) u redukovanoj formi (8).

1.3. Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH/NAD⁺) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfatni sistem (NADPH/ NADP⁺)

Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH/NAD⁺) predstavlja sistem za prenos hidronijum jona (H^+) u kome dolazi do dvoelektronskog redoks procesa. Odnos između njegovih redukujućih parova je između 1:10 i 1:1000. NAD⁺ zavisne reakcije su uglavnom oksidativne (katabolitičke). U respiratornom lancu mitohondrija u toku procesa reoksidacije NADH do NAD⁺ spregnutom reakcijom nastaje i ATP.

NADPH je glavni izvor elektrona za reduktivnu biosintezu, kao i za glutationski sistem. Pri oksidaciji do NADP⁺ (Slika 1), on obezbeđuje dva elektrona (hidronijum jon), pri čemu svaki jedno-elektronski proces ima svoj redukcionni potencijal. Produkt je pentozofosfatnog puta razlaganja glukoze i kao takav je bitan za sintezu masnih kiselina i steroida.



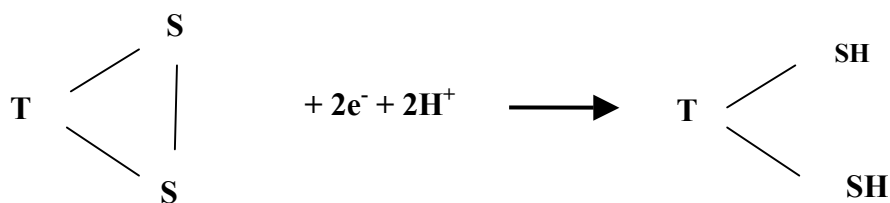
Slika 1: Oksidacija NADPH (16).

Polućelijski potencijal za NADP⁺/NADPH par je nezavisan od apsolutnih koncentracija pojedinačnih grupa. Za održavanje redukcionog potencijala bitan je samo njihov međusobni odnos koji iznosi otprilike 100:1 (9).

1.4. Tioredoksin sistem (TrxSS/Trx(SH)₂)

Tioredoksin je još jedan važan tiol-sistem u ćeliji. On redukuje cisteinske ostatke u DNK-vezujućim mestima nekoliko transkripcionih faktora i zbog toga je bitan u genskoj ekspresiji (10, 20). Intraćelijske koncentracije tioredoksina kreću se u granicama od 1 do 15 μM (20) i 100 do 1000 puta su manje nego koncentracije glutaciona. Tioli sisarskog tioredoksina služe kao donori elektrona za ribonukleotid reduktazu kao i metionin sulfoksid reduktazu.

Za razliku od malog molekula - antioksidanta glutaciona koji obrazuje inter-molekulske disulfide, tioredoksin najčešće formira intra-molekulske disulfide (Slika 2). Redukcija disulfida do forme ditiola je katalisana tioredoksin reduktazom, dok je izvor elektrona NADPH (21,22).



Slika 2. Redukcija intramolekuskog disulfida do ditiola (16).

1.5. Uloga proteinskih tiola u ćelijskom redoks statusu

Mnogobrojni proteini sadrže tiolne grupe (PSH) poreklom od cisteina. U ćelijama i tkivima koncentracija tiolnih grupa je mnogo veća nego koncentracija redukovano glutaciona (11). Ove grupe mogu biti prisutne kao tioli (-SH), disulfidi (PS-SP) ili kao mešani disulfidi, na primer PS-SG kada konjugiraju sa GSH. Proteini mogu vezivati GSH, cistein, homocistein i γ -glutamil cistein pri nastanku mešanih disulfida. Međutim, GSH je dominantan ligand (24). Oksidacija tiola ili redukcija disulfida na enzimu može dovesti do aktivacije ili inaktivacije enzimske funkcije (25, 26). S-tiolacija-detiolacija proteina je dinamičan proces koji se dešava u fiziološkim uslovima u ćeliji. Ovaj proces je reverzibilan i dešava se različitom brzinom u zavisnosti od vrste proteina i prirode tiolnih grupa u proteinu. S-glutatioilacija/deglutatioilacija proteina može, u nekim slučajevima, biti odraz redoks stanja GSH - sistema u ćeliji (27). Oksidacija proteinskih sulfhidrila do mešanih disulfida je rani ćelijski odgovor na oksidativni stres. PSH igraju važnu ulogu u oksidativnom oštećenju i imaju uticaj na redoks stanje u ćeliji (24).

1.6. Ćelijska redoks homeostaza i ćelijski ciklus

Protok elektrona i /ili protona je ključna komponenta života u ćeliji i bez njega ne funkcioniše ni jedna ćelijska organela. Zbog toga ne čudi što je ćelijska membrana, kao granica između spoljnog i unutrašnjeg redoks stanja, mesto aktivne izmene ovih i drugih naelektrisanih vrsta. Protoni prolaze membransku barijeru pomoću specijalizovanih molekula, dok su elektroni "ugrađeni" u nju, učestvujući u održavanju transmembranskog potencijala. Generalno, površina membrane sisarskih ćelija je izložena oksidovanom okruženju, dok se u citosolu održava redukovana sredina.

Produkcija superoksid radikala membranski-vezanim enzimom NADPH oksidazom u fagocitima je već dugo poznat fenomen pripisivan sposobnosti ovih ćelija da ubijaju bakterije (28). Danas se zna da gotovo sve vrste ćelija u svojoj membrani imaju izoforme NADPH oksidaza (29). Membranske NADPH oksidaze i NADH reduktaze proizvode reaktivne kiseonične vrste (ROS) uključene u kontrolu funkcija membrane kao što su aktivnost protonske pumpe i jonskih kanala (30). Membranske oksidoreduktaze koje pomeraju elektrone od citosolnog NADH do spoljašnjeg akceptora elektrona, kao što je kiseonik, su veoma značajne u održavanju ćelijske redoks homeostaze. Danas je poznato da postoje i spoljašnje NAD(P)H oksidaze, ali njihova veza sa transmembranskim oksidazama nije još u potpunosti razjašnjena (31).

Endoplazmatski retikulum (ER) predstavlja mesto u čijim lumenima se odvijaju intenzivne redoks reakcije. U endoplazmatskom retikulumu održava se visok nivo oksidovanog glutaciona kao pogodna sredina za sintezu proteina *de novo*. Enzim koji katališe nastanak, redukciju i izomerizaciju disulfidnih veza u nosintetisanim proteinima je protein disulfid izomeraza (PDI), koji pripada tioredoksinskoj klasi proteina (32). Pritom, najnovijim otkrićima iz 2004 godine, pretpostavlja se da u ER postoji i protein koji služi kao oksidaza za PDI, tako da GSH nije izvor oksidujućih ekvivalenata u procesu proteinske sinteze (17).

Za razliku od ER, funkcionisanje Goldži aparata nije neposredno zavisno od redoks stanja; umesto toga on zahteva precizan pH gradijent. Međutim, oksidativni stres itekako narušava funkciju ove organele dovodeći do njene fragmentacije i do specifične promene u transportu različitih proteina do ćelijske površine. Mehanizam ovih promena još uvek nije u potpunosti razjašnjen.

Mitohondrije su mesto oksidacije masnih kiselina i ciklusa limunske kiseline u kojima se proizvode NADH i FADH₂. Ovi molekuli prenose elektrone do respiratornog lanca i krajnje, do kiseonika, u procesu u kojem nastaje ATP. Mitohondrije su takođe i mesto nastanka ROS,

koji, direktno ili indirektno, učestvuju u izazivanju ćelijske smrti. (33). Da bi sprečile oksidativno oštećenje svojih sopstvenih proteina, mitohondrije poseduju složen antioksidativni sistem koji uključuje antioksidante (GSH, NADH i tioredoksin), kao i enzime Mn-SOD, katalazu, glutation reduktazu i glutation peroksidazu (34).

Lizozomi i peroksizomi su uključeni uglavnom u kataboličke procese, ali imaju i druge funkcije u ćeliji. Za njihovo funkcionisanje neophodan je određen pH gradijent i redoks okruženje, a reakcije koje se u njima dešavaju su pretežno oksidativne. Oksidativni stres u ovim kompartmentima vodi ćeliju u smrt po apoptotskom ili nekrotskom obrascu.

Najnovijim otkrićima prepostavlja se da je u jedru redoks okruženje slične prirode kao u ER. Poznato je da je jedro odvojeno od citoplazme dvostrukom membranom, kroz koju dolazi do nukleo-citoplazmatske izmene preko kompleksa nuklearnih pora. Ovaj proces nije pasivan događaj i kontrolisan je aktivnošću enzima nukleotransportaze (NT-paze). Aktivnost ovog enzima je modulirana sadržajem holesterola u jedrovoj membrani. Naime, oksidacija holesterola inhibiše NT-pazu. Na taj način oksidativni stres može sniziti nivo nukleoplazmatskog transporta (17).

I oksidativni i reduktivni stres mogu pokrenuti redoks kaskade koje dovode do promena u tiol statusu ćelija. Promene u redoks statusu mogu pokrenuti signalnu transdukciju, sintezu DNK i RNK i proteina, aktivaciju enzima, pa čak i regulaciju ćelijskog ciklusa (35,36).

Aktivnosti kao što je vezivanje za ligande, vezivanje za DNK i nuklearna translokacija su takođe pod redoks kontrolom. (37). Većina eukariotskih transkripcionih faktora je aktivna samo u redukovanoj formi, a translokacija transkripcionih faktora do nukleusa je često redoks-zavisna (38).

U zaštiti jedra od oksidativnog stresa aktivni su glutation i tioredoksin sistem (39).

Razvoj ćelija i njihova diferencijacija u neonatalnim tkivima dešavaju se u redukovanom okruženju gde je koncentracija GSH visoka, a aktivnost antioksidativnih enzima niska.

Sandritter i Krygier su otkrili da se količina protein-vezanih tiolnih grupa u HeLa ćelijama povećava u premitotskoj fazi, snižava sa formiranjem mitotskog aparata i ponovo raste na kraju ćelijske deobe. Mnogi novi podaci ukazuju da nivo intraćelijskog GSH varira tokom ćelijskog ciklusa (40-42).

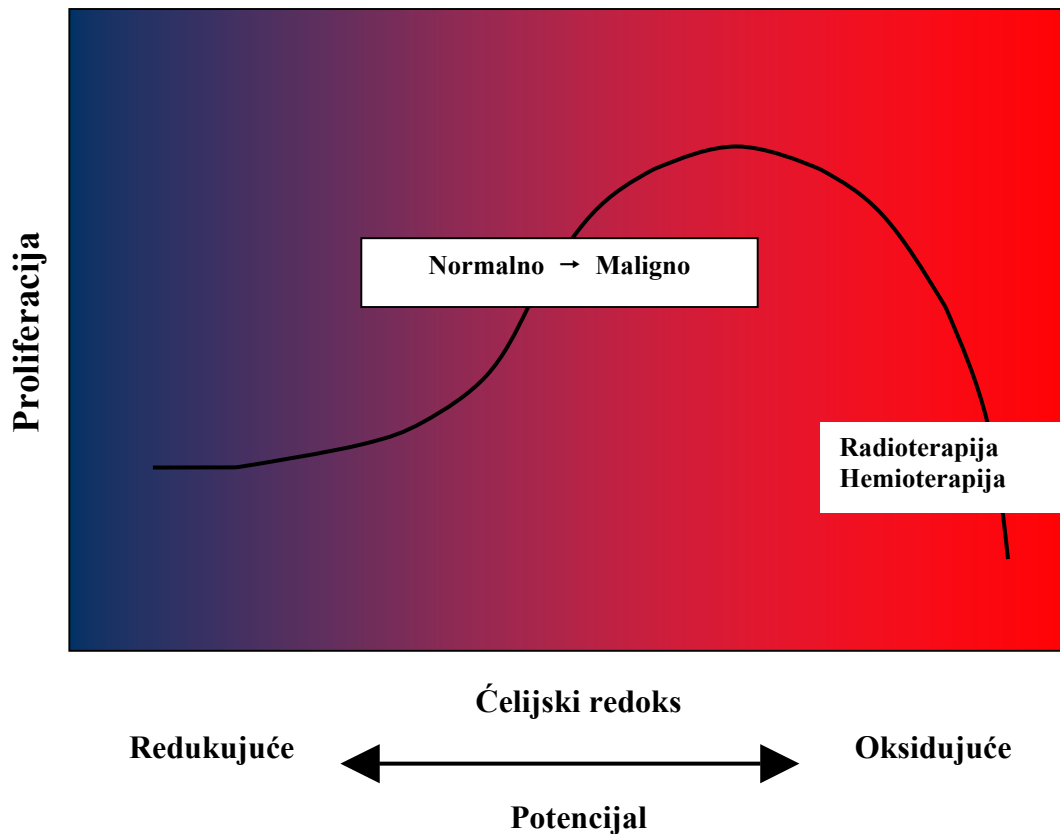
Li i Oberley sugerišu da su promene u redoks okruženju neophodne da ćelija uspešno prođe ćelijski ciklus (43). Oni su potvrdili da u toku M faze ćelijskog ciklusa NIH/3T3 ćelija nivo ukupnog glutationa i disulfidnih grupa raste u S fazi ćelijskog ciklusa (44-46).

Indukcija ili inhibicija proliferacije je zavisna od nivoa oksidanata u ćeliji. Nizak nivo oksidanata stimuliše proliferaciju, dok je visok nivo inhibira.

Visoke koncentracije tiola stimulišu proliferaciju nekih tumorskih ćelija (40). Suprotno tome, ćelijska smrt se inicira oksidujućim uslovima. Na primer, pro-oksidenti kao što su metaboliti arahidonske kiseline, lipidni hidroperoksidi, reaktivni aldehidi i ditiokarbamati povećavaju intraćelijsku koncentraciju ROS koji indukuju apoptozu. Antioksidanti tada služe kao redukujući agensi. Tako, redukujuće okruženje u ćeliji može odrediti da li će ćelija proliferirati, diferencirati se ili umreti (44).

Oksidujuće okruženje može dovesti do nekroze ili apoptoze ćelije. Na primer, apoptoza u mnogobrojnim vrstama ćelija je indukovana niskim koncentracijama vodonik peroksida; pri visokim koncentracijama dolazi do nekroze (5,45-51).

Ćelije koje započinju sa neoplastičnom transformacijom prolaze kroz niz izmena u metabolizmu. Jedna od značajnijih i univerzalnih izmena za sve maligne ćelije je defekt u metabolizmu glukoze (3). Ćelije tumora imaju povišen nivo glikolize u kombinaciji sa sniženom respiracijom (4). Ove promene u metabolizmu su udružene sa povišenim oksidativnim stresom poreklom od superoksida nastalog u mitohondrijama (5). Kao rezultat u ćeliji se javlja oksidovano stanje koje pogoduje imortalizaciji, stimuliše proliferaciju ćelija i podržava razvoj malignog fenotipa (6) (Slika 3).



Slika 3. Pretpostavljeni uticaj izmena redoks potencijala na ćelijsku proliferaciju. Male promene potencijala u pravcu oksidacije imaju značajan uticaj na proliferativni kapacitet malignih ćelija. Radioterapija i hemioterapeutici kreiraju snažno oksidujuće okruženje koje je citotoksično (2).

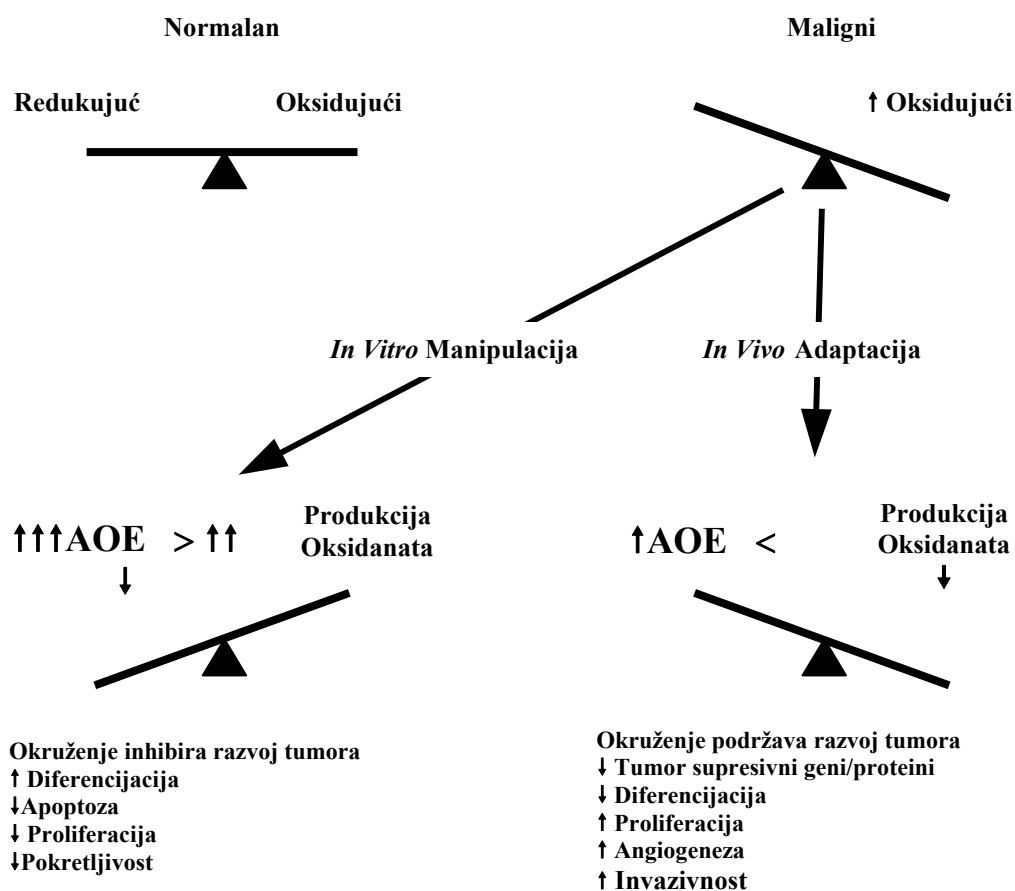
Pro-oksidanti stimulišu ćelijsku proliferaciju, mutacije i genomsku nestabilnost, dok antioksidanti inhibiraju ove procese. Većina mutacija bitna za aktivaciju onkogeni odnosi se na redoks-senzitivna regulatorna mesta (npr. p53, v-Jun, i V-fas) (7,8). Pretpostavlja se da ovaj proces dovodi do gubitka normalne redoks kontrole ćelijskog rasta i razvoja (6,9).

Apoptoza je potencijalno protektivni mehanizam u odnosu na egzogene karcinogene i inflamatorna stanja i delimično je regulisana ćelijskim redoks statusom. Može biti započeta iz različitih ćelijskih struktura. Jedan od dobro proučenih mehanizama je apoptoza u toku koje se permeabilizuje mitohondrijalna membrana u procesu praćenom nastankom ROS i izlivanjem citohroma c, što dovodi do aktivacije kaspaze-9. Kritični regulator apoptoze je mitohondrijalna Bcl-2 familija proteina (11). Poznato je da Bcl-2 može odrediti da li će ćelija preživeti ili ne. Otpuštanje citohroma c dovodi do sniženja nivoa glutaciona. Bcl-2 može blokirati otpuštanje citohroma c. U stvari, overekspresija Bcl-2 čini ćeliju više redukovanom bez uticaja na ukupni antioksidativni status (52,53).

Oksidanti i promene u ćelijskom redoks stanju u pravcu oksidacije regulišu c-Myc i p53 indukovanu apoptozu (12,13). Takođe, oksidanti indukuju ekspresiju Cip1 gena koji dovodi do neograničenog rasta/smrti (14,15), kao i ekspresiju tumor supresor proteina PTEN (42).

Generalno, ćelijsko redoks stanje ima značajan uticaj na kontrolu ćelijskog preživljavanja, apoptoze i ekspresiju tumor supresornih gena (2) (Slika 4).

Ćelijski redoks status

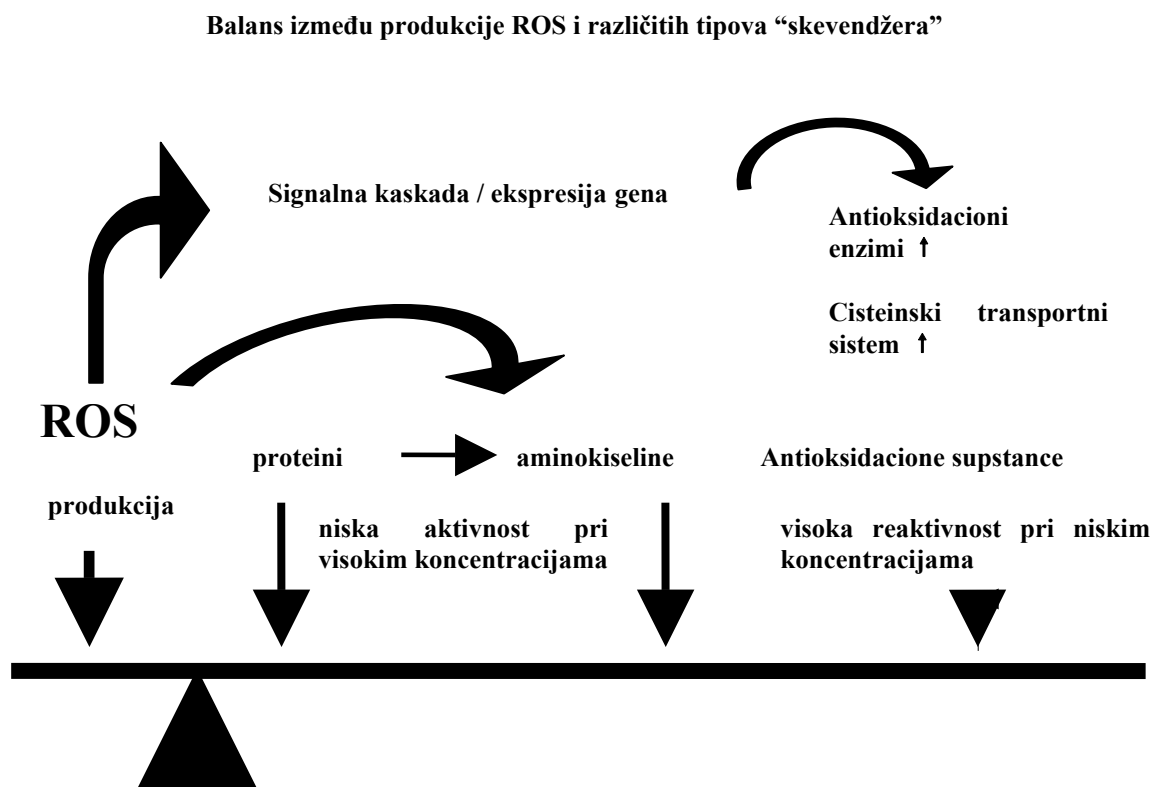


Slika 4. Pretpostavljene promene u ćelijskom redoks statusu prilikom maligne transformacije. Maligne ćelije kreiraju oksidovano okruženje kao rezultat povišene metaboličke aktivnosti. *In vivo* ovo je delimično kompenzovano antioksidantima; Međutim, balans ostaje pro-oksidativan, što podržava razvoj tumora. *In vitro* manipulacija antioksidantima održava antioksidativnu funkciju višom od produkcije oksidanata i stvara redukovano okruženje. Nizak nivo redoks statusa inhibira rast tumora, ali takođe i povećava njegovu rezistenciju na zračenje i hemoterapeutike koji deluju preko oksidovano-posredovanih mehanizama (2).

1.7. Oksidativno-antioksidativni sistem održavanja redoks homeostaze

U toku svoje evolucije, aerobni organizmi razvili su mehanizam odgovora na oksidativno oštećenje posredovano reaktivnim vrstama kiseonika (ROS). ROS se proizvode u ćeliji i/ili mogu biti poreklom iz spoljnih izvora (hemijski polutanti, jonizujuće zračenje, lekovi). U ovakvim uslovima, antioksidativni zaštitni sistem odbrane (Antioxidative defence system - AOS), ROS i čitav redoks sistem predstavljaju bazu fizioloških procesa organizma (ćelijska proliferacija i diferencijacija, prenos signala, regulacija metabolizma i međućelijska komunikacija), citoprotektivnih mehanizama (inflamacija, odbrana od mikroorganizama), ali i patofizioloških fenomena (starenje, kancerogeneza, apoptoza, nekroza, efektivno i toksično delovanje lekova i dr) (54-58).

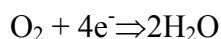
Prema Droge-u, (59), balans između produkcije ROS i sistema za njihovo uklanjanje ("skevendžera") su bitna determinanta održavanja redoks homeostaze u ćelijama (Slika 5).



Slika 5. Mehanizmi redoks homeostaze (59).

1.8. Reaktivne vrste kiseonika (ROS)

Tokom svog metabolizma, aerobne ćelije najveći deo molekuskog kiseonika redukuju do vode. U procesu oksidativne fosforilacije (OxP) koji se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija uz katalitičku ulogu kompleksa citohrom-oksidaža, svaki molekul kiseonika primi 4 elektrona:



Prilikom redukcije molekuskog kiseonika manjim brojem elektrona u oko 2% slučajeva nastaju delimično redukovani i toksični međuproizvodi reaktivne vrste kiseonika (Tabela 1). To su hemijske vrste sa jednim ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali (60).

Tabela 1. Reaktivne vrste kiseonika (60).

Reakcije	Produkti
$O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$	Superoksid anjon radikal
$O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil radikal
$O_2 + 2e^- \rightarrow H_2O_2$ $2 O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	Vodonik peroksid
$O_2 + 3e^- \rightarrow \cdot OH$ $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ $H_2O_2 + Cu^+ \rightarrow Cu^{2+} + \cdot OH + OH^-$ $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$	Hidroksil radikal
$\cdot OH + RH \text{ ili } LH \rightarrow H_2O + R^{\cdot} \text{ ili } L^{\cdot}$	Oksidacija masnih kiselina ili drugih organskih molekula
$R^{\cdot} \text{ ili } L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LO_2^{\cdot} \text{ ili } RO_2^{\cdot}$	Peroksil radikal
$LO_2^{\cdot} + LH \rightarrow L + LOOH$	Organski hidroperoksid
$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow {}^1O_2 + H_2O_2$ $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow {}^1O_2 + H_2O + OH^-$	Singlet kiseonik
O_3	Ozon

1.8.1. Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot -}$)

Superoksid anjon radikal nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika. U hemijskom smislu se ponaša i kao oksidant i kao reduktant (61). U fiziološkim uslovima se u najvećim količinama produkuje u mitohondrijalnom elektron-transportnom lancu (62) i endoplazmatskom retikulumu (60,63).

Izvor superoksid anjon radikala su reakcije biološke oksidacije, posebno one koje katalizuju NAD(P)H-oksidade, ksantin-oksidade, 5-lipooksigenaze, ciklooksigenaze (59). $O_2^{\cdot -}$ se oslobađa i autooksidacijom oksihemoglobina do methemoglobina, kao i gliceraldehida, adrenalina i cisteina (64).

U fiziološkim koncentracijama funkcioniše kao regulator niza fizioloških procesa: ventilaciji, produkciji eritropoetina, relaksaciji glatkih mišića, signalnoj transdukciji putem membranskih receptora, stimulaciji imunoloških funkcija (59).

Egzogeno može nastati dejstvom različitih faktora kao što su: jonizujuće i UV zračenje, dejstvo teških metala, lekova, pesticida i fungitoksina (64). Štetni efekti superoksid anjon radikala na ćeliju se iskazuju putem depolimerizacije polisaharida, oštećenja enzima i ćelijskih membrana, remećenju sinteze DNK i transkripcije RNK, što može dovesti do inaktivacije virusa i bakterija, kao i inicijacije procesa kancerogeneze (59).

1.8.2. Vodonik peroksid (H_2O_2)

Po svojoj strukturi, vodonik peroksid nije radikal, jer nema nesparenih elektrona, što ga čini najstabilnijim međuproizvodom redukcije kiseonika (65). Nastaje dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili njegovom enzimskom dismutacijom dejstvom superoksid dismutaze. Takođe, postoji i nekoliko enzima koji produkuju vodonik peroksid bez učešća superoksid anjon radikala (glikolat oksidaza, D-aminoacil oksidaza, urat oksidaza) (60).

Proces stvaranja H_2O_2 u ćeliji odvija se u mitohondrijama, peroksimima, kao i u endoplazmatskom retikulumu i membrani (65).

Fiziološki, vodonik peroksid nastaje u procesu redukcije molekulskog kiseonika u reakcijama oksidaza, ali i u reakcijama autooksidacije oksihemoglobina, askorbata, glutationa, tiola i kateholamina (60).

Učestvuje u međućelijskom prenosu signala preko EGF-receptornog, tirozin kinaznog, insulin-receptor kinaznog, protein-kinaznog, kao i AP-1 i NF- κ B transkripcionog sistema (59). U stanju je da direktno inaktivira neke enzime, najčešće oksidacijom -SH grupa, (60,66), kao i da inicira proces lipidne peroksidacije (65). Svoje toksične efekte ispoljava i indirektnim putem, interakcijom sa superoksid anjom radikalom ili sa jonima metala, pri čemu nastaje visoko reaktivni hidroksil radikal (67).

S obzirom da lako prolazi kroz ćelijsku membranu, u ćeliji se može naći i vodonik peroksid iz egzogenih izvora (60,66).

1.8.3. Hidroksil radikal (OH)

Hidroksil radikal je hemijski najreaktivnija kiseonična vrsta sa najizraženijim citotoksičnim efektom. Endogeno, nastaje prilikom Haber-Weissove reakcije između superoksid radikala i vodonik peroksida, kao i Fentonovom reakcijom iz H_2O_2 u prisustvu divalentnog gvožđa. Egzogeno može nastati dejstvom jonizujućeg zračenja na vodu (66).

Kao snažno oksidujuće sredstvo, poseduje dovoljnu energiju da direktno hemijski reaguje sa gotovo svim biološkim supstratima pri čemu nastaju novi radikali različite reaktivnosti (60).

Hidroksil radikali oksidišu polinezasićene masne kiseline u biološkim membranama i iniciraju proces lipidne peroksidacije (68).

Pri reakciji sa DNK nastaju timidin glikol i 8-hidroksi deoksoguanozin (8-OH dG) - biomarkeri oksidativnog oštećenja ovog molekula. 8-OH dG može dovesti do pogrešnog očitavanja DNK prilikom replikacije. Eksperimentima je dokazano da rezidue 8-OH dG igraju bitnu ulogu u kancerogenezi izazvanoj hidroksil radikalima (66).

1.8.4. Singlet kiseonik $^1\text{O}_2^*$

Singlet kiseonik nastaje u nekim slobodno-radikalnim reakcijama. U hemijskom smislu predstavlja ekscitovani molekul O_2 i kao takav je veoma reaktivan. Zajedno sa hidroksil radikalom, nastaje jonizacijom vode i ima poluzivot od svega nekoliko minuta (64). U ćeliji najčešće reaguje sa jedinjenjima koja poseduju dvostruku vezu (karoteni, masne kiseline) (66,69).

1.9. Proces lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija je proces u kome dolazi do oksidativne degradacije nezasićenih lipida sa pratećim formiranjem i razgradnjom lipidnih hidroperoksida (LOOH). Ovaj proces oštećuje membransku strukturu i funkciju i izaziva mnogobrojne citopatološke efekte.

Reakcija peroksidacije započinje delovanjem redukovanih i aktiviranih oblika kiseonika na metilenske grupe nezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u lipidnom sloju ćelijskih membrana. Pritom dolazi do oduzimanja vodonikovog atoma i stvaranja ugljenikovog radikala koji daje peroksi radikal, a potom i lipidni hidroperoksid. Nastali hidroperoksidi se u prisustvu metala razgrađuju dajući aloksi i peroksi radikale koji, opet, stimulišu dalje lančane reakcije peroksidacije. Ciklični peroksidi se dalje razgrađuju u proizvode manje molekulske mase.

U toku peroksidacije lipida mogu nastati različiti proizvodi u gasovitom agregatnom stanju (pentan, etan i eten), konjugovani dieni, kao i produkti koji sadrže adehidnu grupu (malondialdehid-MDA) (63,70). MDA može reagovati sa slobodnim amino grupama proteina i nukleinskih kiselina i dovesti do novog oštećenja ćelija (71).

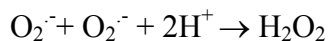
Proces lipidne peroksidacije može biti pokrenut neenzimatski (delovanjem ROS) ili pomoću enzima 15-lipooksigenaze-1 ili NADPH-citohrom P450 reduktaznog sistema koji je biološki programiran u retikulocitima (72).

1.10. Antioksidativni zaštitni sistem (AOS)

1.10.1. Enzimske komponente AOS

1.10.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD) E.C.1.15.1.1

Antioksidativni enzim SOD katališe konverziju superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) do vodonik peroksida i molekularnog kiseonika (73).



Spontana reakcija dismutacije superoksid radikala do vodonik peroksida je 10^4 sporija od reakcije katalizovane superoksid dismutazom pri neutralnom pH (74). U prisustvu visokih koncentracija vodonik peroksida, SOD podleže sporij inaktivaciji, odnosno ispoljava peroksidaznu aktivnost, što rezultuje stvaranjem vrlo reaktivnog intermedijera – SOD-Cu²⁺-OH⁻ (74). U prisustvu SOD, superoksid anjon radikal ne može reagovati sa potencijalnim supstratima ili pokrenuti Haber-Weiss-ovu reakciju.

Putem katalize konverzije $O_2^{\cdot-}$ radikala, SOD deluje zajedno sa drugim antioksidantnim enzimima (npr. katalazom i glutation - peroksidazom) u prevenciji oštećenja tkiva (75).

Superoksid dismutaza je prisutna u svim aerobnim organizmima, pa i u nekim anaerobima (76).

Postoji četiri oblika ovog enzima koji katališu istu reakciju po sličnom mehanizmu pri kome se metal u aktivnom centru redukuje, a zatim reoksiduje. To su: Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD i EC-SOD, ekstracelularna forma enzima (77).

Cu,Zn-SOD je citosolni dimerni enzim prisutan u svim eukariotskim ćelijama. U aktivnom centru ima bakar i cink. Podleže ireverzibilnoj (oksidativnoj) inaktivaciji kada je izložen dejstvu svog produkta, vodonik peroksida (78). SOD inhibiran sa H_2O_2 se prepoznaje i razgrađuje ATP ćelijskim proteinima. Ovaj proces se odvija u kompleksima od oko 700 kDa, proteazomima. Degradacija SOD modifikovanog uz pomoć vodonik peroksida najverovatnije štiti eritrocite od oksidativno denaturisanih proteinskih fragmenata (79). Takođe, SOD ima ulogu u ćeliji u snižavanju broja spontanih mutacija (80).

Enzim je izuzetno otporan na zagrevanje i promenu pH, a može se inhibisati CN^- jonima i dietilditiokarbamatom (66).

Mn-SOD se nalazi u mitohondrijama eukariotskih ćelija i u ćelijama prokariota. U aktivnom centru ima mangan. Koncentracija Mn-SOD je visoka u organima sa intenzivnom respiracijom kao što su jetra, pluća i miokard, čineći odbrambeni sistem za lipidnu peroksidaciju. Mn-SOD nije aktivan samo u ćeliji, već se sekretuje i u njenu okolinu tako štiteći i spoljašnju membranu (81).

Pad u ekspresiji Mn-SOD može biti jedan od ključnih faktora u uspostavljanju i održavanju malignog fenotipa. Preterana ekspresija ovog enzima može za ćelije biti toksična i dovesti do

porasta smrtnosti zbog velike količine formiranog vodonik peroksida. Molekularni mehanizmi koji Mn-SOD čine antipromotorom su nepoznati. Moguće je da se to dešava putem promene u balansu slobodnih radikala (57).

Mitochondrijalna SOD štiti nervne ćelije od apoptoze indukovane agensima koji izazivaju produkciju peroksinitrita i membransku lipidnu peroksidaciju, ispoljavajući tako anti - apoptotsku funkciju (62).

Mn-SOD se ne inhibira CN^- jonima, ali gubi aktivnost tretmanom sa smešom hloroforma i etanola. U odnosu na Cu,Zn-SOD ovaj enzim je podložniji denaturaciji toplotom i hemikalijama (66). Agregacija, nitrovanje i inaktivacija Mn-SOD nađena je u raznim oboljenjima za koja je karakterističan oksidativni stres i povećana produkcija NO (82). Smanjenje aktivnosti Mn-SOD može narušiti energetske metabolizam u mitohondrijama (83) i inicirati apoptotičnu ćelijsku smrt (84). Na osnovu napred opisanih rezultata *in vitro* eksperimenata, pretpostavlja se da peroksinitrit izaziva navedene modifikacije i pri *in vivo* uslovima (82).

Fe-SOD je dimerni protein koji se nalazi samo u prokariotskim ćelijama i u hloroplastima nekih biljaka (66). U aktivnom centru ima gvožđe. Kao i Cu,Zn-SOD inhibira se CN^- jonima (60).

Ekstracelularna SOD je sekretorni glikoprotein koji sadži bakar i cink. Ekstracelularni SOD izoenzim kod sisara je Cu,Zn-SOD, ali za razliku od svog citosolnog analoga, on je tetrameran (76). To je najzastupljenija SOD u ekstracelularnim tečnostima kao što su plazma, limfa i sinovijalna tečnost. EC-SOD je zastupljena i u ekstravaskularnim prostorima tkiva (80). Postojanje ekstracelularne SOD uslovljeno je potrebom za odbranom ćelije od mnogobrojnih spoljnih izvora O_2^- .

EC-SOD ima snažan antiinflamatorni efekat, ispoljava zaštitu prilikom povreda i relaksira arterije na taj način delujući protiv hipertenzije.

Važna osobina ovog enzima je afinitet prema heparinu i drugim kiselim glukozamino-glikanima, jer je C - terminalni heparin - vezujući region bogat amino - kiselinskim reziduama. Ovaj afinitet se ispoljava vezivanjem za endotelne i druge ćelije (60).

Enzim je veoma osetljiv na inhibiciju cijanidom. Može se inhibisati azidom, vodonik - peroksidom, dietil - ditiokarbamatom i arginin - specifičnim reagensom fenilglioksalom (60).

1.10.1.2. Glutation peroksidaza (GSH-Px) EC 1.11.1.9.

Glutation peroksidaza je selenoenzim za čiju aktivnost je neophodan jedan selenocisteinski ostatak po podjedinici. Nalazi se pretežno u citosolu, ali ga ima i u mitohondrijalnom matriksu sisarskih ćelija. Najveću aktivnost ispoljava u jetri. GSH - Px katališe redukciju velikog broja organskih hidroperoksida, kao i vodonik peroksida (57,85). Redukcija peroksida je praćena reverzibilnom oksidacijom redukovano glutathiona (GSH) koji može biti regenerisan redukujućim ekvivalentima NADPH (64).



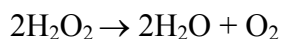
Glutation peroksidaza je tetramerni enzim, a svaka subjedinica, molekulske mase 21 kDa u aktivnom centru sadrži po jedan atom Se u obliku selenocisteina. Tokom intenzivnog oksidativnog stresa, aktivnost GSH-Px dovodi do ireverzibilnog gubitka intracelularnog GSH. Razlog za ovo je što GSSG ne može biti ekstracelularno redukovano niti dopremljen do ćelija velikih organa putem cirkulacije (86).

Poznato je da postoje i dve forme Se-nezavisnih glutathion-peroksidaza. Prva pripada grupi enzima glutathion-S-transferazne aktivnosti koja katališe redukciju samo organskih hidroperoksida. Fosfolipid-hidroperoksid glutathion-peroksidaza (Ph GSH-Px) može da

redukuje fosfolipidne hidroperokside, perokside holesterola i vodonik peroksid. U aktivnom centru sadrži selenocistein i jedini je oblik glutation-peroksidaze koji direktno reaguje sa lipidnim hidroperoksidima u ćelijskoj membrani i inhibira proces lipidne peroksidacije uz obavezno prisustvo fizioloških koncentracija tokoferola (87,88).

1.10.1.3. Katalaza (CAT) E.C.1.11.1.6.

Katalaza je enzim koji katališe oksidaciju vodonik peroksida do vode i molekulskog kiseonika (64):



Ova reakcija se odvija u uslovima brze produkcije vodonik peroksida. Međutim, katalaza može, u uslovima spore produkcije vodonik peroksida da ispolji tzv “peroksidaznu” aktivnost, tj, da oksiduje H^+ donore uz utrošak jednog molekula H_2O_2 .

Rasprostranjena je u humanim, animalnim i biljnim tkivima. Kod čoveka, katalaza je najaktivnija u jetri i eritrocitima. U ćeliji, katalaza je smeštena u peroksizomima, mada se u manjim količinama nalazi i u endoplazmatičnom retikulumu (89). U sisarskim eritrocitima nalazi se u citosolu.

Većina izolovanih katalaza su tetramerni proteini. Četiri podjedinice sadrže protoporfirinske grupe sa Fe^{3+} na aktivnom mestu. Primarna struktura katalaze izolovane iz različitih izvora je veoma slična i sadrži aminokiselinu arginin.

Aktivnost CAT se može selektivno inhibisati azidom i cijanidom. Aminotriazol je specifičan inhibitor ovog enzima.

Zajedno sa GSH-Px, katalaza igra ključnu ulogu u enzimskoj odbrani od oksidativnog stresa (90).

1.10.2. Neenzimske komponente AOS

1.10.2.1. Antioksidanti male molekulske mase

Pored enzimskih mehanizama antioksidativne odbrane, u zaštiti od slobodnih radikala i održavanju redoks homeostaze organizam koristi i tzv. neenzimske mehanizme. Niskomolekulski antioksidanti (vitamin E, askorbinska kiselina, urska kiselina, glutation) reaguju sa slobodnim radikalima i prevode ih u nereaktivne ili manje reaktivne hemijske forme na taj način inhibišući štetne efekte ovih visokoreaktivnih čestica.

Vitamin E (α tokoferol)

Vitamin E je liposolubilni molekul koji se zbog svoje hidrofobnosti nalazi na unutrašnjoj strani membrana ćelija gde igra ulogu u zaštiti od lipidne peroksidacije *in vivo*. Postoji osam strukturnih izomera tokoferola.

Vitamin E prekida lančane reakcije direktnim dejstvom na organske peroksi radikale. Pri reakciji sa slobodnim radikalima nastaje tokoferil radikal čime se zaustavlja proces lipidne peroksidacije. Nakon reakcije molekul tokoferola se regeneriše vitaminom C (63). Međutim, u uslovima kada neki od niskomolekularnih antioksidanata nedostaje ili je prisutan u maloj koncentraciji, vitamini E i C imaju prooksidativnu aktivnost (61).

α Tokoferol umanjuje oštećenje DNK i inhibira malignu transformaciju putem antioksidativne aktivnosti (91,92). Interesantno je da α forma ima pet puta veću apsorpcionu

moć od χ i δ forme, mada poslednje dve imaju veće apsorbance. Međutim, α forma ima najveću biološku aktivnost, najlakše se usvaja od strane ćelija i najefektivnije distribuira do kritičnih intracelularnih meta (93).

Vitamin C (askorbinska kiselina)

Askorbinska kiselina je hidrosolubilni molekul, koji, pored glutaciona, funkcioniše kao glavni antioksidant male molekulske mase u citoplazmi. Biljke i većina životinja sintetiziraju vitamin C iz glukoze, dok ga ljudi, ostali primati i zamorac moraju unositi putem hrane (60).

Askorbinska kiselina je kofaktor *in vivo* za mnoge enzime (prolin hidroksilazu, lizin hidroksilazu, dopamin β hidroksilazu). Dokazano je da podiže nivo apsorpcije gvožđa i intracelularno stabilizuje Fe - vezujuće proteine uključujući i feritin (91).

Takođe, askorbinska kiselina deluje kao redukujući agens - donor elektrona. Jednostavnim redukcionim procesom askorbinska kiselina inaktivira slobodne radikale nastale jonizujućom radijacijom ili nekim drugim izvorima oksidativnog stresa. Učestvuje i u redukciji vodonik peroksida do vode kao kosupstrat askorbat peroksidaze viših biljaka.

U korelaciji sa kancerom, dokazano je da inhibiše indukciju enzimski izazvanih preneoplastičnih lezija u jetri (89).

Mokraćna kiselina

Mokraćna kiselina, koja se u ljudskoj krvnoj plazmi nalazi u koncentraciji od 0.12 - 0.45 mmol/l je snažan "skupljač" hidroksil radikala. Takođe, ovaj molekul inhibira lipidnu peroksidaciju.

S obzirom da je u ekstracelularnim tečnostima niska aktivnost SOD i CAT, smatra se da mokraćna kiselina ima značajnu ulogu u antioksidativnoj odbrani (60).

Glutation (GSH)

Već pomenuti glutacion, osim što je za ćeliju ključan u održavanju redoks homeostaze, služi i kao niskomolekulski antioksidant u zaštiti od ROS. Zapravo, ove dve uloge GSH se međusobno prepliću.

Glutation je tripeptid sastavljen od cisteina, glutaminske kiseline i glicina. U sintezi glutaciona učestvuju enzimi γ glutamil cistein sintetaza i GSH sintetaza koji uz utrošak ATP kataliziraju formiranje dve peptidne veze između Glu, Cis i Gly.

GSH se nalazi u svakoj eukariotskoj ćeliji u visokim koncentracijama od 2 - 10 mmol/l. Ima ga u citosolu, jedru, mitohondrijama i endoplazmatičnom retikulumu. Mitohondrijalni GSH iznosi oko 10% ukupnog ćelijskog GSH. Očuvanost ovog sistema je esencijalna za održavanje fizioloških funkcija. Ćelije sa smanjenom količinom glutaciona su mnogo osetljivije na hemijski i oksidativni stres (86).

U ćelijama se nalazi pretežno u svojoj redukovanoj formi (95%) i kao takav ima mnogobrojne funkcije. Ima ključnu ulogu u antioksidativnoj odbrani - kao kosupstrat peroksidaza reaguje sa reaktivnim kiseoničnim vrstama kao što su vodonik peroksid i organski peroksidi dovodeći do njihove inaktivacije pri čemu se sam oksiduje. Tokom intenzivnog oksidativnog stresa, aktivnost GSH-Px dovodi do ireverzibilnog gubitka intracelularnog GSH. Razlog za ovo je što GSSG ne može biti ekstracelularno redukovani niti dopremljen do ćelija velikih organa putem cirkulacije (86).

Ostale funkcije redukovanog glutaciona uključuju ulogu u membranskom transportu, kao i ulogu koenzima/kosupstrata u mnogobrojnim enzimskim reakcijama (katalisanim glioksalazom, prostaglandin - endoperoksi - izomerazom, leukotrien sintetazom, glutation - S - transferazom i glutation peroksidazom) (85). Glutation stupa u oksido - redukcione procese sa disulfidnim grupama oksidovanih enzima i prevodi ih u njihovu aktivnu tiolnu grupu.

Redukovani oblik glutationa može da istisne enzim iz njegovog kompleksa sa teškim metalima i arsenom.

Redukovani glutation učestvuje u sintezi prekursora DNK, genskoj ekspresiji i prenosu signala. Tokom sinteze DNK, GSH je neophodan kao redukujući ekvivalent za glutaredoksin, koji obezbeđuje elektrone za ribonukleotid reduktazu (85).

1.11. Uloga proteina u antioksidativnoj zaštiti ćelije

Prelazni elementi kao što su Fe, Cu, Mn u slobodnom stanju predstavljaju snažne prooksidante i katalizatore slobodnoradikalskih reakcija.

Slobodno gvožđe može stimulisati produkciju hidroksil radikala iz peroksida i kiseoničnog radikala u reakciji Fentonovog tipa, katalisati transfer elektrona od NADPH do kiseonika i reagovati sa lipidnim hidroperoksidima u produkciji novih reaktivnih grupa (63).

Kada u ćeliji ne postoji potreba za aktivnošću prelaznih elemenata, oni se inaktivišu vezivanjem za proteine i skladište ili transportuju u ekstracelularnu tečnost.

Proteinski molekuli - nosioci metalnih jona su transferin, ceruloplazmin i albumin (63).

1.12. Azot monoksid (NO)

Kao molekul sa veoma velikim brojem bioloških funkcija, azot monoksid je višegodišnji predmet intenzivnog interesovanja naučnika. Još krajem 19. veka Ascanio Sobrero je sintetizovao nitroglicerin. Ubrzo je primećeno da ova supstanca dovodi do vazodilatacije, ali je tek krajem prošlog veka sa sigurnošću utvrđeno da je njena aktivna komponenta azot monoksid (NO) (94). Makrofagi i ćelije endotela krvnih sudova su prve ćelije u kojima je dokazana sinteza NO (95, 96). Istraživanja iz ove oblasti kulminirala su u narednih nekoliko godina otkrićem da je NO uključen u niz patofizioloških procesa. Otkrića u oblasti istraživanja azot oksida dovode do toga da je NO 1992. godine proglašen za molekul godine prema magazinu Science. Nobelova nagrada iz oblasti fiziologije i medicine dodeljena je 1998. godine za rad: "Azot monoksid kao signalni molekul kardiovaskularnog sistema".

Uprkos ovim dostignućima, tek 2002. godine je otkriven tačan molekulski mehanizam kojim se NO oslobađa iz nitroglicerina (97). Smatra se da aldehid-dehidrogenaza iz mitohondrija deluje i kao nitroglicerin-reduktaza, koja oslobađa 1,2 -gliceril i nitrit, a koji se dalje u biološkoj sredini redukuje do azot monoksida.

Azot monoksid je bezbojan gas na sobnoj temperaturi i pritisku, sa maksimalnom rastvorljivošću sličnom kao i kiseonik (98). To je nepolaran molekul sa osobinama slobodnog radikala jer sadrži jedan nesporeni elektron. Za razliku od drugih slobodno-radikalnih vrsta, azot oksid nema tendenciju da se dimerizuje i pri standardnim uslovima uglavnom je u formi monomera (99,100).

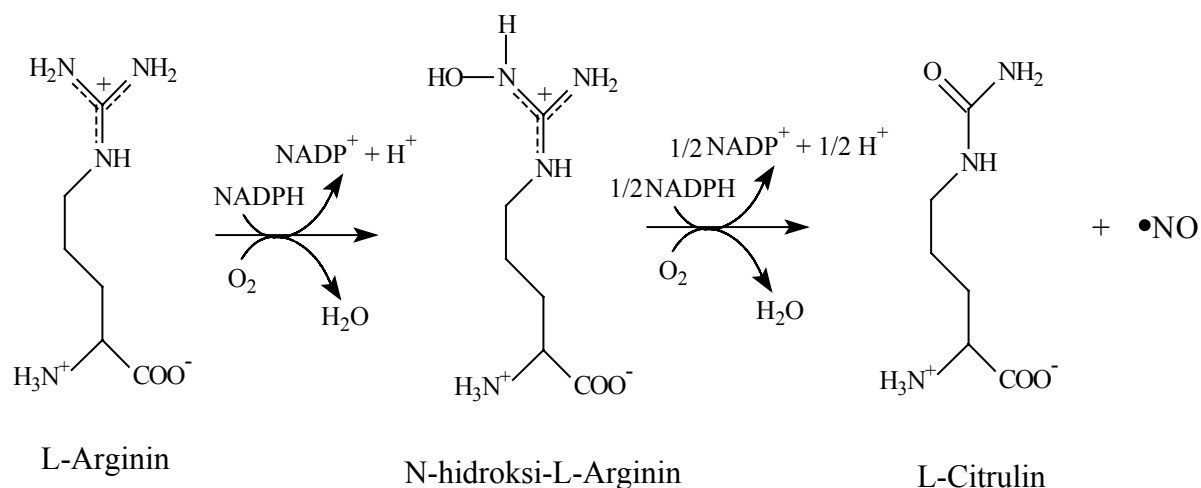
NO lako difunduje u ćelije kroz ćelijske membrane gde reaguje sa ciljnim molekulima. U vodenoj sredini, u prisustvu kiseonika, poluzivot mu je oko 4 minuta, a u biološkim sistemima oko 30 sekundi. Nasuprot većini signalnih molekula, koji svoje dejstvo ostvaruju samo vezivanjem za specifični receptor, NO deluje preko niza hemijskih reakcija. Reakcije koje se dešavaju u određenom biološkom sistemu zavise od koncentracije NO i od finih varijacija u sastavu ćelije i njenog okruženja (101).

Ćelije su izložene azot monoksidu endogenog i egzogenog porekla. Endogeni NO može nastati enzimskim i neenzimskim reakcijama. Enzimski put nastanka NO podrazumeva aktivnost azot oksid-sintaze (NOS), dok neenzimskim putem NO nastaje iz nitrita u kiseljoj sredini (102).

Egzogeni izvor podrazumeva NO prisutan u vazduhu kao zagađivač. Takođe, egzogeni izvori NO u širem smislu su i donori NO koji se koriste u terapijske i eksperimentalne svrhe, o čemu će kasnije biti reči.

1.12.1. Biosinteza NO

NO nastaje katalitičkom aktivnošću enzima pod nazivom NO-sintaze (NOS), koje katalizuju oksidaciju gvanidino grupe L-arginina u $\cdot\text{NO}$ i L-citrulin pomoću kiseonika i NADPH (Slika 6).

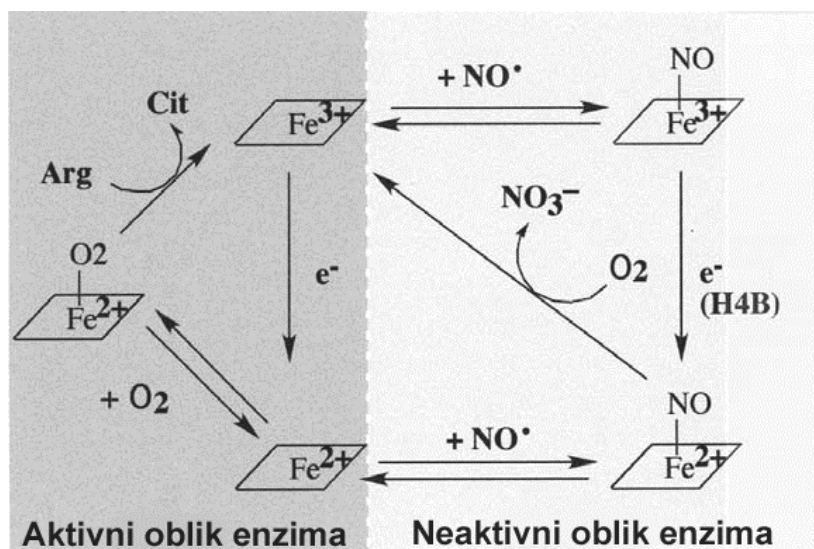


Slika 6. Reakcija nastanka $\cdot\text{NO}$ katalizovana NO-sintazom (102).

Postoje tri izoforme NOS . Neuronalna NOS (nNOS) i endotelna NOS (eNOS) su konstitutivne, a inducibilna (iNOS) je indukovana inflamatornim citokinima ili ishemičnim stimulusima. Konstitutivne NOS proizvode nanomolarne koncentracije azot oksida, dok iNOS sintetizuje ovaj molekul u mikromolarnim koncentracijama. Fiziološka koncentracija NO u biološkim sistemima iznosi od 20 nM do 2 μM (103,104).

Jedna od osnovnih razlika između konstitutivnih i inducibilnih izoformi NOS je u mehanizmu regulacije aktivnosti. Konstitutivne izoforme su Ca^{2+} i kalmmodulin (CaM) zavisne tako da mogu biti regulisane nivoom intracelijskog Ca^{2+} . Inducibilna NOS iz makrofaga takođe sadrži CaM. Međutim CaM u ovoj izoformi je tako čvrsto vezan da se smatra enzimskom subjedinicom i stoga enzim nije podložan regulaciji kalcijumom (105).

S obzirom da sve izoforme NOS katalizuju istu reakciju, one inkliniraju istim kofaktorima i prostetičnim grupama. Sve NOS sadrže hem i pokazuju sličnost sa dobro poznatom familijom hemoproteina, citohromima P450. Kao i kod citohroma P450, aksijalni tiolatni ligand iz molekula NOS učestvuje u vezivanju hema. I cNOS i iNOS zahtevaju NADPH, O₂ i tetrahidrobiopterin (H4B), a sadrže FAD i FMN. Aktivnost NOS je kontrolisana i negativnom povratnom spregom sa azot monoksidom (Slika 7) (106). Smatra se da se veći deo NOS u biološkim sistemima nalazi kao stabilan kompleks u kojem je NO vezan za hem u molekulu enzima (107,108).



Slika 7. Pretpostavljena šema kontrole aktivnosti NOS negativnom povratnom spregom sa NO (109).

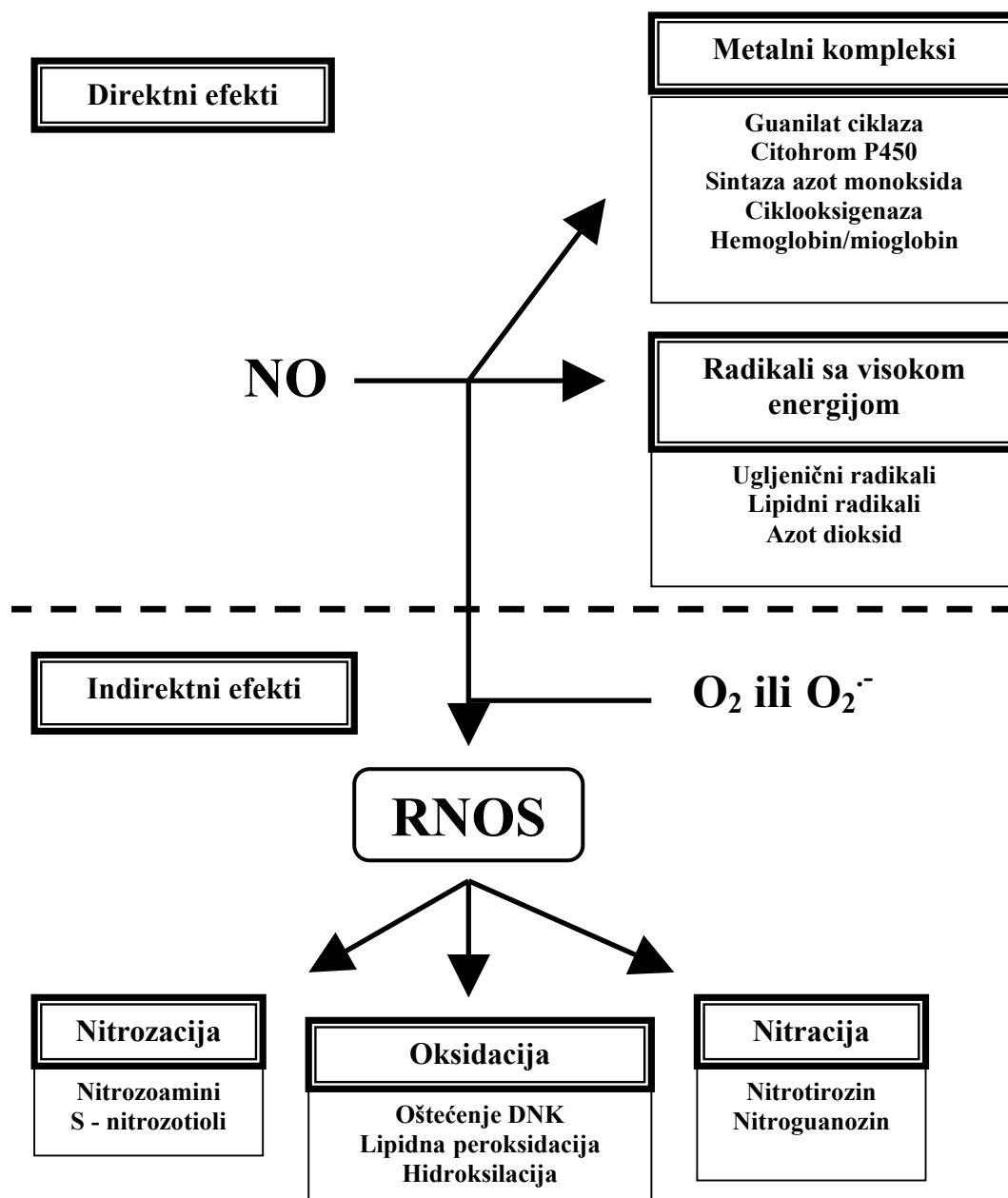
Pod posebnim uslovima, kao što je nedostatak arginina ili tetrahidrobiopterina, ili u prisustvu adriamicina, NOS mogu da redukuju O_2 do O_2^- , što može da ima za posledicu generisanje peroksinitrita (110).

1.12.2. Neenzimsko nastajanje azot monoksida

Azot monoksid nastaje *in vivo* direktnom redukcijom nitrita u kiseljoj sredini. Ovaj proces je značajan prilikom digestije u želucu, pri niskom pH (2,5 – 4,5) i visokoj koncentraciji nitrita (do 1 mM) (111). U ishemiji srca, iz nitrita nastaje azot monoksid što, pretpostavlja se, dovodi do oštećenja miokarda i gubitka njegove kontraktilne funkcije (112). Azot monoksid nastao iz nitrita može učestvovati u inflamatornim reakcijama, nezavisno od aktivacije NOS (102).

1.12.3. Biohemijski i molekularni mehanizmi delovanja azot monoksida

Danas se smatra da se azot monoksid, zahvaljujući svojoj difuzibilnosti i hidrofobnosti, slobodno kreće kroz biološku sredinu dok ne izreaguje sa nekim od ciljnih molekula (103,113,114). Gotovo sve ćelijske komponente mogu biti potencijalni ciljevi dejstva NO. Molekularni mehanizmi delovanja ovog molekula su vrlo složeni, a efekti se dele na direktne i indirektno (Slika 8) (115).



Slika 8. Mehanizmi delovanja NO (115).

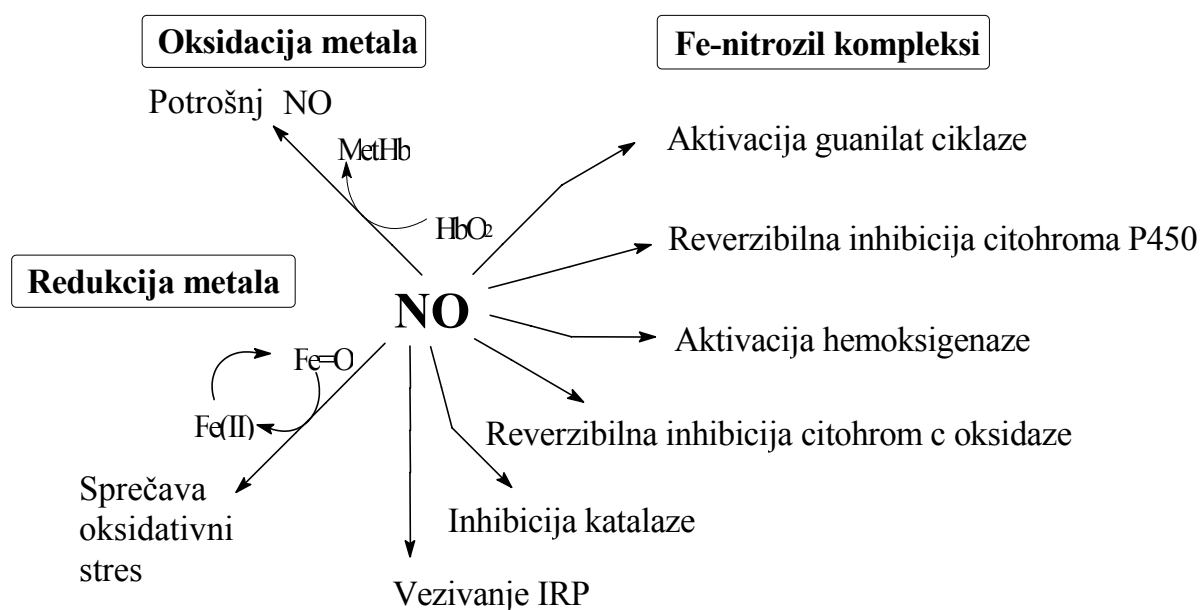
Direktni efekti odnose se na reakcije u kojima NO neposredno reaguje sa ciljnim molekulima, dok indirektno delovanje NO podrazumeva njegovu redoks transformaciju i nastanak reaktivnih azotnih vrsta (RNS). Pritom, direktni efekti su posledica fiziološkog delovanja NO pri niskim koncentracijama ($<1\mu\text{M}$) produkovanog iz konstitutivnih NOS, dok velika količina nastalog NO ($>1\mu\text{M}$) poreklom iz iNOS svojom aktivnošću ostvaruje indirektno delovanje. Takođe se smatra da direktni efekti podrazumevaju fiziološke, a indirektni patofiziološke aspekte ćelijskog metabolizma. (115, 116). Reakcije NO sa centrima prelaznih metala predstavljaju jedan od osnovnih mehanizama direktnog dejstva NO. Reakcijom sa hemom u gvanilat ciklazi NO aktivira ovaj enzim, što dovodi do sinteze cikličnog GMP. NO može da reaguje i sa drugim hemoproteinima, sa jonima gvožđa i drugim prelaznim metalima koji se nalaze u aktivnim centrima proteina, kao i sa takozvanim "slobodnim" gvožđem.

S-nitrozovanje (RSNO) -SH grupa u proteinima predstavlja primer indirektnog dejstva NO čime se reguliše njihova aktivnost. S-nitrozovanje se po značaju čak može porediti sa regulatornim mehanizmom fosforilacije proteina. Osim toga, nastanak S-nitrozotiola predstavlja način za odstranjivanje viška NO i za njegovo čuvanje i transport u biološkim sistemima. U uslovima povećane produkcije NO dolazi do nitrovanja ostataka tirozina u proteinima i slobodnog tirozina. Tako, povećani nivo nitrotirozina predstavlja dokaz o povećanoj produkciji NO.

1.12.4. Direktno dejstvo azot monoksida

1.12.4.1. Reakcije NO u prelaznim metalima bioloških sistema

Glavni mehanizmi biološkog dejstva NO predstavljeni su reakcijama azot monoksida sa prelaznim metalima bioloških sistema. S obzirom da je gvožđe najzastupljeniji metal u biološkim sistemima (60), ovakve reakcije su veoma česte u ćeliji i intenzivno su izučavane. Takođe je utvrđeno da u biološkim sistemima NO reaguje sa proteinima u kojima gvožđe nije vezano u obliku hema, kao i sa takozvanim "slobodnim" gvožđem. Primeri biohemijskih efekata reakcije NO sa centrima koji sadrže gvožđe u biološkim sistemima dati su na slici 9. Reakcije NO sa proteinima koji u aktivnom centru sadrže druge jone prelaznih metala i koji takođe predstavljaju mesta potencijalnog delovanja NO mnogo su manje izučavane.



Slika 9. Primeri biohemijskih efekata reakcije NO sa centrima koji sadrže gvožđe u biološkim sistemima (117).

1.12.4.2. Reakcije NO sa proteinima koji sadrže hem

Smatra se da su intracelularni hemoproteini mesta primarnog delovanja NO *in vivo*.

Azot monoksid ima osobinu da brzo reaguje sa oba, Fe²⁺ i Fe³⁺ oblika hemoproteina (118). Jednom nagrađen, hem-nitrozil kompleks sporo disosuje, pri čemu je disocijacija Fe³⁺-hem nitrozil kompleksa brža od disocijacije Fe²⁺- hem kompleksa (119). NO brže reaguje sa hemoproteinima kao što su hemoglobin, mioglobin i katalaza gde je šesto koordinaciono mesto u hemu slobodno u odnosu na hemoproteine poput citohroma c u kojima su zauzeta sva koordinaciona mesta i vezivanje NO zahteva oslobađanje jednog liganda.

Azot monoksid se reverzibilno vezuje za hem u katalazi na taj način inhibišući njenu aktivnost (120).

Gvanilat ciklaza, ključni enzim u ispoljavanju biološke funkcije NO je hemoprotein čije su reakcije sa NO dobro proučene. Gvanilat ciklaza može da se izoluje u obliku sa i bez hema, ali samo oblik koji sadrži hem vezuje NO i poseduje sposobnost da katalizuje sintezu cGMP iz GTP, koji dalje deluje na ciljne molekule: cGMP-zavisne protein kinaze, ciklične nukleotidne kanale i fosfodiesteraze (103,121,122). Ciklični GMP-zavisne kinaze (protein kinaze G) uključene su u regulaciju različitih ćelijskih aktivnosti kao što su regulacija koncentracije intraćelijskog kalcijumovog jona i stimulacija ćelijske sekrecije (123,124).

NO stupa i u reakcije sa citohrom P450 i citohrom c oksidazom (118,125). Vezivanje azot monoksida za hem u citohromu P450 je reverzibilno i sprečava vezivanje kiseonika i monoooksigenaznu aktivnost enzima (125,126). Sličan inhibitorski mehanizam nastaje vezivanjem NO za šesto koordinativno mesto hema u citohrom c oksidazi (125,126), što ima za posledicu inhibiciju elektronskog transporta u mitohondrijama (127).

Hemoglobin (Hb), oksihemoglobin (HbO₂) i methemoglobin (metHb) pokazuju različite afinitete i reaktivnosti u odnosu na NO. Azot monoksid reaguje sa hemoglobinom 5-10 puta brže od kiseonika, a u odsustvu kiseonika afinitet NO za hemoglobin je 1500 puta veći od afiniteta CO (128,129).

Reakcijom NO sa Hb (pod striktno anaerobnim uslovima), nastaje HbNO (Reakcija 1). HbNO može da pređe u metHb, pri čemu se NO redukuje u nitroksil (NO⁻) (Reakcije 2 i 3). Reakcijom NO sa HbO₂ nastaje metHb i nitrat (Reakcija 4). Ove reakcije se odvijaju u eritrocitima, a udeo svake od njih zavisiće od odnosa oksihb i Hb. Reakcijom NO sa methemoglobinom (Hb³⁺), dolazi do redukcije Fe³⁺ iz metHb u Fe²⁺, te do oksidacije NO u nitrozonijum jon (NO⁺) (Reakcija 5). Hidrolizom ovog kompleksa nastaje nitrit (Reakcija 6), a transferom NO⁺ na -SH grupu iz ostatka cisteina β-93 nastaje S-nitrozotiol SNO-Hb (Reakcija 7) (129,130).





Reakcijom metHb, metMb i nekih citohroma sa vodonik peroksidom nastaje feril π katjon radikal (HP-Fe³⁺) (Reakcija 8). Azot monoksid može da redukuje ovaj radikal (Reakcija 9), što predstavlja jedan od mehanizama anti-oksidativne zaštite NO (118, 131).



1.12.4.3. Reakcija azot monoksida sa nehemski vezanim gvoždem

U ćelijskom miljeu se nalaze i proteini koji sadrže jone gvožđa čvrsto vezane u aktivnom centru u obliku kompleksa u kojima učestvuju bočni ostaci cisteina i histidina (132-135).

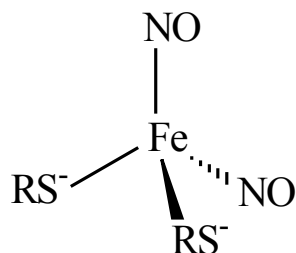
"Slobodno" gvožđe obuhvata jone Fe²⁺ i Fe³⁺ koji se nalaze u nestabilnim kompleksima sa ligandima male molekulske mase ili labilno vezani za proteine (136,137). Smatra se da je mokraćna kiselina jedan od najvažnijih liganada za "slobodno" gvožđe u biološkim sistemima (60,138). Nivo "slobodnog" gvožđa se povećava u nekim oboljenjima, kao i u uslovima oksidativnog stresa (60).

"Slobodno" gvožđe predstavlja izvor jona gvožđa za Fentonovu reakciju (60): reakcijom sa H₂O₂ Fe²⁺ katalizuje nastajanje vrlo reaktivnog hidroksil radikala (Reakcija 10). Oksidovani metal se redukuje ćelijskim reduktivnim ekvivalentima, kao što je superoksid anjon radikal (O₂⁻), (Reakcija 11). Ukupna, Haber-Weiss reakcija (Reakcija 12) odigrava se i bez prisustva jona gvožđa, ali znatno sporije.



1.12.4.4. Dinitrozil kompleksi gvožđa (DNIC) u biološkim sistemima

Dinitrozil kompleksi gvožđa tipa Fe(I)(NO)₂(RS⁻)₂ nastaju u uslovima povećane produkcije NO u makrofagima, ćelijama jetre, glatkih mišića i pankreasa, kao i u tumorima. (139-145). Tiolni ligandi u ovim kompleksima potiču iz -SH grupa proteina. Pored tiolnih grupa i ostaci histidina u proteinima mogu da učestvuju kao ligandi u DNIC kompleksima (143).



Slika 10. Struktura paramagnetičnog DNIC sa tiolima, $\text{Fe(I)(NO)}_2(\text{RS}^-)_2$ kompleksa.

Osim dinitrozil kompleksa sa proteinima koji sadrže gvožđe u aktivnom mestu, u biološkim sistemima postoje i DNIC sa "slobodnim" gvožđem (144-149) i tiolima male molekulske mase (150). U nekim biološkim sistemima "slobodno" gvožđe predstavlja glavni izvor DNIC kompleksa (145,151).

Prisustvo DNIC u biološkim sistemima može da služi kao marker za praćenje azot monoksida u uslovima njegove povećane produkcije, do koje dolazi nakon izlaganja biološkog sistema određenim stimulansima (143). Međutim, na osnovu činjenice da se DNIC kompleksi tako često javljaju u biološkim sistemima izloženim NO, može se pretpostaviti da oni mogu imati i značajne biološke funkcije.

Azot monoksid poreklom iz glatke vaskularne muskulature može da se stabilizuje i čuva u obliku proteinskog DNIC, iz kojeg se delovanjem intra - i ekstracelularnih tiola oslobađa DNIC male molekulske mase (150,152-155).

NO grupe u dinitrozil kompleksima male molekulske mase imaju karakter nitrozonijum (NO^+) jona i sposobni su da S-nitroziluju tiolna jedinjenja, pri čemu nastaju S-nitrozotioli (RSNO). Najnovija istraživanja pokazuju da DNIC nastali iz "slobodnog" gvožđa imaju sposobnost da izvrše S-nitrozovanje određenih proteina, kao što su kaspaze, što inhibira NO-posredovanu apoptozu (157).

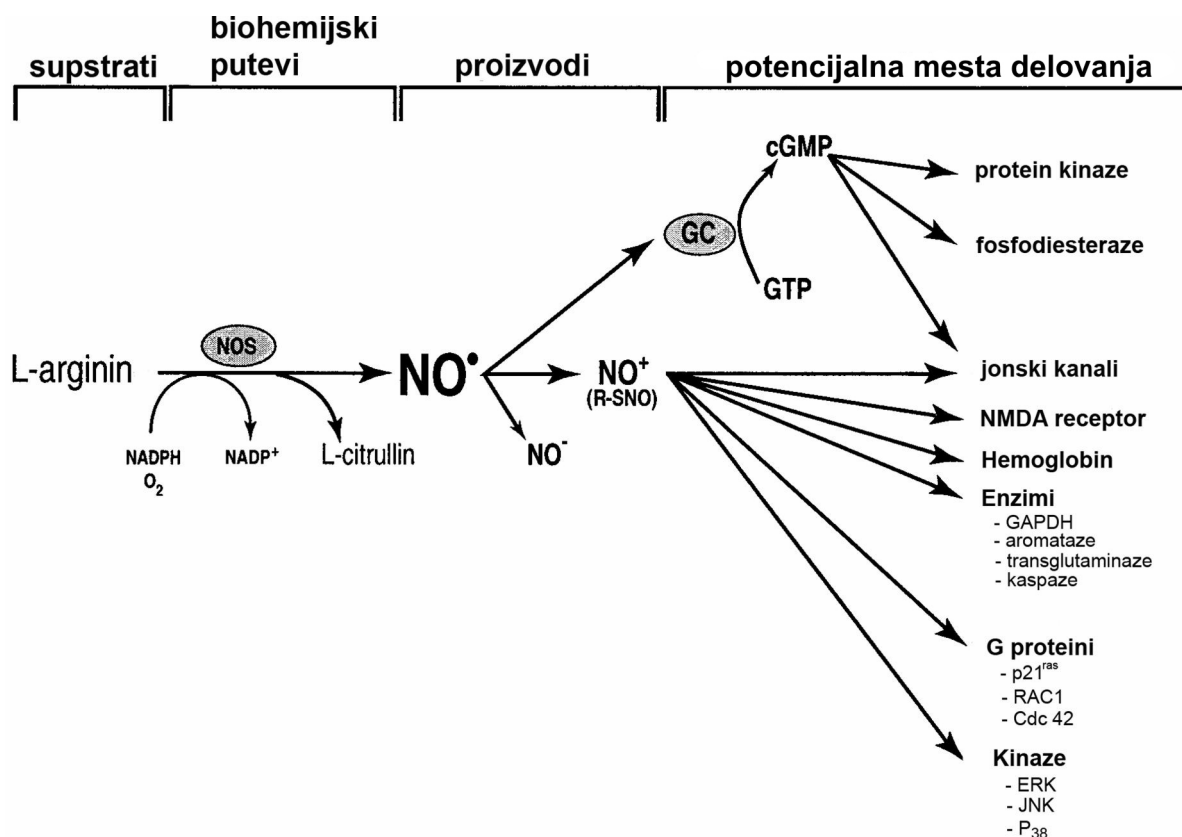
Nastajanje DNIC kompleksa sa "slobodnim" gvožđem sprečava njegove katalitičke prooksidativne reakcije, što predstavlja jedan od anti-oksidativnih mehanizama NO (158-161).

1.12.4.5. S-nitrozilovanje

S-nitrozilovanje predstavlja hemijsku reakciju prenosa NO^+ ekvivalenta na slobodne tiolne grupe u molekulima proteina ili tiola male molekulske mase, pri čemu nastaju nitrozotioli (RSNO). NO^+ grupa može i direktno da se prenosi između različitih S-nitrozotiola u procesu transnitrozilacije.

S-nitrozilovanje i denitrozovanje mogu da indukuju promenu konformacije molekula proteina i/ili pristup supstratu, što se smatra za osnov regulatornog mehanizma ove kovalentne modifikacije (102,155,156).

Poznato je da je S-nitrozilovanje uobičajena post-translaciona modifikacija, te da ima niz zajedničkih osobina sa fosforilacijom (158). S-nitrozilovanje određenih tiolnih grupa u molekulu proteina može predstavljati redoks signal, ili može, reakcijom trans-nitrozovanja, doći do transfera NO na tiolne grupe drugih proteina u datom signalnom putu. Proteini čija se aktivnost reguliše ovim modifikacijama mogu u oba slučaja biti prekidači, ili komponente kompleksnih signalnih puteva. To mogu biti enzimi, G proteini, transkripcioni faktori, transporteri i jonski kanali (Slika 11).



Slika 11. Šematski prikaz primera proteina čija je aktivnost regulisana S-nitrozilovanjem. Jednom nastala nitrozilujuća (NO⁺) vrsta može da aktivira niz proteina S-nitrozilovanjem, bilo direktno, ili trans-nitrozilovanjem, pomoću nastalih nitrozotiola (RSNO) (158).

S-nitrozilovanje određenih tiolnih grupa u NMDA receptoru snižava njegovu aktivnost, što ima protektivnu ulogu u NMDA-indukovanoj citotoksičnosti (159). S-nitrozilovanje kaspaze smanjuje aktivnost enzima i sprečava smrt ćelije po apoptotskom mehanizmu (160-162). S druge strane, S-nitrozilovanje kompleksa u mitohondrijama inhibira ćelijsko disanje (163). S-nitrozilovanjem se reguliše i aktivnost kalcijumovih kanala (165,165). Mali GTP-vezujući protein p21^{ras} se takođe aktivira S-nitrozilovanjem, što dovodi do modulacije MAP kinazne kaskade (166) i ćelijskog specifičnog odgovora - apoptoze (167). S-nitrozilovanje učestvuje i u prokariotskoj transdukciji signala. Tako, analogno oksidativnom stresu, nitrozativni stres u *E.coli* aktivira se S-nitrozilovanjem transkripcionog faktora OxyR (168).

1.12.4.6. Nitrovanje tirozina *in vivo*

Proteini sadrže u proseku 4% tirozina, ali samo manji deo proteina prisutnih u biološkim sistemima podleže reakciji nitrovanja tirozina. Humana Mn-SOD je prvi protein u kojem je otkriveno nitrovanje tirozina *in vivo*. Ovaj enzim se primarno nitruje u mitohondrijama, a i jedini je protein u cerebrospinalnoj tečnosti u kojem je potvrđeno prisustvo ostatka nitrotirozina (169).

Povećana koncentracija slobodnog 3-nitrotirozina detektovana je u inflamatornim, infektivnim i degenerativnim procesima u kojima dolazi do oksidativnog stresa i povećane produkcije azot monoksida (170). Određene reaktivne vrste NO koje nastaju u ovim uslovima

izazivaju nitrovanje tirozina. Pretpostavlja se da slobodni 3-nitrotirozin nastaje proteolitičkom degradacijom nitrovanih proteina, i/ili nitrovanjem slobodnog tirozina.

Nitro grupa uvodi negativnu šaržu u molekul proteina, što utiče na lokalnu konformaciju proteina i mogućnost građenja vodoničnih veza sa susednim aminokiselinskim ostacima u molekulu proteina (171).

In vitro studije pokazuju da nitrovanje ostataka tirozina može inhibirati fosforilaciju ostataka tirozina posredovanu tirozin-kinazama, što ima značajne efekte u prenosu signala (172-174). Strukturne i jonske karakteristike 3-nitrotirozina u poređenju sa fosfotirozinom (PO₄-Tyr), ukazuju da nitrovanje tirozina predstavlja mehanizam koji pre vodi do aktivacije, nego do inhibicije ćelijskih signalnih kaskada (102). Za razliku od efekata nitrovanja ostataka tirozina u proteinima o sudbini i potencijalnoj toksičnosti slobodnog 3-nitrotirozina za sada se ne zna mnogo.

Iako nastajanje 3-nitrotirozina u biološkim sistemima zavisi od povećane produkcije azot monoksida, NO nije molekul koji može da izazove nitrovanje. Prvi biološki relevantan mehanizam nitrovanja tirozina dao je Knowles sa saradnicima (1974) pokazavši da nitriti mogu da nitruju tirozin u kiseloj sredini. Kasnije je dokazano da peroksinitrit izaziva nitrovanje ostatka tirozina 108 u Cu,Zn-SOD (175).

3-Nitrotirozin nastaje u brznoj reakciji azot dioksida (NO₂) sa tirozil radikalom (Tyr) (Reakcija 13):

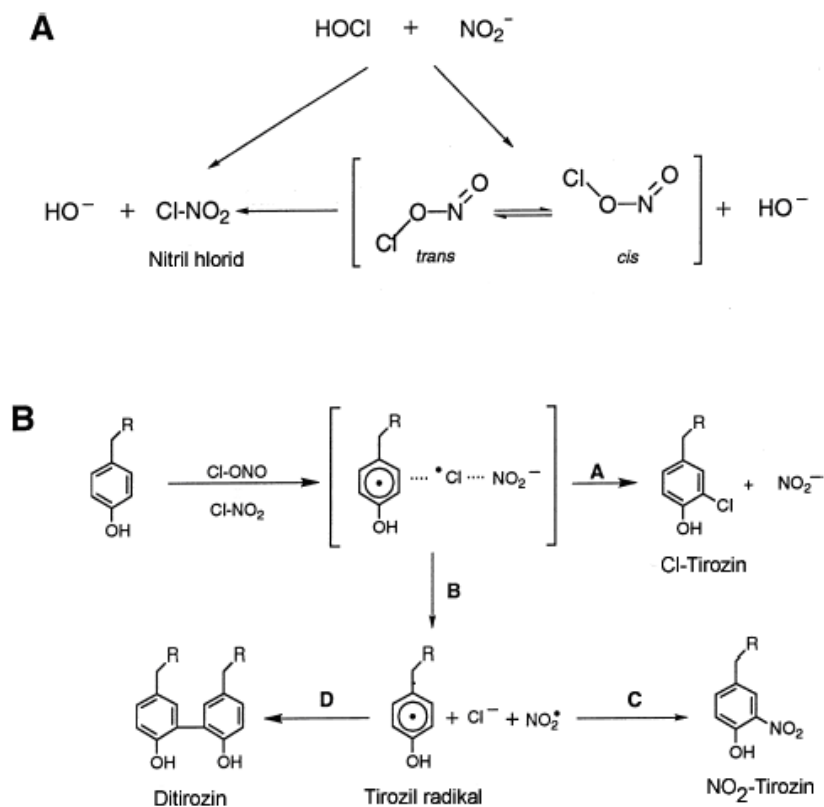


Azot dioksid (NO₂) može da nastane autooksidacijom azot monoksida ili razlaganjem peroksinitrita (102). Najviše izučavani mehanizam nitrovanja tirozina koji se smatra značajnim za biološke uslove je pomoću peroksinitrita. Nitrovanje tirozina peroksinitritom može biti spontano ili katalizovano. Nekatalizovano nitrovanje peroksinitritom je posredovano radikalskim ili neradikalskim mehanizmom: ONOOH može da reaguje direktno preko ekscitovanog konformera (ONOOH^{*}), ili pak podleže homolizi, pri čemu nastaju OH^{*} i NO₂^{*}. Druga mogućnost je nastajanje NO₂ i Tyr u polaznoj reakciji ONOOH (ili ONOOH^{*}) sa tirozinom. Kombinacijom ovih radikala nastaje 3-nitrotirozin i ditirozin.

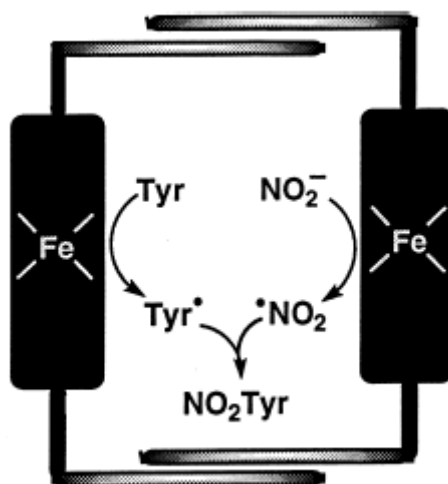
Do nitrovanja tirozina u visokom prinosu dolazi samo ukoliko se upotrebi sintetski peroksinitrit. Ukoliko se u eksperimentima koriste NO i superoksid anjon radikal ne dolazi do nitrovanja tirozina (102). Zbog toga se peroksinitrit, kao isključivi agens koji može da izazove nitrovanje tirozina pod biološkim uslovima, dovodi u pitanje, a istražuju se drugi reaktivni putevi koji mogu da generišu RNOS sposobne da izazovu nitrovanje tirozina. Od ovih mehanizama već je pomenut mehanizam nitrovanja tirozina koji se zasniva na oksidaciji nitrozo derivata. Najnoviji mehanizmi nitrovanja tirozina se zasnivaju na učešću nitrita, krajnjeg proizvoda metabolizma NO.

Mijeloperksidaze (MPO) su nespecifične peroksidaze, koje uz pomoć H₂O₂ mogu da oksiduju širok spektar supstrata. Hipohlorit (HOCl), proizvod MPO-katalizovane oksidacije hlorida, je kritični oksidant koji nastaje u fagocitima pod uslovima inflamacije. Nedavne studije su pokazale da nitril hlorid (NO₂Cl), proizvod reakcije NO₂⁻ i HOCl, reaguje sa tirozinom, dajući tirozil radikal, 3-hlorotirozin, 3-nitrotirozin i ditirozin (Slika 12) (102).

Van der Vliet i saradnici (176) su pokazali da mijeloperksidaza može da oksiduje nitrit do NO₂ u prisustvu vodonik peroksida. Pri istim uslovima dolazi do oksidacije tirozina do Tyr, tako da ovi radikali međusobnim reakcijama daju 3-nitrotirozin i/ili ditirozin (Slika 26).



Slika 12. Nitrovanje, hlorovanje i oksidacija tirozina reakcijom nitrita i hipohloraste kiseline. (A) Pretpostavljeni mehanizam nastajanja nitril- hlorida u reakciji nitrita i hipohloraste kiseline. (B) Mehanizam modifikacije tirozina sa ClNO_2 . Polazna reakcija obuhvata transfer jednog elektrona i nastajanje tirozil radikala, radikala hlora i nitrita. Reakcijom A nastaje 3-hlorotirozin, a u reakciji B nastaju hlorid i tirozil radikal. Kombinacijom tirozil radikala i NO_2^\cdot nastaje 3-nitrotirozin (Reakcija C), dok kombinacijom dva tirozil radikala nastaje 3,3'-dityrozin (Reakcija D) (102).



Slika 13. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja 3-nitrotirozina katalizom pomoću hemperoksidaza. Kooperativna oksidacija nitrita i tirozina koja se odigrava na nezavisnim aktivnim centrima enzima dovodi do stvaranja 3-nitrotirozina (102).

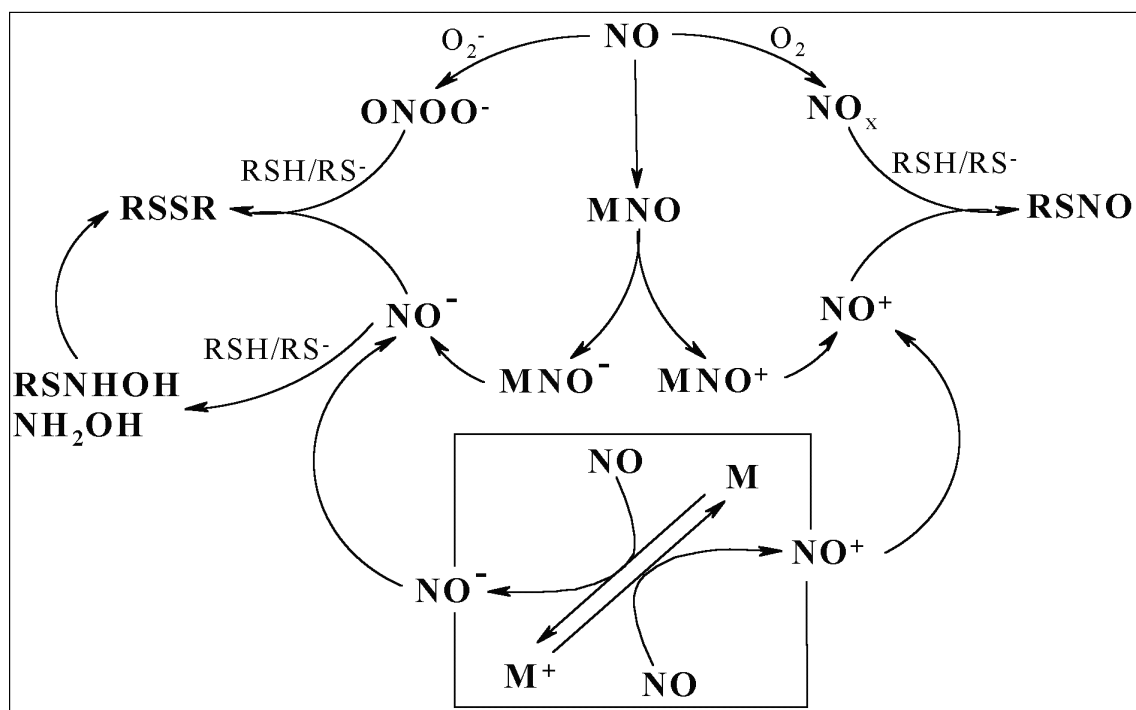
Visoke koncentracije nitrita u biološkim sistemima koje zavise od aktivnosti NOS-a govore u prilog navedenim mehanizmima.

Takođe, značajno je istaći da su mikroglijalne ćelije u lezijama humane multiple skleroze imunoreaktivne na iNOS, 3-nitrotirozin i MPO, što daje potvrdu MPO-zavisnom mehanizmu nitrovanja tirozina u neurološkim bolestima (177,178). Pored toga, u aterosklerotičnim lezijama je detektovan i 3-hlorotirozin, specifični marker oksidacionog hlorovanja katalizovanog MPO (179). Prisustvo GSH, amina i askorbata, koji reaguju sa NO_2Cl (180), ili prisustvo oksihemoglobina, koji reaguje sa nitritima (102) može uticati na smanjenje kapaciteta nitrovanja mehanizmima zasnovanim na produkciji NO_2Cl .

1.12.5. Indirektni efekti azot monoksida

1.12.5.1. Reaktivne vrste NO (RNOS)

Pri (pato)fiziološkim koncentracijama azot monoksid reaguje u biološkim sistemima sa molekulskim kiseonikom i superoksid anjon radikalom (O_2^-) (181,182) (Slika 14) ispoljavajući svoje indirektno efekte. Kao proizvodi reakcija sa kiseonikom i superoksid anjon radikalom nastaju viši oksidi azota (NO_x), odnosno peroksininitrit (ONOO^-), koji su znatno reaktivniji od samog NO i predstavljaju reaktivne NO vrste (RNOS). Azot monoksid kompleksiran za metalni jon može biti (ređe) neutralan ili se, u zavisnosti od toga da li je u datom kompleksu donor ili akceptor elektrona u odnosu na metalni jon, ponašati kao nitrozonijum (NO^+), odnosno nitroksilni (NO^-) jon (171) (Slika 19). Redoks srodnici azot monoksida, NO^+ i NO^- vrste takođe predstavljaju NOS.



Slika 14. Osnovne reakcije NO u biološkim sistemima. Tiolne grupe iz proteina i niskomolekularnih tiola u biološkim sistemima su primarne mete za nastale RNOS (181).

1.12.5.2. Reakcija NO sa O₂: NO_x

Autooksidacijom NO u gasnoj fazi i u nepolarnoj sredini nastaju NO₂, N₂O₃ i N₂O₄ (Reakcije 14, 15 i 16) (118).



Reakcijom NO/O₂ u vodenoj sredini nastaju proizvodi koji se razlikuju od onih u gasnoj fazi i koji nisu u potpunosti okarakterisani i zato se obeležavaju sa NO_x. Primarni proizvod autooksidacije NO u vodenoj sredini ima empirijsku formulu N₂O₃. Na konstantu brzine autooksidacije NO malo utiče pH, temperatura, (182-184), kao i prisustvo redukcionih sredstava, kao što su GSH, askorbat ili ferocijanid (185-187). To ukazuje da će brzina autooksidacije NO u biološkim sistemima zavisi isključivo od koncentracije O₂ i NO.

Pošto je rastvorljivost NO i O₂ više nego 20 puta veća u lipidnim delovima ćelije nego u vodenoj sredini, može se očekivati da će se autooksidacija NO primarno odvijati u lipidnom dvosloju bioloških membrana. Zbog neznatnog prisustva vode u hidrofobnoj sredini i hidroliza NO_x biće smanjena, što će dodatno produžiti poluživot i reaktivnost NO_x. NO_x nastao u membranama primarno će reagovati sa bočnim aminokiselinim ostacima membranskih proteina, ili proteina koji se nalaze u blizini membrane (118).

Azot u N₂O₃ ima formalno oksidaciono stanje +3 i ponaša se kao nosilac NO⁺ (nitrozonijum) jona, tako da može da vrši reakcije nitrozovanja. U vodenoj sredini brzo se hidrolizuje do nitrita (Reakcija 17) (118). Kompetitivna reakcija je reakcija S-nitrozovanja tiola, pri čemu nastaju S-nitrozotiole (Reakcija 18). NO_x izaziva i reakcije N-nitrozovanja amina i tirozina, ali znatno sporije. NO u prisustvu kiseonika može da izazove i nitrovanje tirozina (188). NO_x oksiduju dopamin i druge kateholamine. Askorbat je vrlo efikasan hvatač NO_x, čime štiti biomolekule od RNOS (118).



1.12.5.3. Reakcija nastanka peroksinitrita

In vitro eksperimenti su pokazali da brzom reakcijom između NO i O₂⁻ nastaje izuzetno reaktivni proizvod, peroksinitrit (Reakcija 19) (189).

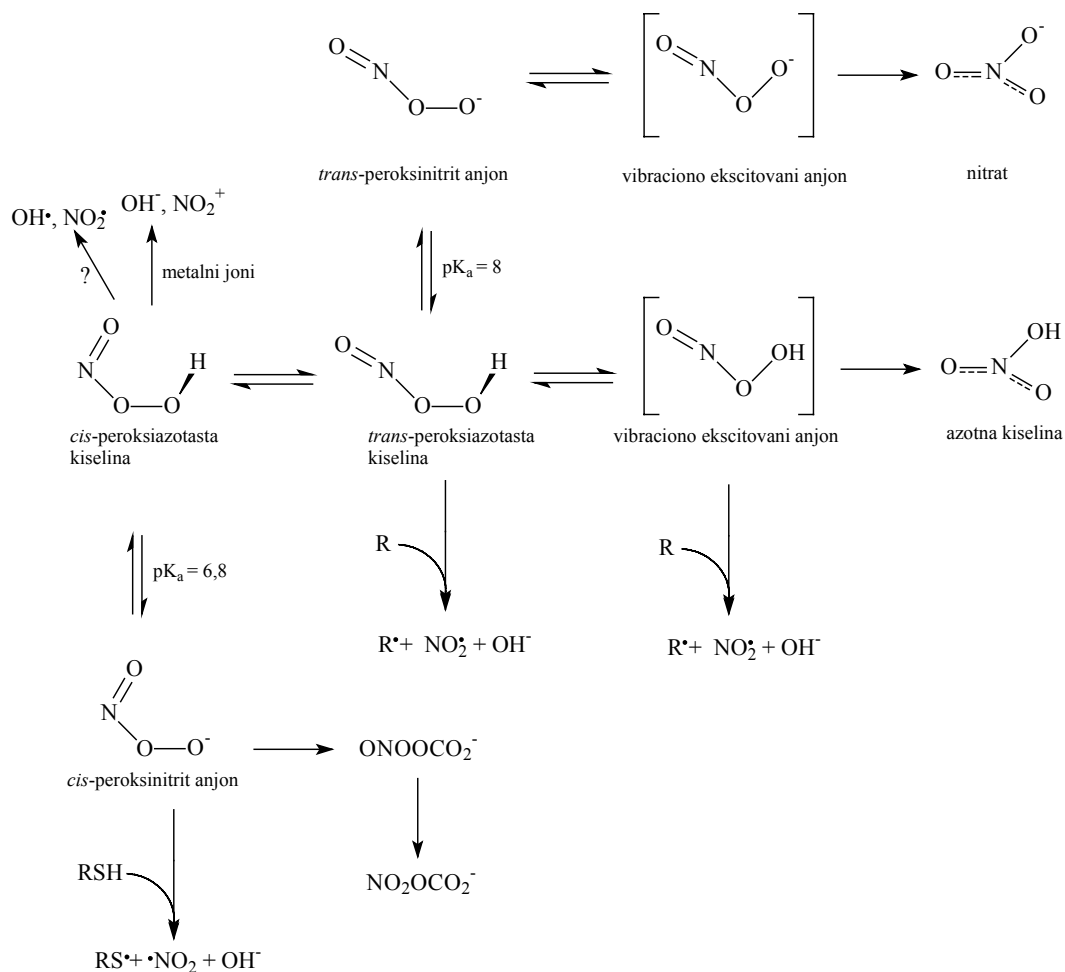


Direktni dokazi za nastajanje peroksinitrita *in vivo* za sada ne postoje, dok su indirektni dokazi kontradiktorni. Količina peroksinitrita koji bi mogao da nastane *in vivo* zavisice od koncentracije NO i superoksid anjon radikala, koje ce opet zavisiti s jedne strane od produkcije ovih radikala, a sa druge, od njihovih reakcija sa bioloskim metama (190).

S obzirom da su brzine reakcije O_2^- sa SOD i NO slicne, te da je reakcija NO sa superoksid anjon radikalom brza od reakcije NO sa hemoproteinima ($k < 10^8 M^{-1}s^{-1}$), zakljucuje se da se u bioloskim sistemima NO moze takmiciti sa SOD za O_2^- . S druge strane, (nanomolarna) koncentracija superoksid anjon radikala pod nestresnim, fizioloskim uslovima (191) je manja od koncentracije NO (20 nm do 2-4 μM), dok je normalna koncentracija SOD u celijama 4 - 10 μM (192). Iz ovoga proizilazi da bi za prelazak 50% superoksid anjon radikala u peroksinitrit bio potreban fluks azot monoksida od 2-4 μM (193), sto znaci da ce pod normalnim fizioloskim uslovima koncentracija peroksinitrita biti neznatna. Nastajanje znacajnijih količina peroksinitrita moze se ocekivati na mestima gde je lokalna koncentracija NO visoka (193), ili u regionima u kojima se SOD nalazi u koncentracijama manjim od mikromolarnih (118). Pretpostavlja se da bi najveća količina peroksinitrita u bioloskim sistemima mogla da nastane u mitohondrijama. Superoksid anjon radikal nastaje u mitohondrijama kao rezultat aerobne respiracije, dok NO moze da ude u mitohondrije difuzijom iz celija endotela, ili da nastane kao rezultat aktivnosti mtNOS.

Ogranicavajući faktor u nastajanju peroksinitrita je reakcija superoksid anjon radikala sa SOD, kao i reakcije NO sa bioloskim metama, kao sto je oksihemoglobin, u kojima nastaje nitrit, krajnji proizvod metabolizma NO.

Peroksinitritni anjon ($ONOO^-$) je prilično nereaktivan. Na fizioloskom pH $ONOO^-$ se brzo protonuje do nestabilne i vrlo reaktivne peroksiazotaste kiseline ($HO-O-N=O$), koja se raspada preko niza reaktivnih intermedijera do nitrata i (manjim delom) do nitrita (Slika 15). Peroksinitritni anjon dodat celijama, tkivima ili telesnim tečnostima brzo se protonuje do peroksiazotaste kiseline, sto dovodi do oksidacije tiolnih grupa i drugih antioksidanata, oksidacije lipida, cepanja lanaca DNK, nitrovanja i dezaminacije nukleinskih baza. Najviše izučavana reakcija peroksinitrita sa proteinima je reakcija nitrovanja ostataka tirozina. Nitrovanje ostataka tirozina *in vivo* se često uzima kao indikacija generisanja peroksinitrita, pod datim (pato)fizioloskim uslovima. Sve ove reakcije mogu imati potencijalno štetne posledice za bioloske sisteme (60,98).



Slika 15. Reakcije i transformacije peroksinitrita. ONOOH se u manjoj meri cepa homolitički na OH⁻ i NO₂⁺. Neki joni metala mogu katalizovati heterolitičko cepanje ONOOH na OH⁻ i NO₂⁺, što objašnjava zašto prisustvo ovih metalnih jona ubrzava reakcije nitrovanja peroksinitritom. Na pH 7,4 oko 20% ONOO⁻ će biti u obliku ONOOH koji se brzo raspada. Vrste koje mogu da izazovu oksidativna oštećenja obuhvataju *cis*-ONOO⁻ i *cis*-ONOOH (koji imaju ograničenu reaktivnost, npr. mogu oksidovati tiolne grupe) i *trans* izomere i ekscitovana stanja *trans* izomera, posebno ONOOH. Aktivirani, *trans*-ONOOH ima redukcioni potencijal blizak potencijalu OH⁻ i jak je oksidans. Neki dodati biomolekuli (uključujući i tiole) mogu da budu oksidovani ovim reaktivnim vrstama peroksinitrita do radikala, pri čemu nastaje i NO₂. Reakcijom CO₂ sa ONOO⁻ nastaje O=N-OOCO₂⁻, za kojeg se pretpostavlja da premeštanjem daje reaktivni nitrokarbonatni jon, koji je efikasniji nitrujući agens od samog peroksinitrita (60).

1.12.5.4. Redoks-srodnici NO: NO⁺ i NO⁻ vrste

U biološkoj sredini NO može da se oksiduje do nitrozonijum katjona (NO⁺), ili redukuje u nitroksilni anjon (NO⁻), koji se pod fiziološkim uslovima delimično protonuje (194), tako da se ova vrsta obeležava sa HNO/NO⁻. NO⁺ i HNO/NO⁻ se nazivaju redoks-srodnicima NO i odavno se smatra da su obe vrste, koje su znatno reaktivnije od samog NO, veoma aktivne u učešću u biološkim funkcijama. NO⁺, NO i NO⁻ se mogu posmatrati i kao analozi redoks formi kiseonika: O₂, O₂⁻ odnosno O₂²⁻ (195).

Mehanizmi konverzije NO u NO⁺ i HNO/NO⁻ vrste relevantni za biološke sisteme nisu u dovoljnoj meri razjašnjeni. Pod fiziološkim uslovima NO⁺ može da se nađe u jedinjenjima kao što su metal-nitrozil kompleksi (MNO), tionitriti (RSNO), nitrozamini (RR'N-NO) i viši oksidi azota (N₂O₃, N₂O₄) (195,196). Nitroksil može da nastane kao proizvod NOS-katalizovane oksidacije arginina (197) kao i pri oksidaciji azida lignin-peroksidazom (198).

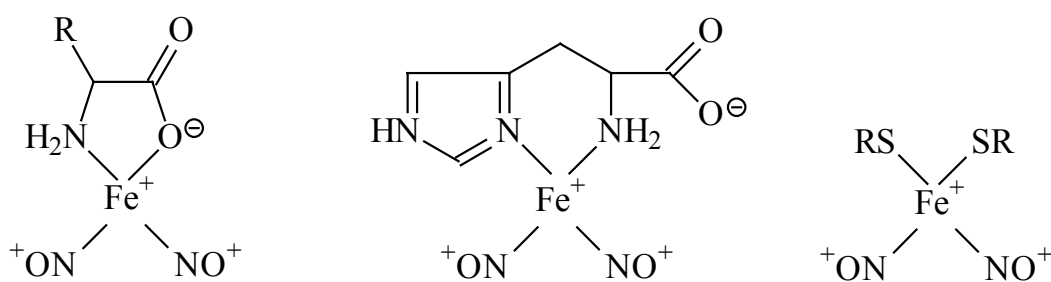
Redoks reakcije NO u biološkim sistemima odvijaju se uz pomoć metalnih jona (117,195,199). Poznato je da Cu,Zn superoksid dismutaza i hemoproteini (hemoglobin i citohrom c) (187), redukuju NO do NO⁻. MetHb i metmioglobin (200) oksiduju NO do NO⁺. Prilikom ugrađivanja NO u DNIC komplekse nastaju i NO⁺ i NO⁻ vrste.

Mnogi donori NO koji se koriste u eksperimentima *in vitro*, kao što su tionitrati, S-nitrozotiol, nitrozil halogenidi, C-nitroso jedinjenja, organski nitriti i natrijum nitroprusid, pored azot monoksida oslobađaju i NO⁺. Nitrozonijum jon nastaje i razlaganjem nitrita u kiselj sredini (201). Kao donori nitroksila u eksperimentima *in vitro* najčešće se koriste Angelijeva so (HN₂O₃⁻; natrijum trioksidinitrat) i Pilotijeva kiselina (N-hidroksibenzensulfonamid) (201).

1.12.5.5. DNIC kompleksi i nastajanje NO⁺ i NO⁻ vrsta

Već smo pomenuli da u biološkim sistemima NO gradi DNIC komplekse sa gvožđem vezanim u proteinima i sa takozvanim "slobodnim" gvožđem. U hemijskim eksperimentima je pokazano da DNIC kompleksi, tipa (NO⁺)₂Fe(I)L₂, nastaju pod anaerobnim uslovima u neutralnim rastvorima koji sadrže NO, dvovalentno gvožđe i niz anjonskih liganada, uključujući aminokiseline, peptide i proteine (202,203). Sve α-aminokiseline se vezuju za jon gvožđa u DNIC kompleksima preko karboksilne i amino grupe, a od bočnih ostataka u kompleksiranju učestvuje imidazol histidin i tiolna grupa iz cisteina (Slika 21) (203). Tioli pokazuju veći afinitet za gvožđe u DNIC kompleksima u odnosu na druge ligande (202). Od DNIC kompleksa sa tiolima najstabilniji su kompleksi sa proteinskim -SH grupama, sledi DNIC sa redukovanim glutationom (GSH), a DNIC sa cisteinom je, slično DNIC kompleksima sa drugim aminokiselinama, nestabilan (152,202).

NO grupa u DNIC kompleksima malih molekulske masa ima karakter nitrozonijum jona (150). U nizu radova je pokazana sposobnost DNIC kompleksa sa tiolima malih molekulske masa (cistein, GSH) da izvrše reakcije S-nitrozovanja tiola male molekulske mase i proteinskih tiola (150,152,204-206). Kako su DNIC sa tiolima male molekulske mase nestabilni, u procesu njihovog raspadanja doći će do nastajanja nitrita i S-nitrozovanja tiola, koji je prisutan u višku u reakcionj smeši (Slika 16).



Slika 16. DNIC kompleks sa α-aminokiselinom, sa His i sa tiolima (203).

U reakciji Fe(II), NO i anjonskih liganada male molekulske mase prvo nastaje neutralni, Fe(II)(NO)₂L₂ kompleks (207). Reakcijom NO sa ovim kompleksom dolazi do disproporcionisanja NO, tj. do redukcije NO do NO⁻, koji zatim u procesu protonizacije, dimerizacije i dehidratacije daje azotsuboksid (N₂O), te do oksidacije NO grupe u kompleksu u NO⁺ i prelaska Fe(II) u (formalno) Fe(I) stanje (150,205). Međutim, kako tioli efikasno reaguju sa HNO/NO⁻ dajući hidroksilamin, i ovaj proizvod se može očekivati u reakcionoj smeši.

1.12.5.6. Reakcije NO⁺ vrste u biološkim sistemima

Nitrozonijum vrste izazivaju reakcije nitrozovanja sa O, S, N i C centrima. NO⁺ brzo hidrolizuje u vodenoj sredini do nitrita. Najreaktivniji je nitrozonijum (208), zatim po reaktivnosti slede tioli, amini i hidroksilne grupe iz alkohola (209):



Od opisanih nosioca NO⁺ grupe, NO_x i nitrozil kompleksi metMb i (u znatno manjoj meri) metHb mogu da izvrše sve navedene reakcije nitrozovanja (200). Za NO⁺ iz DNIC sa tiolima male molekulske mase (cistein, GSH) pokazano je da reaguje sa vodom i sa tiolnim grupama iz proteina i tiola male molekulske mase (152,210).

1.12.5.7. O-Nitrozovanje

Voda, kao najzastupljeniji nukleofil u fiziološkoj sredini, podleže intenzivnom O-nitrozovanju, pri čemu pri neutralnom pH nastaje nitrit (Reakcija 20) (211). O-nitrozovanjem alkohola nastaju stabilni nitritni estri (Reakcija 23) (209). Nitritni estri se upotrebljavaju kao vazodilatatori (212). I askorbinska kiselina podleže reakciji O-nitrozovanja, što može da bude od fiziološkog značaja (213).

1.12.5.8. S-Nitrozovanje

Nitriti, koji u kiseloj sredini daju NO⁺ jone, S-nitroziluju tirole u visokom prinosu (Reakcija 24). Ova reakcija može da bude relevantna za nastajanje S-nitrozotiola u želucu (pH 2-4), ili u fagosomima (pH 3-6) (91). Oksidi azota, (NO_x) nastali autooksidacijom NO, kao nosioci NO⁺ grupe, mogu takođe efikasno da izvrše S-nitrozilovanje tiola. Smatra se da su da su DNIC kompleksi sa tiolima male molekulske mase najrelevantniji S-nitrozilujućim agensima pod fiziološkim uslovima (150).



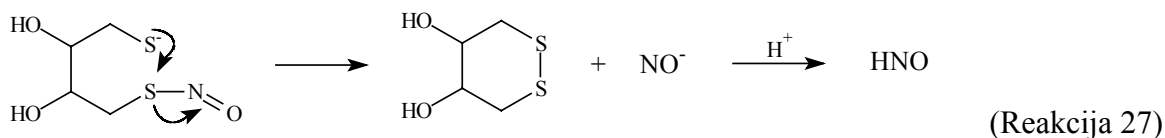
S-nitrozotiosioli su, sa izvesnim izuzecima, nestabilni u vodenoj sredini. Tako na primer, GSNO se raspada tokom nekoliko sati, dok se Cys-NO raspada u toku nekoliko minuta. Prisustvo jona metala, posebno Fe(II) jona znatno ubrzava raspadanje S-nitrozotiola. Proteinski RSNO su, po pravilu, znatno stabilniji.

Kako se RSNO male molekulske mase, kao što je Cys-NO, ponašaju kao donori NO, do skora je bilo široko prihvaćeno da se S-N veza u S-nitrozotiolima cepa homolitički, uz oslobađanje NO i nastajanje tiol (RS \cdot) radikala (Reakcija 25) (214). Međutim, detaljna istraživanja su pokazala da se u vodenoj sredini cepanje S-N veze u RSNO male molekulske mase u najvećoj meri vrši heterolitički, uz oslobađanje RS $^-$ i (u prisustvu na primer proteinskih tiola) i transfera NO $^+$ na tiolne grupe iz proteina (S-transnitrozovanje) (Reakcija 26).



Ovakvo ponašanje S-nitrozotiola potvrđuje (dominantno) NO $^+$ karakter azot monoksida vezanog u RSNO.

Do heterocikličnog cepanja S-N veze iz RSNO, u prisustvu slobodnih tiola, uz oslobađanje znatnih količina NO $^-$, dolazi samo u slučaju da se S-nitrozotiol nalazi u vicinalnim ditiolima (214):



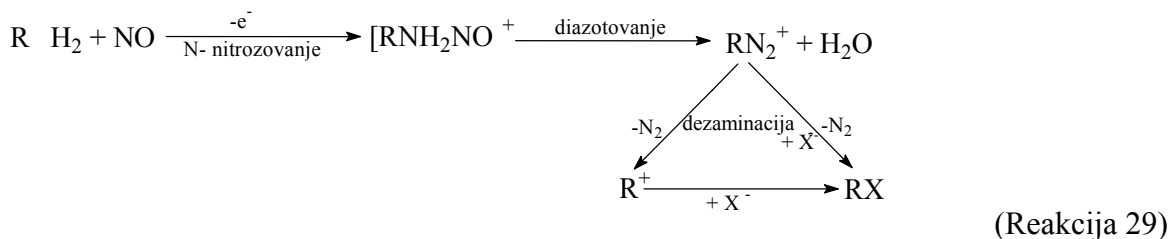
Iz napred navedenog proizilazi da se NO u značajnijem prinosu može osloboditi iz RSNO samo redukcijom (Reakcija 28) (201):



Na primeru najmanje stabilnog S-nitrosotiola, Cys-NO, pokazano je da tragovi jona bakra i gvožđa, prisutni u rastvoru, efikasno katalizuju ovu reakciju (206).

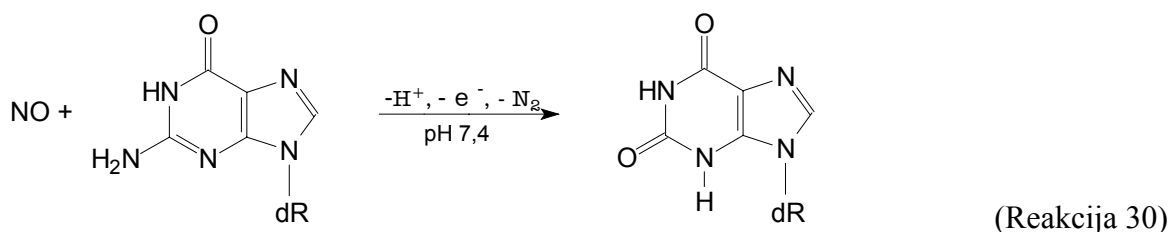
1.12.5.9. N-Nitrozovanje primarnih i sekundarnih amina

Reakcijom NO $^+$ sa sekundarnim aminima nastaju potentni karcinogeni N-nitrozamini (Reakcija 22) (215,216). Primarni amini takođe podležu N-nitrozovanju, ali je nastali proizvod nestabilan i raspada se u nekoliko koraka (Reakcija 29):



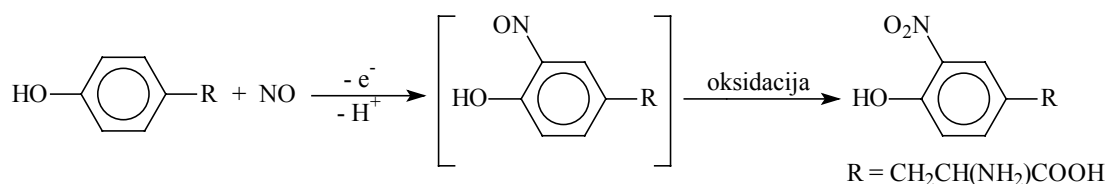
Proizvodi ovih reakcija: RN_2^+ , R^+ i RX su karcinogene alkilirajuće vrste (217).

Reakcija NO^+ sa primarnim aminima može da bude relevantna *in vivo* zbog mutacija u molekulu DNK koje nastaju kao posledica dezaminacije baza. Tako, na primer, reakcijom NO^+ sa guaninom nastaje ksantin (Reakcija 30), koji se sparuje različito od guanina, tako da, ako se "greška" ne ispravi pre replikacije DNK, može doći do mutacije (218):



1.12.5.10. C-Nitrozovanje

Primer za C-nitrozovanje u biološkim sistemima je već pomenuto NO-posredovano nitrovanje tirozina. Jedan od potencijalno biološki relevantnih mehanizama nitrovanja tirozina koji je znatno manje ispitivan u odnosu na druge mehanizme je reakcija nitrozovanja prstena tirozina pomoću NO^+ vrsta, te oksidacija nastalog nitrozo u nitro derivat (Reakcija 31) (219):



1.12.5.11. Reakcije HNO/NO^- vrste u biološkim sistemima

Iz novijih istraživanja poznato je da nitroksil, HNO , ima pK_a 7,2 (194), tako da će se na neutralnom pH oko polovine prisutnog HNO naći u obliku nitroksilnog anjona NO^- . Nitroksilni anjon je reaktivna vrsta sa vrlo kratkim poluživotom (oko 1 msec) (196). U vodenoj sredini NO^- podleže brzom reakciji protonizacije, dimerizacije i dehidratacije u azotsuboksid, N_2O (Reakcija 32) (196):



Kompetitivna reakcija ovoj je reakcija NO^- sa tiolima, u kojoj nastaje hidroksilamin i disulfid (Reakcija 33) (220):



GSH, kao molekul koji se u ćeliji nalazi u visokoj koncentraciji, predstavlja glavnu metu za ovu reakciju u biološkim sistemima (221). Opšte je prihvaćeno da detektovanje N₂O i/ili hidrosilamina u ispitivanom sistemu predstavlja dokaz za nastajanje HNO/NO⁻ vrste (220).

Nitroksil može da reaguje sa nizom blagih nukleofila, uključujući i amine (Reakcija 34)(194):



Pokazano je da NO⁻ reaguje sa nizom metalo-proteina (Reakcija 35) (222):



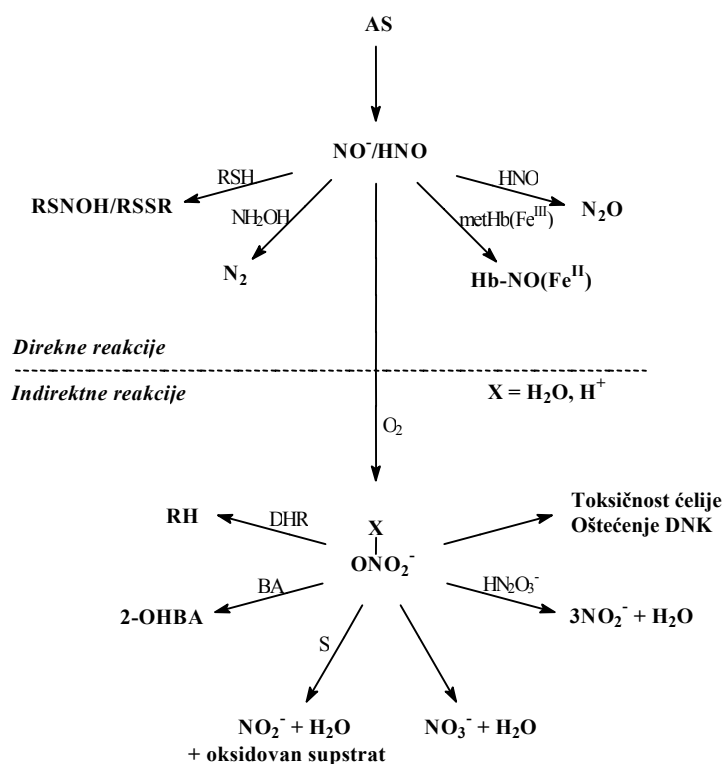
Liochev & Fridovich su 2002. predložili nitroksil kao supstrat za Cu,Zn-SOD. Reakcija nitroksila i feri oblika hemoglobina i mioglobina direktno daje fero nitrozil adukt (223).

Reakcijom nitroksilnog jona i kiseonika nastaje peroksinitrit (Reakcija 36) (224):



Peroksinitrit nastaje u reakciji kiseonika sa NO⁻ koji se oslobađa pri reakciji NO sa hemicitohromom c (199). Opšte je prihvaćeno da je glavni mehanizam za produkciju peroksinitrita u biološkim sistemima reakcija superoksid anjon radikala sa NO. Međutim, intracelularna koncentracija superoksid anjon radikala je niska, dok je koncentracija kiseonika više hiljada puta premašuje, što ukazuje da bi reakcija nitroksila i kiseonika mogla da bude značajan izvor peroksinitrita (196).

Efeti HNO/NO⁻ vrsta se dele na *direktne*, koji potiču od reakcija HNO/NO⁻ vrste i *indirektne*, koji potiču od reaktivne(ih) vrsta koje nastaju u reakciji HNO/NO⁻ sa kiseonikom i za koje je pokazano da se razlikuju od peroksinitrita (Slika 17) (225).

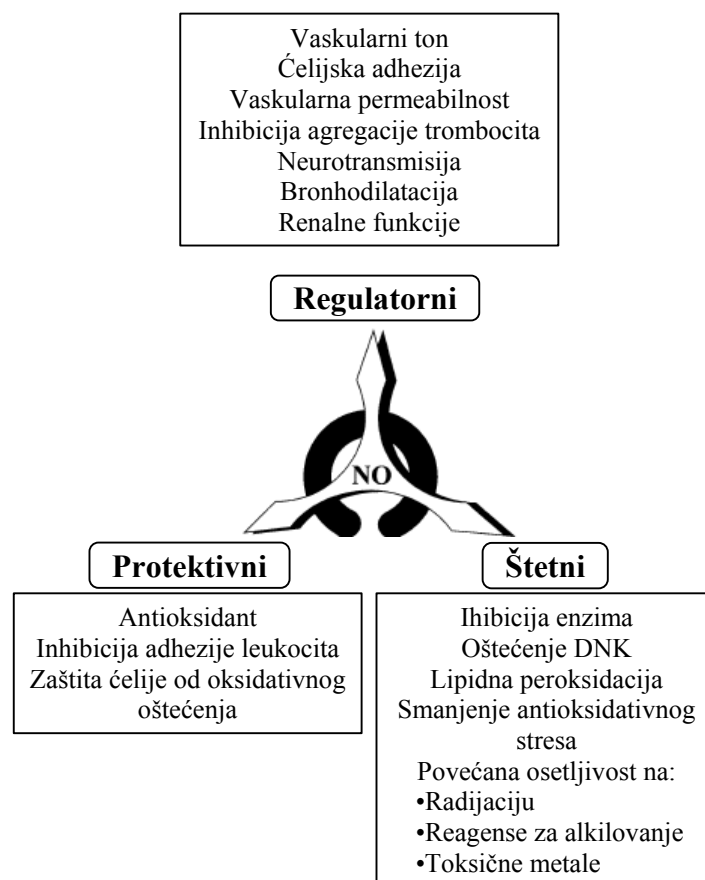


Slika 17. Direktne i indirektne reakcije HNO/NO⁻ (225).

Kao jedan od najinteresantnijih, *direktnih* efekata NO⁻, koji ima potencijalno veliki farmakološki značaj, navodimo nedavno otkriće da donori NO⁻ izazivaju vaskularnu relaksaciju i pozitivnu srčanu inotropiju, stimulisanjem (pretpostavlja se reakcijom sa proteinskim tiolima) kalcitonin gen-srodnog peptida (CGRP) (226-228).

1.12.6. Uloge azot monoksida u fiziologiji i patofiziologiji ćelije

Otkriće endogene sinteze NO u biološkim sistemima otvorilo je niz pitanja o njegovoj ulozi u raznim procesima u ćeliji. Danas se zna da ovaj molekul ima ključnu ulogu u homeostatskoj regulaciji kardiovaskularnog, nervnog i imunog sistema, dok pri njegovoj povećanoj produkciji dolazi do toksičnih efekata (Slika 18). Toksičnost NO se ispoljava u iniciranju hroničnih inflamatornih bolesti, septičnog i hemoragičnog šoka i niza autoimunih bolesti (229-236).



Slika 18. Primeri regulatornih, protektivnih i štetnih bioloških efekata azot monoksida (118).

Furchgott & Zawadzki (237) su prvi pokazali konstrikciono dejstvo acetilholina na vaskularne glatke mišiće. Novootkriveni faktor odgovoran za acetilholin-stimulisanu relaksaciju je nazvan opuštajući faktor nastao iz endotela (engl. "Endotel Derived Relaxing Factor" – EDRF). Kasnijim istraživanjima Ignarro i Moncada pokazali su da endotel arterija oslobađa NO, te da je EDRF ustvari azot monoksid (94,238,239).

Azot monoksid sprečava adheziju trombocita i leukocita za endotel krvnih sudova, inhibira agregaciju trombocita i indukuje disocijaciju agregiranih trombocita (240). Visoke koncentracije azot monoksida inhibiraju proliferaciju ćelija glatkih mišića i mogu indukovati apoptozu (241).

Makrofagi su jedno od glavnih mesta produkcije inducibilnog NO. Nivo NO se povišava prilikom infekcija i inflamatornih bolesti kao i autoimunih procesa (242,243) i pojave tumora. Azot monoksid je efektor molekula odgovornih za makrofagima-posredovanu citotoksičnost (244). Prekomerna produkcija azot monoksida dovodi do "down" regulacije sistemskog imuniteta u nosiocima tumora, kao i u životinja sa autoimunim i inflamatornim bolestima (245,246). S obzirom da makrofagi moduliraju ćelijsku proliferaciju mitogenih ili antigen-stimulisanih limfocita, NO se smatra za imunoregulatorni molekul u ovim sistemima (247).

U postoperativnom toku nakon transplantacije bubrega, povećana koncentracija NO je nadjena u procesu odbacivanja ovog organa (248,249). Makrofagi odbačenih bubrega aktivirani citokinom se smatraju glavnim izvorom azot monoksida (250). Na ulogu azot monoksida u transplantaciji ukazuje činjenica da reakcije odbacivanja mogu biti ublažene tretiranjem bubrega inhibitorima iNOS ili NO sakupljačima (251,252).

Ekperimentalni rezultati ukazuju da NO ima ulogu u nekim vrstama učenja, kao što je prostorno učenje (253).

Uloga nNOS u perifernom ili centralnom nervnom sistemu u mehanizmu bola nije u potpunosti poznata, ali na ulogu NO u ovim procesima ukazuje činjenica da bradikinin indukuje vaskularni bol koji slabi u prisustvu inhibitora nNOS ili u prisustvu nespecifičnih inhibitora gvanilat ciklaze (254).

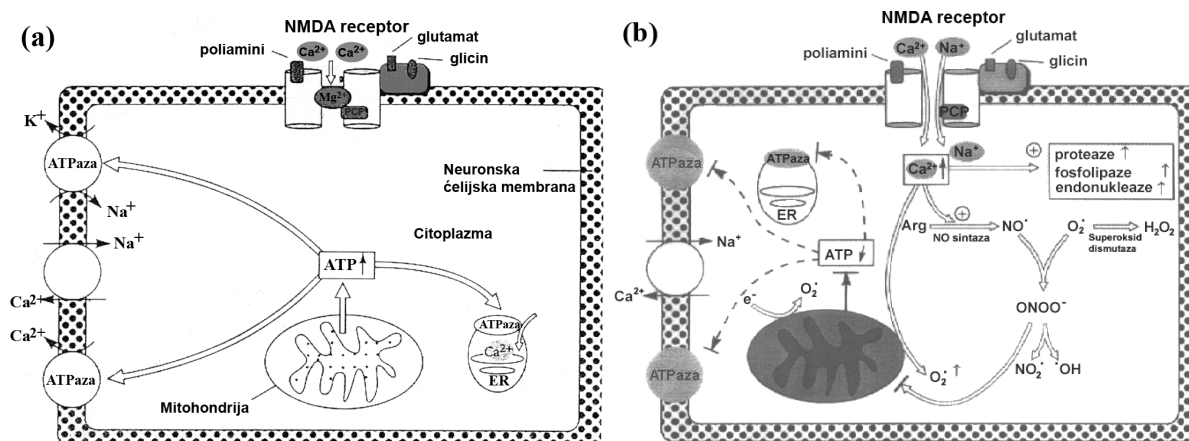
Danas se zna da svaki kardiovaskularni faktor rizika – hipertenzija, diabetes, hiper-lipidemija, pušenje, može dovesti do smanjenja bazalne ili stimulisanе NO posredovane vazodilatacije (255). Mehanizmi sniženja produkcije azot monoksida u kardiovaskularnim bolestima nisu sasvim jasni. Pretpostavlja se da do ovog dolazi usled nedostataka kofaktora eNOS, tetrahidro-biopterina, i/ili usled povećanja koncentracije nekog od endogenih inhibitora NOS (256). Do smanjenja nivoa NO u krvnim sudovima može doći i zbog oštećenja endotela u uslovima oksidativnog stresa (257).

Snižena aktivnost iNOS u imunom sistemu dovodi do povećane osetljivosti na infekciju, mada može imati i zaštitnu ulogu za ćelije tokom inflamatornog procesa. (258).

Sa druge strane, klinički i ekperimentalni dokazi o indukciji iNOS u pacijenata sa različitim patološkim stanjima su brojni. Tako, indukcija iNOS u vaskularnom sistemu predstavlja osnovni mehanizam vaskularnog kolapsa u septičnom šoku (259,260). Indukcija iNOS predstavlja važan patogeni mehanizam u reumatoidnom artritisu, kao i u astmi (261), oštećenjima kože (262), i u nekim tipovima degenerativnih inflamatornih bolesti CNS. Indukcija iNOS je važan odbrambeni mehanizam u odbrani od malarije (263), a verovatno i u drugim infekcijama određenih organa, kao što su na primer infekcije genitourinarnog trakta (264).

Uloga nNOS u patofiziologiji neuroloških oboljenja dobro je proučena na primerima poremećaja funkcija perifernog nervnog sistema (265). Produkcija azot monoksida je značajno smanjena u perifernim neuronima dijabetičara, što pretpostavlja se, doprinosi gastrointestinalnoj, erektilnoj i vaskularnoj disfunkciji (264). Smanjena aktivnost nNOS, uzrokovana genetskim promenama u strukturi, primećena je kod infantilne stenoze pilorusa (266).

Za patogenezu neurodegenerativnih promena kao što su Parkinsonova i Alchajmerova bolest, multipla skleroza i amiotrofična lateralna skleroza, zajednički je poremećaj funkcije mitohondrija i oksidativni stres (267). Sve je više dokaza koji ukazuju na ulogu ekscitotoksičnosti, koja nastaje kao posledica preterane aktivnosti NMDA-receptora u mehanizmima ćelijske smrti i kod akutnih i kod hroničnih neuroloških bolesti (268,269).



Slika 19. NMDA receptor - zavisna kaskada ćelijske smrti. (a) ATP koji nastaje u mitohondrijama koristi se u jonskim pumpama koje proizvode i održavaju napon i gradijent jona u membrani neurona, što održava bazalni potencijal. Koncentracija kalcijuma u citoplazmi se održava na nekoliko puta nižem nivou u odnosu na koncentraciju izvan ćelije pomoću ATP-aza, koje mehanizmom aktivnog transporta izbacuju kalcijum u ekstracelularni prostor ili u intracelularne organele koje čuvaju kalcijum, kao što je endoplazmatični retikulum (ER). (b) Ekscitotoksičnost može nastati kao posledica defekta u energetskom metabolizmu. Nedostatak ATP-a dovodi do depolarizacije membrane, posle čega sledi odvajanje voltažno-zavisnog Mg²⁺ bloka NMDA receptora što dovodi do influksa Ca²⁺ i Na⁺. Povećanje koncentracije kalcijuma izaziva aktivaciju kalcijum-zavisnih enzima uključujući i nNOS, što dovodi do povećane sinteze NO. NO može reagovati sa superoksid anjon radikalom pri čemu nastaje peroksininitrit (ONOO⁻) (270).

1.12.6.1. Jedinjenja koja oslobađaju azot monoksid

Kao primarni fiziološki transmitter sa širokim opsegom fizioloških i patofizioloških efekata, azot monoksid je već godinama u žiži interesovanja naučnika, ne samo u smislu svoje funkcije, već i u pravcu mogućeg delovanja na njegov metabolizam.

Ignarro i saradnici (271) su 2002. podelili farmakološka jedinjenja koja oslobađaju NO u dve grupe:

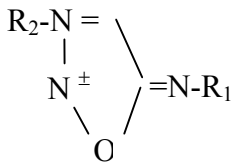
- Jedinjenja koja spontano oslobađaju NO ili neke od njegovih redoks srodnika;
- Jedinjenja koja zahtevaju prethodnu enzimsku biotransformaciju.

Prva grupa donora NO obuhvata NO u gasovitom stanju, natrijum nitroprusid (SNP), natrijum trioksodinitrat (Angelijeva so), dietilamin/NO i dietiltriamin/NO, sidnonimine i S-nitrozotiole. U drugu grupu spadaju organski nitrati i estri nitrita, uključujući nitroglicerini, amilnitriti, izosorb-dinitrat, izosorb-5-mononitrat i nikorandil. Ovoj klasifikaciji može se dodati i treća grupa, tzv. bifunkcionalnih donora NO u koju spadaju nitroaspirini i S-nitrozo-NSAID lekovi.

Opšte karakteristike donora NO prikazane su u Tabeli 2.

U daljem izlaganju biće reči o natrijum nitroprusidu, donoru NO korišćenom u našim eksperimentima.

Tabela 2. Opšte karakteristike donora NO.

Hemijska Grupa	Opšta struktura	Primeri	Oksidacijsko stanje (NO+2)	Mehanizam stvaranja NO
Organski nitrati	R_3C-ONO_2	nitroglicerini, izosorb-dinitrat	+5	pretežno enzimski
Organski nitriti	R_3C-ONO	izoamil-nitrit, izobutil-nitrit	+3	enzimski i hemijskom hidrolizom
Fero- nitro kompleksi	$(CN)_5Fe^{2+}]NO$	natrijum-nitroprusid	+3	enzimski i hemijskom redukcijom
Sidnonimini		molsidomin, pirsidomin	+3	otvaranjem prstena tokom metabolizma u jetri, a zatim hemijskom hidrolizom
S-nitrozotioili	$R_3C-S-NO$	S-nitrozocistein, S-nitrozo-N-acetilpenicilamin	+3	enzimski i hemijskom hidrolizom
Nukleofilni adukti	$R_2N-[N(O)NO]^-$	dietilamin-NO, spermin-NO	+3	hemijski

Natrijum nitroprusid

Vaskularna tkiva kao i redukujući agensi katalizuju produkciju NO iz natrijum nitroprusida (SNP) (273). Takođe, NO se spontano oslobađa iz SNP u mnogim biološkim uzorcima (274,275). Pored hemijske degradacije, membranski vezan enzim je verovatno uključen u stvaranje NO iz SNP u tkivima, a kao kofaktori mu služe NADH ili NADPH (276,277). Metabolizam SNP u ćelijama se značajno ubrzava prisustvom NADPH-regenerišućeg sistema. U eritrocitima, SNP reaguje sa hemoglobinom dajući cijanmethemoglobin i četiri molekula cijanidnog jona.

Osim u eksperimentalne, SNP se koristi i u terapijske svrhe, u tretmanu akutnog infarkta miokarda, kongestivne srčane insuficijencije i kontroli krvnog pritiska (275). Sprečava agregaciju trombocita i oštećenje krvnih sudova i produžava vreme krvarenja. Takođe, koristi se i u tretmanu moždanog udara i cerebralne ishemije (278).

2. Cilj

- U prvom delu eksperimenta cilj je bio da pomoću testa odbacivanja boje (DET), i dva kolorimetrijska testa (MTT i SRB) na obe ćelijske linije odredimo koncentraciju natrijum nitroprusida i optimalno vreme njegovog delovanja.
- Prethodno poznat podatak da oksidativni/nitrozativni stres može delovati stimulatивно na proliferaciju malignih ćelija, naveli su nas na ideju da na K562 ćelijskoj liniji izvedemo i test inkorporacije ^3H timidina sa ciljem da pratimo indeks proliferacije ćelija, odnosno posredno *de novo* sintezu DNK u K562 ćelijama.
- U našim eksperimentima, korišćenjem donora NO - natrijum nitroprusida (SNP) i dve vrste superoksid dismutaza, Cu,Zn-SOD i Mn-SOD, stvorili smo uslove generisanja više vrsta signalnih molekula. Praćen je broj, vijabilnost i procenat preživljavanja ćelija testom odbacivanja boje (DET), kao i aktivnost ukupnog SOD sa cijem da ispitamo odgovor transformisanih (L929) i malignih (K562) ćelija na njih.
- Praćenjem intracelularnih markera kao što su količina slobodnih tiolnih grupa i glutationa pretpostavljeno je da će se dobiti uvid i u molekulske mehanizme za objašnjenje efekata azot oksida i njegovih redoks potomaka i objašnjenje za eventualne razlike u odgovoru transformisanih i malignih ćelijskih linija.

3. Materijal i metode

3.1. Čelijske kulture i njihovo održavanje

Eksperiment je izveden sa dve kontinuirane čelijske linije:

Čelije humane eritroleukemije (K562) - CCL 243, poreklom iz pleuralne efuzije pacijentkinje sa hroničnom mijeloidnom leukemijom. K562 blasti su multipotencijalne, hematopoetske maligne čelije koje spontano diferenciraju u progenitore eritrocitne, granulocitne i monocitne serije (18).

Čelije mišijih fibroblasta (L929) - ETAC 85011425, poreklom iz normalnog subkutanog adipoznog i areolarnog tkiva miša (19).

3.1.1. Priprema čelija

K562 čelije rastu u suspenziji u RPMI 1640 medijumu sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FCS), 2mM glutamina, penicilina (100 IJ/ml) i streptomocina (100 µg/ml). L929 čelije rastu zalepljene za podlogu kao jedan sloj čelija ("monolayer"), u DMEM - u sa dodatkom 10% FCS, 2 mM glutamina, penicilina (100 IJ/ml) i streptomocina (100 µg/ml). Jednoćelijska suspenzija se dobija sa 0,25% tripsinom ili tripsinom u EDTA.

Čelijske linije se održavaju u sudovima za kulturu na 37°C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂. Presađuju se dva puta nedeljno u koncentraciji 50000-100000 čelija /ml.

3.1.2. Priprema SNP

Natrijum-nitroprusid dihidrat (Merck) je rastvoren u 0.9% NaCl za osnovni rasvor koncentracije 10mM. U toku eksperimenta osnovni rastvor je dodavan u eksperimentalne uzorke u odgovarajućim zapreminama da bi se postigla finalna koncentracija od 0.1, 1, 2, 3, 5 i 10mM.

3.1.3. Priprema SOD

Preparat Cu,Zn-SOD (Peroxinorm, CN 953745, Pliva) je rastvoren u destilovanoj vodi i dodavan u eksperimentalne uzorke u finalnoj koncentraciji od 10⁻⁷ M.

Mn-SOD (*E.coli*), izolovana po metodi Keele (1970) (279), dobijena ljubaznošću prof. dr Mihajla B. Spasića, rastvorena je u destilovanoj vodi i dodavana u eksperimentalne uzorke u finalnoj koncentraciji od 10⁻⁷ M.

3.2. Opis eksperimenta

Eksperiment je tematski podeljen u dve celine. U prvom delu oglada je pomoću tri metode (DET, MTT i SRB) na obe čelijske linije određivano optimalno vreme i koncentracija aplikovanog donora NO natrijum-nitroprusida (SNP) da bi se kao krajnji rezultat dobilo oko 60-70% preživelih čelija za dalje potrebe eksperimenta.

S obzirom da je iz literaturnih izvora (280), kao i iz ranijih eksperimenata (281) poznato da različite vrste oksidativnog stresa mogu stimulatивно delovati na proliferaciju malignih čelija, uzorci čelijske linije K562 ispitivani su i testom inkorporacije ³H timidina, čime smo hteli da utvrdimo da li u prisustvu SNP i egzogeno dodatog SOD dolazi do *de novo* sinteze DNK.

Za potrebe DET testa ćelije su sađene u ploče sa 6 otvora u koncentraciji od 300 000 /otvoru za K562 ćelije, odnosno 100 000 za L929 ćelije.

Uzorci obe ćelijske linije su posađene u mikrotitar ploče sa 96 otvora (1×10^5 ćelija /180 μ L medijuma sa 10 % FCS) za SRB, MTT i test inkorporacije timidina.

SNP je dodavan u uzorke ćelija u finalnoj koncentraciji od 0.1, 1, 2, 3 i 5 mM i praćeni su efekti koje on izaziva nakon 1, 3, 24, i 48 sati.

Kada je pomoću sve četiri metode određena optimalna koncentracija (2mM) i vreme (1h) inkubacije ćelija sa SNP-om, uzorci obe ćelijske linije posađeni su u flaskone za kulturu ćelija od 25 cm³ (Costar) u koncentraciji od 1×10^6 /mL i podeljeni su u četiri eksperimentalne grupe:

1. Kontrolna grupa (25,5h u termostatu);
2. Grupa sa dodatim SNP (vreme inkubacije 24,5h u termostatu + 1h sa 2mM SNP);
3. Grupa sa dodatim CuZn-SOD i SNP po šemi 24h + 0.5h 10^{-7} M Cu,Zn-SOD + 1h 2mM SNP;
4. Grupa sa dodatim Mn-SOD i SNP po šemi 24h + 0.5h 10^{-7} M MnSOD +1h 2mM SNP.

Nakon isteka inkubacije, ćelije su isprane u PBS-u, centrifugirane 10 min. na 10 000 rpm, prebrojane i određena im je vijabilnost. Citosolna frakcija dobijena je ultrasonifikacijom uzoraka (Soniprep 150 MSE), uzorci su adekvatno pripremljeni za naredne analize i zamrznuti na -80°C.

U toku drugog dela eksperimenta u svim uzorcima određena je koncentracija proteina, koncentracija ukupnog glutaciona, tiolnih grupa i aktivnost ukupnog SOD.

3.3. Metode korišćene u eksperimentu

3.3.1. DET test

U eksperimentima su korišćene samo vijabilne ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0,1% tripan plavim (282).

Tripan plavo je boja koja ulazi u ćeliju ukoliko je narušen integritet ćelijske membrane. Pri tome se mrtve ćelije boje u plavo, pa je na ovaj način moguće razlikovati žive od mrtvih ćelija.

Ćelijska suspenzija (50 μ l) je razblažena sa (200 μ l) 0,5 % rastvora tripan plavog u fiziološkom rastvoru i ćelije su odmah brojane u hemocitometru na invertnom mikroskopu.

Broj ćelija u 1 ml suspenzije izračunat je prema sledećoj formuli, uzimajući u obzir dimenzije komore i razblaženje:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 5$$

gde je N ukupan broj živih ćelija u 1 ml suspenzije, N_0 je broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra, 5 je faktor dilucije, 10^4 korekcionni faktor.

Vijabilnost ćelija je izračunata prema sledećoj formuli:

$$V(\%) = (N_0/N_0+M_0) \times 100$$

gde je M_0 broj mrtvih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra.

3.3.2. SRB test

Indukovana citotoksičnost je merena SRB – sulforodamin B testom (Sigma) prema metodi Shekan-a (283). U uslovima slabo kisele sredine, SRB boja se veže za proteinske aminokiselinske ostatke i obezbeđuje senzitivn indeks sadržaja ćelijskih proteina.

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem (10 min / 200xg) i izbrojane u 0, 1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u oktoplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora, tako da je u 180 µl medijuma bilo (1×10^5 ćelija /180 µL medijuma sa 10 % FCS) po otvoru ploče. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostat na 37°C, sa 5% CO₂ naredna 24 časa. Po isteku inkubacije, u sve otvore osim kontrolnih dodato je po 20 µl Na-nitroprusida odgovarajućih koncentracija i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u toku 1, 3, 24 i 48h. Nakon završene inkubacije ćelije su fiksirane dodatkom 50 µl 50% TCA (L929), odnosno 80% TCA (K562) po jednom otvoru. Ćelije su ostavljene 1h na +4°C i pet puta isprane vodom (da bi se uklonili proteini seruma, medijum i lakši metaboliti). Ćelije su bojene pomoću 0,4% rastvora SRB u 1% sirćetnoj kiselini. Nakon 30 minuta višak boje je ispran 1% sirćetnom kiselinom. Ploče su zatim osušene na vazduhu. Boja je neposredno pred merenje ekstrahovana TRIS-om (10 mmol/dm³, pH=10,5). Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm. Kao kontrola pri očitavanju rezultata korišćene su ćelije bez dodatka ispitivane supstance. Slepa proba bio je rastvor medijuma bez ćelija ("blank").

Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

$CI = (1 - A_s / A_k) \cdot 100$, pri čemu je A_k apsorbanca kontrolnih uzoraka, a A_s apsorbanca uzoraka sa ispitivanom supstancom.

3.3.3. MTT test

Ćelijska proliferacija je indirektno merena prema metodi Mosmann-a (284) putem određivanja sposobnosti ćelija da metabolički redukuju tetrazolijum boju (MTT) u plavo-crni produkt formazan. Tetrazolijum so se metaboliše jedino u aktivnim mitohondrijama živih ćelija pomoću enzima dehidrogenaze.

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem (10 min / 200xg) i izbrojane u 0, 1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u oktoplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora, tako da je u 180 µl medijuma bilo 1×10^5 ćelija. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostat na 37°C, sa 5% CO₂ naredna 24 časa. Po isteku inkubacije u sve otvore osim kontrolnih dodato je po 20 µl SNP odgovarajućih koncentracija i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u toku 1, 3, 24 i 48h. Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre dodavanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 20 µl /otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3h (u termostatu na 37°C, sa 5% CO₂). Po isteku inkubacionog vremena u svaki otvor je dodato po 200µl 0.04mol/l HCl u izopropanolu. Apsorbanca je očitavana odmah na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba ("blank").

Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

$CI = (1 - A_s / A_k) \cdot 100$, pri čemu je A_k apsorbanca kontrolnih uzoraka, a A_s apsorbanca uzoraka sa ispitivanom supstancom.

3.3.4. Test inkorporacije ^3H timidina

Test inkorporacije timidina rađen je prema metodi opisanoj u referenci (285). Uzorci K562 ćelija su posađeni u mikrotitar ploče po napred navedenoj šemi i dodat im je SNP i SOD u odgovarajućim koncentracijama. Rastvor ^3H timidina (^3H -Thy, specifične aktivnosti 185 GBq/mmol, Amersham) je rastvoren u medijumu RPMI 1640 u odnosu 1:20. Dva sata pre sakupljanja ćelija, 20 μL rastvorenog ^3H -Thy je dodato u svaki otvor ploče (1 μCi /otvoru). Nakon inkubacije (3, 24,48 i 72h), K562 ćelije su skupljene na diskove od filter-papira (Scatron, Titertek), uzorci su osušeni preko noći na 40°C, preneti u sudove sa po 5ml scintilacione tečnosti i analizirani na scintilacionom beta-brojaču (TM Analytic beta Trac 6895).

Radioaktivnost uzoraka je izražena kao DPM (Dezintegracija po minuti) koja je proporcionalna količini ^3H -Thy ugrađenog u DNK ćelija u kulturi. Rezultati su predstavljeni kao indeks proliferacije i.e. nivo DPM tretiranih i kontrolnih uzoraka.

3.3.5. Određivanje ukupnih proteina

Proteini su određivani Lowry-jevom metodom (286).

Princip metode

Metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza sa jonima bakra (Cu^{2+}) u alkalnoj sredini (biuretska reakcija) i redukciji fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline (Folin-Ciocalteau reagens) sa aromatičnim aminokiselinama proteina. Apsorbanca nastalog jedinjenja se meri na 750 nm za niske koncentracije, ili na 500 nm za visoke koncentracije proteina.

Reagensi

2% Na_2CO_3 u 0.1 M NaOH

0.5% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u 1% K,Na tartaratu

1mL rastvora B se pomeša sa 50 mL rastvora A. Pravi se svež svakog dana.

Komercijalni Folin-Ciocalteau reagens razblažen sa dH_2O u odnosu 1:1

Standardni rastvori proteina:

osnovni rastvor: 1mg BSA/mL

radni rastvori: 0.02, 0.04, 0.1, 0.14; 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL

Postupak

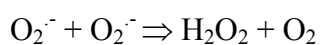
250 μL uzorka ili standarda + 1.25 mL rastvora C, promućka se i ostavi 10 minuta na ledu

125 μL rastvora D, promućka se i ostavi na ledu 30 minuta.

Apsorbanca se meri na 750 nm.

3.3.6. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaza katališe reakciju dismutacije superoksid radikala:



Superoksid dismutaza je određivana metodom MC Corda i Fridovich-a sistemom citohrom c/(Fe (III)/ksantin/ksantin- oksidaza (287).

Princip metode

Superoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$) koji se generišu u reakciji ksantina sa ksantin oksidazom redukuju oksidovani citohrom c (Fe(III)) do (Fe(II)), a brzina redukcije se prati spektrofotometrijski na 550 nm.

SOD, katališući reakciju dismutacije superoksid radikala i uklanjajući ih, smanjuje brzinu redukcije citohroma c. Ovo smanjenje je proporcionalno aktivnosti SOD.

Količina superoksid dismutaze potrebna za smanjenje brzine redukcije za 50% (pri promeni apsorbanace od 0.025/min) je definisana kao jedinica aktivnosti ovog enzima.

Reagensi

0.5 M KH_2PO_4

0.5 M Na_2HPO_4

100 mM EDTA

100 mM NaN_3

50 mM ksantin

0.2 U/mL ksantin oksidaze (XOD) iz kravljeg mleka u 0.1 mM EDTA

20 μ M citohrom C (Fe(III)), iz srca konja

Rastvor A:

0.57 mL KH_2PO_4 ; 3.14 mL NaH_2PO_4 ; 0.1 mL EDTA; 1.0 mL NaN_3 ; 1.0 mL ksantina; 0.4 mL citohroma c. Dopuni se do 100 mL destilovanom vodom pH7.8. Rastvor je stabilan tri dana na temperaturi od 4° C. U toku rada se drži na temperaturi od 25° C.

Rastvor B:

0.2 U XOD/mL 0.1 mM EDTA, rastvor se drži na ledu, pravi se svež svakog dana.

Reakciona smeša:

1.3 mL rastvora A; 25-100 μ L uzorka; 0.1 mL rastvora B; ako je potrebno dopuniti destilovanom vodom do 1.5 mL. Reakcija počinje dodatkom rastvora B. Promena apsorbanace na minut se prati na 550 nm u toku tri minute i izračuna prosečna vrednost. ΔA u kiveti sa slepom probom treba da iznosi 0.025/min.

Merenje se vrši na 25°C.

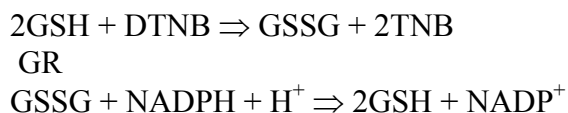
Izračunavanje

Aktivnost SOD se izražava u jedinicama aktivnosti na mg proteina.

3.3.7. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH + GSSG)

Princip metode

Ukupni glutation (GSH + GSSG) je odredjivan metodom Griffith-a (288). Metoda se zasniva na naizmeničnoj oksidaciji GSH sa 5,5-ditio-bis-nitrobenzoevom kiselinom (DTNB) i redukciji sa NADPH uz glutation reduktazu (GR). Veoma je osetljiva jer predstavlja kombinaciju kolorimetrijske reakcije formiranja TNB i specifične redukcije nastalog GSSG glutation reduktazom. Brzina formiranja 2-nitro-5-tiobenzoeve kiseline (TNB) je proporcionalna koncentraciji ukupnog glutationa i prati se merenjem apsorbanace na 412 nm.



Reagensi

fosfatni pufer (125 nM NaH₂PO₄, 6 mM EDTA pH7.5)
0.3 mM NADPH u puferu
6mM DTNB u puferu
standardni rastvori GSH (0.5,1,2,3,4 nmol po epruveti)
glutation reduktaza

Reakciona smeša:

0.7 mL NADPH
0.1 mL DTNB
0.2 mL dH₂O - umanjena za zapreminu uzorka ili standarda
U kontrolnoj kivetu su sve komponente osim uzorka.

Reakcija započinje dodatkom 5μL glutacione reduktaze. Promena apsorbanca se prati prva četiri minuta i izražava na minut.

Izračunavanje

Koncentracija ukupnog glutaciona se dobija iz standardne krive. Uz svaki eksperiment se radi kontrolni standard. Količina glutaciona se izražava u nmol/mL plazme, odnosno, nmol/g tkiva.

3.3.8. Određivanje slobodnih tiolnih grupa

Slobodne -SH grupe su određivane Ellmanovom metodom (289).

Rastvori

3mM DTNB (5,5-ditiobisnitrobenzojeva kiselina) se dobija rastvaranjem 12mg DTNB-a u 1ml 0.1 M KF pufera pH 7.3.
0.1 M kalijum fosfatni pufer (KF) pH 7.3 se dobija rastvaranjem 6.1 g KH₂PO₄ i 9.6 K₂HPO₄ u 1000 mL destilovane vode.

Eksperimentalni postupak

U 0.5 mL uzorka se doda 0.5 mL KF pufera i 200 μL DTNB reagensa. Dobro promešati rastvor na Vortex mešalici i meri apsorbanca na 412 nm nakon 10 minuta.
Koncentracija -SH grupa se određuje na osnovu $\epsilon = 14150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

3.4. Statistička obrada podataka

Dobijeni eksperimentalni rezultati statistički su obrađeni dvovarijantnim ANOVA testom.

4. Rezultati

4.1. Eksperiment sa ćelijama mišijih fibroblasta (L929)

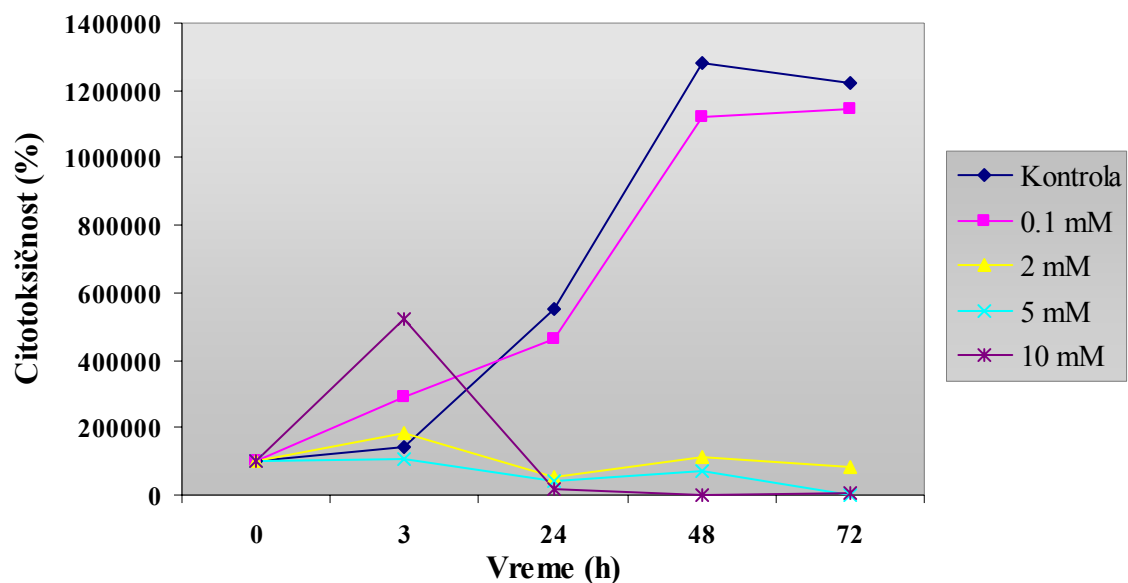
Kao što je napred već spomenuto, eksperimentalni deo ove doktorske teze tematski je podeljen u dve celine. U prvom delu eksperimenta je pomoću tri testa praćen citotoksični efekat SNP različitih koncentracija tokom 48, odnosno 72 h inkubacije uzoraka ćelijskih linija sa ovim preparatom. Pritom su tražene odgovarajuća koncentracija i vreme inkubacije uzoraka sa SNP koje dovode do rezultata da je u datoj tački eksperimenta procenat preživelih ćelija oko 70%. Naime, ovakvi efekti bili su nam potrebni kao preduslov za dalje eksperimente, gde smo SNP već odeđene koncentracije inkubirali zajedno sa CuZn - SOD, odnosno Mn - SOD, prateći redoks promene u ćelijama preko nekoliko parametara. Pritom nam je bilo važno da polazni efekat SNP na ćelije bude takav da se ispolji evidentna citotoksičnost, a u isto vreme, da preostane dovoljno preživelih ćelija za uspešno izvođenje eksperimenta.

4.1.1. Efekti natrijum-nitroprusida na broj ćelija praćeni testom odbacivanja boje (DET) na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)

Kao što se može videti iz Tabele 3 i Grafikona 1, tokom 72 sata trajanja eksperimenta, DET testom smo pokazali da je najniža koncentracija SNP (0.1 mM) imala čak stimulatívni efekat na deobu L929 ćelija. U daljem toku eksperimenta, ćelije tretirane SNP-om ove koncentracije ponašale su se poput kontrolnih, odnosno nastavile su da se udvajaju u proseku na svaka 24h sve do zasićenja medijuma na samom kraju vremena inkubacije. Za koncentracije od 5 i 10 mM uočava se da su veoma toksične za L929 ćelije tokom čitavog trajanja eksperimenta. Prema ovom testu, koncentracija SNP od 2mM primenjena u prva 3 sata inkubacije predstavlja optimalne uslove koje smo primenili u daljim eksperimentima.

Tabela 3. Efekti natrijum-nitroprusida na broj L929 ćelija/mL praćeni DET testom.

Vreme (h)	Kontrola	SNP (mM)			
		0.1	2	5	10
0	100000	100000	100000	100000	100000
3	140000	290000	83333	18333	15000
24	551666	461666	59333	31666	15600
48	1283333	1120000	115000	70000	0
72	1221667	1145000	83333	0	5000



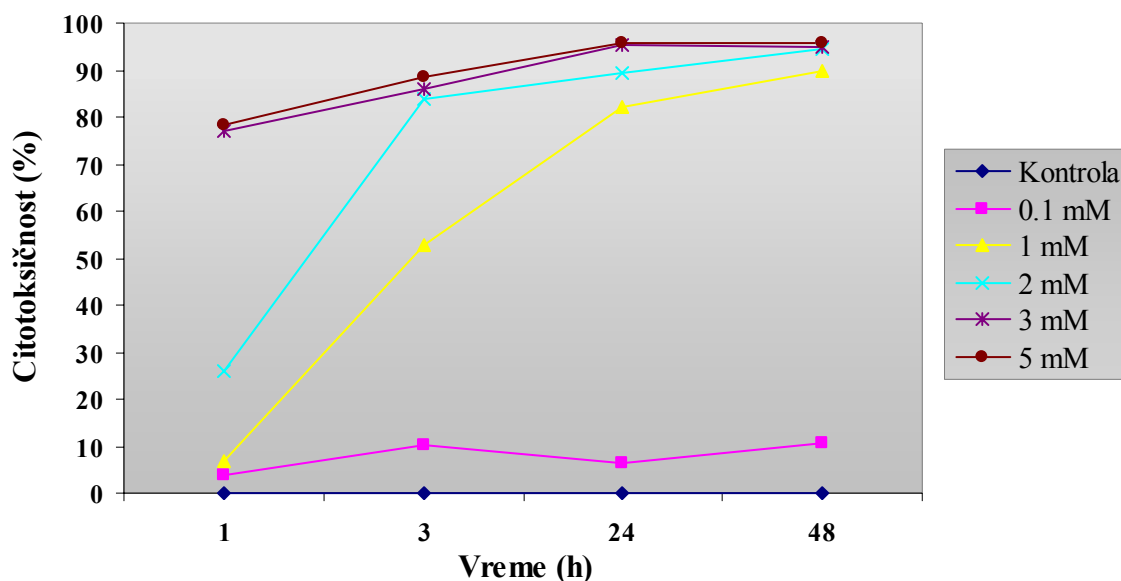
Grafikon 1: Efekti natrijum-nitroprusida na broj L929 ćelija/mL praćeni DET testom.

4.1.2. Citotoksićnost natrijum-nitroprusida praćena SRB testom na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)

S obzirom da je DET testom pretpostavljeno da se efekti na broj ćelija posle 48. sata eksperimenta mogu pripisati zasićenju medijuma produktima ćelijskog metabolizma, kao i da se traćeno dejstvo SNP na ćelije ispoljava mnogo ranije, eksperiment je skraćen na trajanje od 48 sati. Najviša koncentracija SNP odbaćena je zbog visoke citotoksićnosti, a dodate su tzv. "mećukoncentracije" od 1 i 3 mM. Prikazani rezultati (Tabela 4, Grafikon 2) pokazuju da SNP kao brzi, linearni donor NO, svoje efekte iskazuje već u prvom satu inkubacije sa L929 ćelijama. Pritom, koncentracija od 2mM u toj vremenskoj taćci eksperimenta daje traćeni efekat od oko 60-70% prećivelih ćelija, odnosno citotoksićnost od oko 35%.

Tabela 4. Citotoksićnost natrijum-nitroprusida (%) praćena SRB testom na ćelijskoj liniji L929.

	Kontrola	0.1mM	1mM	2 mM	3 mM	5 mM
1	0.00	4.02	7.02	31.37	77.14	78.13
3	0.00	10.03	52.82	83.65	85.79	88.58
24	0.00	6.41	82.05	89.49	95.43	95.87
48	0.000	10.681	89.818	94.433	95.081	95.570



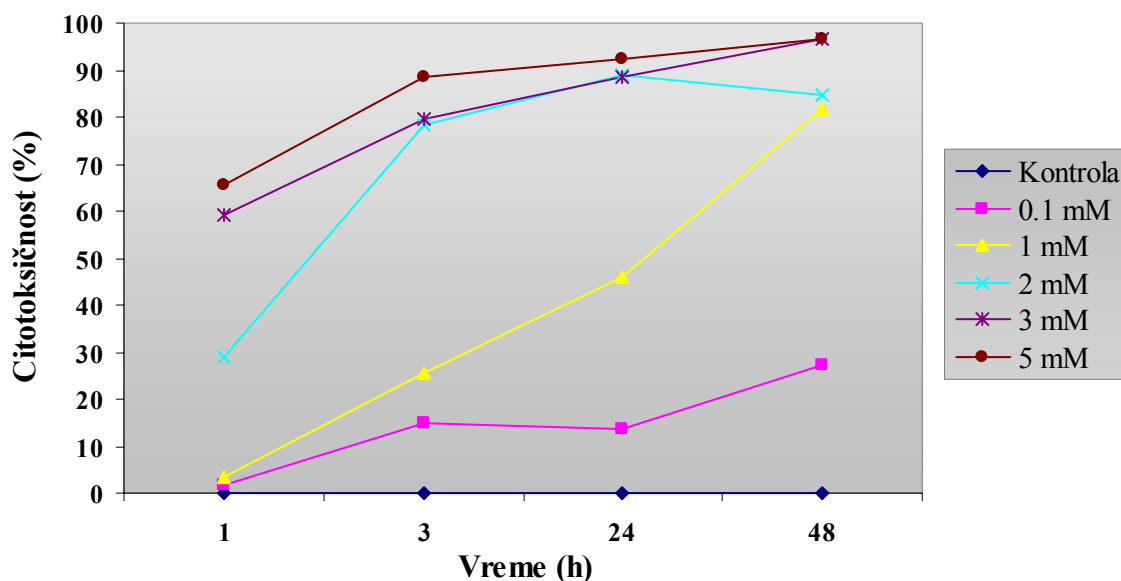
Grafikon 2: Citotoksičnost natrijum-nitroprusida (%) praćena SRB testom na ćelijskoj liniji L929.

4.1.3. Citotoksičnost natrijum-nitroprusida praćena MTT testom na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)

Mada u osnovi razlićit od SRB testa, i MTT test je dao vrlo slične rezultate u praćenju citotoksičnosti SNP razlićitih koncentracija na uzorcima ćelijske linije L929. I u ovom eksperimentu prikazani rezultati (Tabela 5, Grafikon 3) pokazuju da je za traćeni efekat potrebna koncentracija od 2mM SNP inkubiranog sa uzorcima ćelija 1h. Odrećeno neslaganje u rezultatima između DET testa sa jedne, i SRB i MTT testova sa druge strane, potiće od veće osetljivosti testova citotoksičnosti u odnosu na test odbacivanja boje. Naime, DET test se obiće koristi u poćetnom praćenju efekata neke supstance na prećivljavanje ćelija i kao takav je i u ovoj tezi naćao svoje mesto.

Tabela 5. Citotoksičnost (%) praćena MTT testom na ćelijskoj liniji L929.

	Kontrola	0.1mM	1mM	2 mM	3 mM	5 mM
1	0.00	1.62	3.49	28.93	58.98	65.33
3	0.00	14.75	25.61	78.33	79.61	88.54
24	0.00	13.55	45.83	88.77	88.53	92.47
48	0.00	27.25	81.51	84.57	96.46	96.76



Grafikon 3: Citotoksičnost natrijum-nitroprusida (%) praćena MTT testom na ćelijskoj liniji L929.

4.1.4. Efekti natrijum-nitroprusida na broj ćelija, vijabilnost i preživljavanje na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)

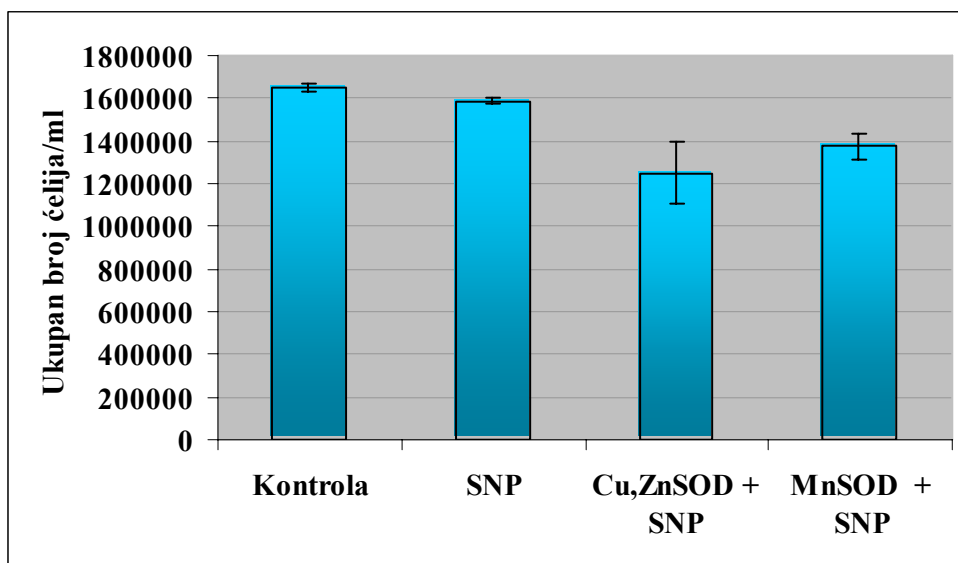
U drugom delu eksperimenta eksperimentalni uzorci su podeljeni u četiri grupe:

1. Kontrolna grupa
2. Grupa sa dodatim 2mM SNP (vreme inkubacije 1h)
3. Grupa sa dodatim Cu,ZnSOD i SNP (0.5 +1h)
4. Grupa sa dodatim MnSOD i SNP (0.5 +1h).

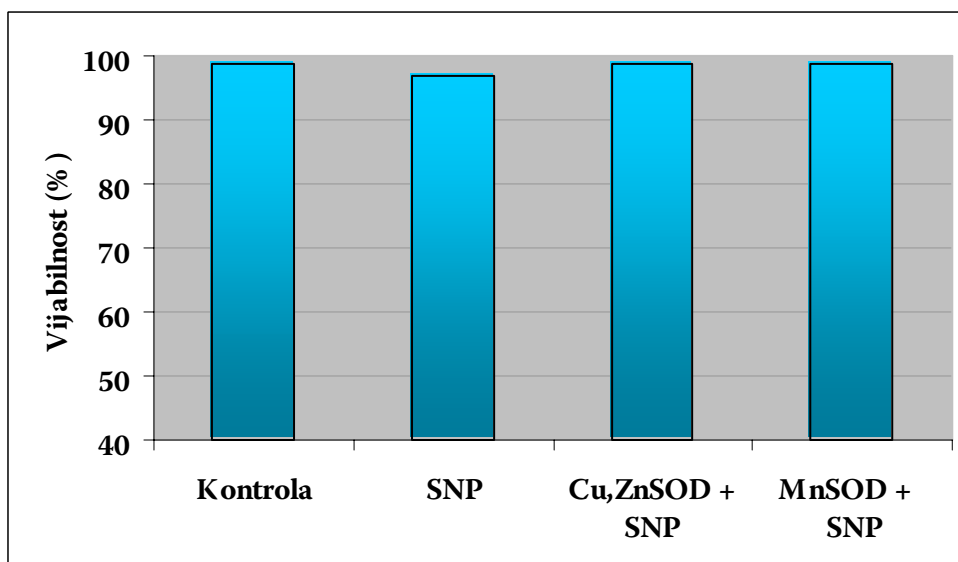
Pritom, preživljavanje je izraženo kao ukupan broj u odnosu na broj ćelija u kontroli, a vijabilnost kao broj živih ćelija u odnosu na ukupan broj u vidnom polju hemocitometra. Iz prikazanih rezultata (Tabela 5 i Grafikoni 3,4 i 5), uočava se vrlo visoka vijabilnost u svim eksperimentalnim grupama, s tim što je ona nešto niža u grupi uzoraka tretiranih sa SNP. Preživljavanje je najniže u grupi uzoraka tretiranih sa Cu,Zn-SOD.

Tabela 6. Efekti natrijum-nitroprusida na ukupan broj ćelija/mL, vijabilnost (%) i preživljavanje (%) u ćelijskoj liniji L929.

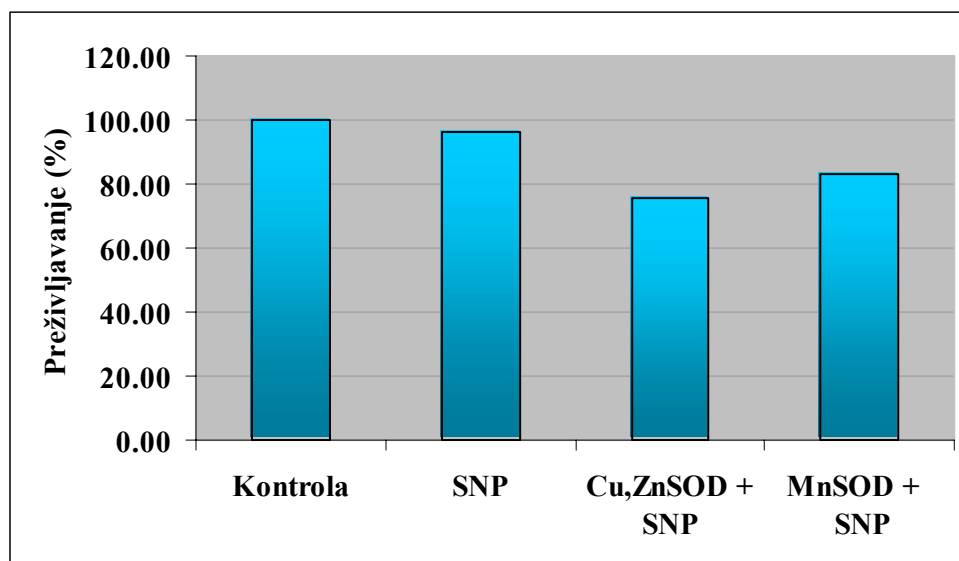
Grupa	Ukupan broj ćelija/ml	Vijabilnost (%)	Preživljavanje (%)
Kontrola	1650000	98.90	100.00
SNP	1587000	96.93	95.18
Cu,ZnSOD+SNP	1250000	98.80	75.76
MnSOD+SNP	1375000	98.70	83.33



Grafikon 4: Efekti natrijum-nitroprusida na ukupan broj ćelija/mL u ćelijskoj liniji L929.



Grafikon 5: Efekti natrijum-nitroprusida na vijabilnost (%) u ćelijskoj liniji L929.



Grafikon 6: Efekti natrijum-nitroprusida na preživljavanje (%) ćelijskoj liniji L929.

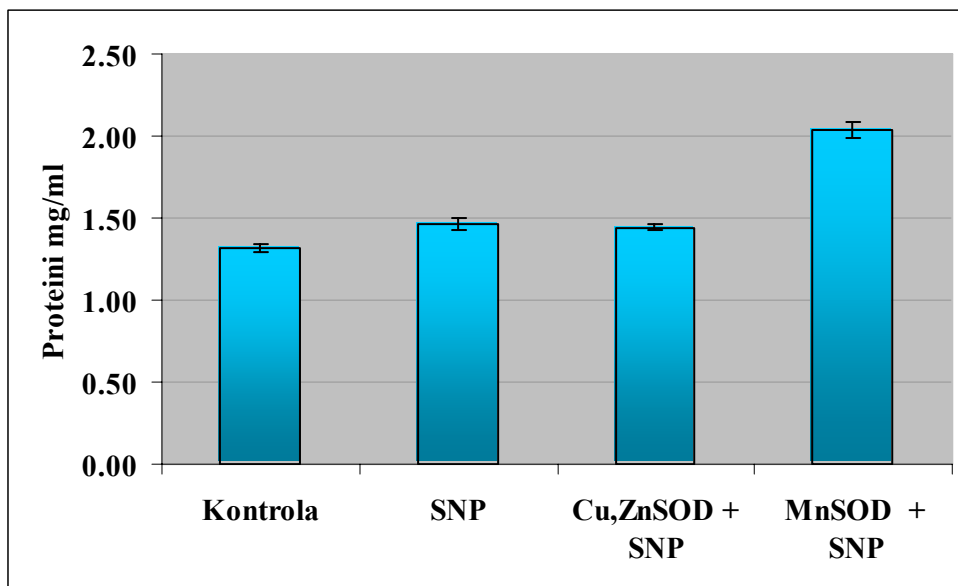
Kao što se može uočiti iz Tabele 6 i Grafikona 4 i 6, citotoksični efekat 2mM SNP na broj i preživljavanje L929 ćelija je niži u drugom nego u prvom delu eksperimenta. Ovu razliku pripisali smo različitim uslovima gajenja ćelija u različitim segmentima eksperimenta. Naime, za potrebe DET, a naročito SRB i MTT testa, ćelije se gaje u malim zapreminama medijuma. Nasuprot tome, naš centralni eksperiment zahtevao je kultivisanje L929 ćelija u velikim sudovima za kulturu sa velikom zapreminom medijuma (25 cm³). Poznato je da se ćelije gajene *in vitro* brže dele u prisustvu faktora rasta koje same otpuštaju. Ako je broj ćelija veći, i one pre dostižu plato u logaritamskom rastu. Smatramo da je u našem eksperimentu došlo do ove pojave.

4.1.5. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina u ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929)

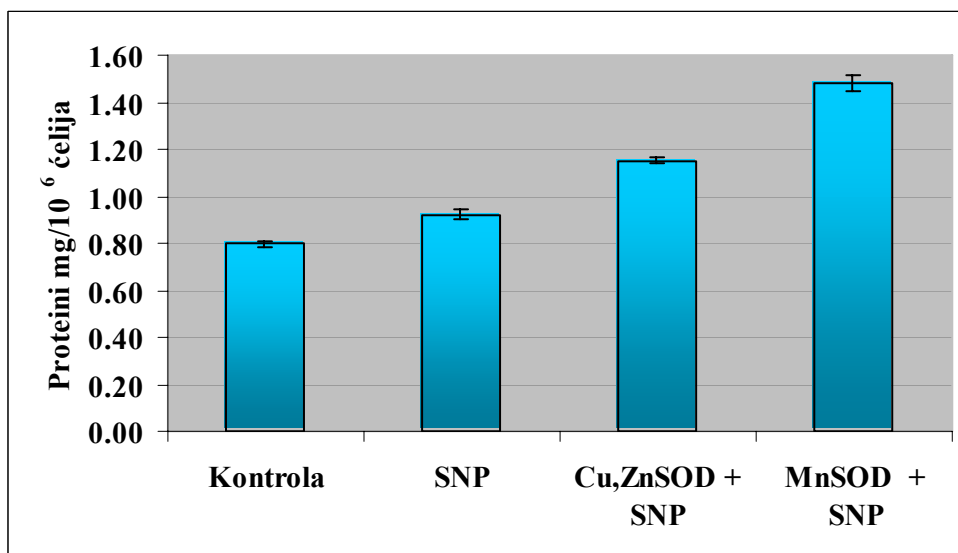
Inkubacija L929 ćelija kako sa SNP-om, tako i sa CuZnSOD i MnSOD inicirala je sintezu proteina u sve tri eksperimentalne grupe. Isti trend uočava se i pri specifičnoj (mg/mL) i ukupnoj aktivnosti (mg/10⁶ ćelija) (Tabela 7, Grafikon 7). Bez obzira na snižen broj ćelija u grupi uzoraka inkubiranih sa SNP i CuZnSOD, kao i nešto sniženu vijabilnost u uzorcima tretiranim SNP-om, očigledno je da su ćelije bile vrlo metabolički aktivne i da je u našem eksperimentu došlo do *de novo* sinteze proteina.

Tabela 7. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina u ćelijskoj liniji L929.

Grupa	Proteini mg/ml	Proteini mg/10 ⁶ ćelija
Kontrola	1.3151	0.7970
SNP	1.4645	0.9228
Cu,ZnSOD+SNP	1.4408	1.1526
MnSOD+SNP	2.0397	1.4834



Grafikon 7: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina (mg /mL) u ćelijskoj liniji L929.



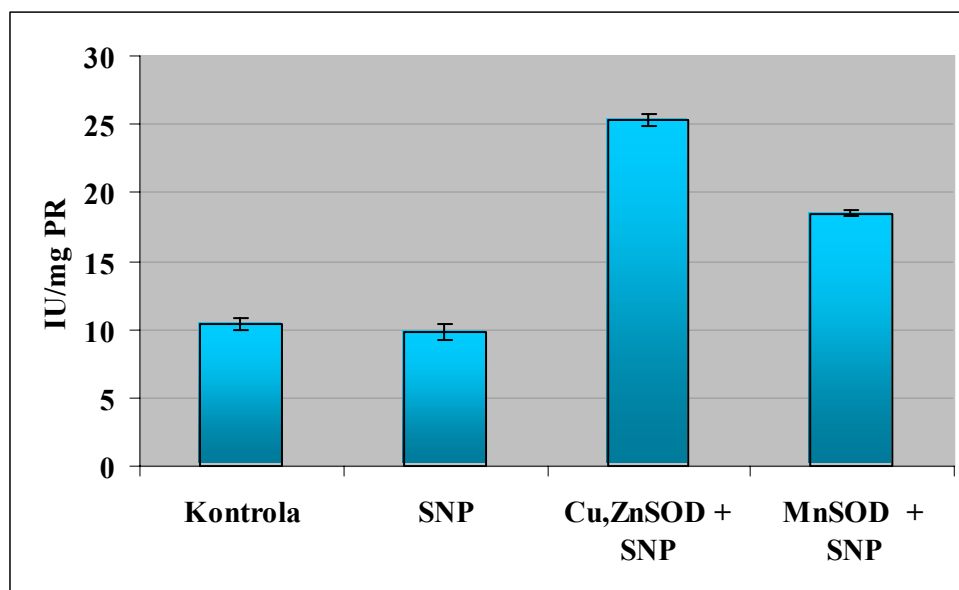
Grafikon 8: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina (mg /10⁶ ćelija) u ćelijskoj liniji L929.

4.1.6. Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD u uzorcima ćelijske linije mišijih fibroblasta (L929)

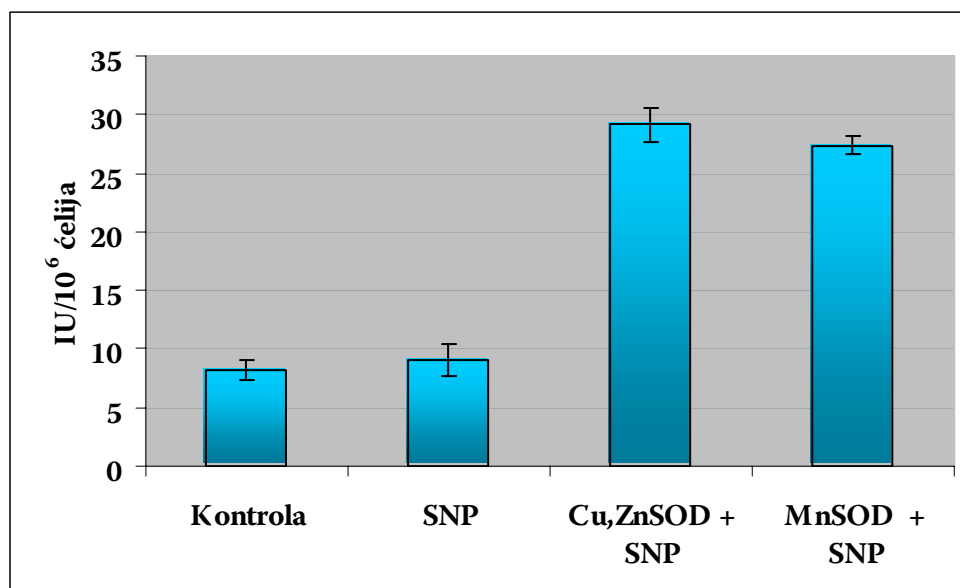
Inkubacija L929 ćelija sa 2mM Natrijum-nitroprusidom (Tabela 8, Grafikoni 9 i 10) nije dovela do statistički značajne promene u vrednostima ukupne SOD, kako pri aktivnosti izraženoj po mg proteina, tako i po 10^6 ćelija. Značajno povišenje aktivnosti pojavljuje se u obe grupe uzoraka inkubiranih sa CuZn i MnSOD u kombinaciji sa SNP.

Tabela 8. Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD u ćelijskoj liniji L929.

Grupa	IU/mg PR	IU/ 10^6 ćelija
Kontrola	10.3457	8.2458
SNP	9.8098	9.0526
Cu,ZnSOD+SNP	25.2940	29.1549
MnSOD+SNP	18.4608	27.3851



Grafikon 9: Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD (IU/mg proteina) u ćelijskoj liniji L929.



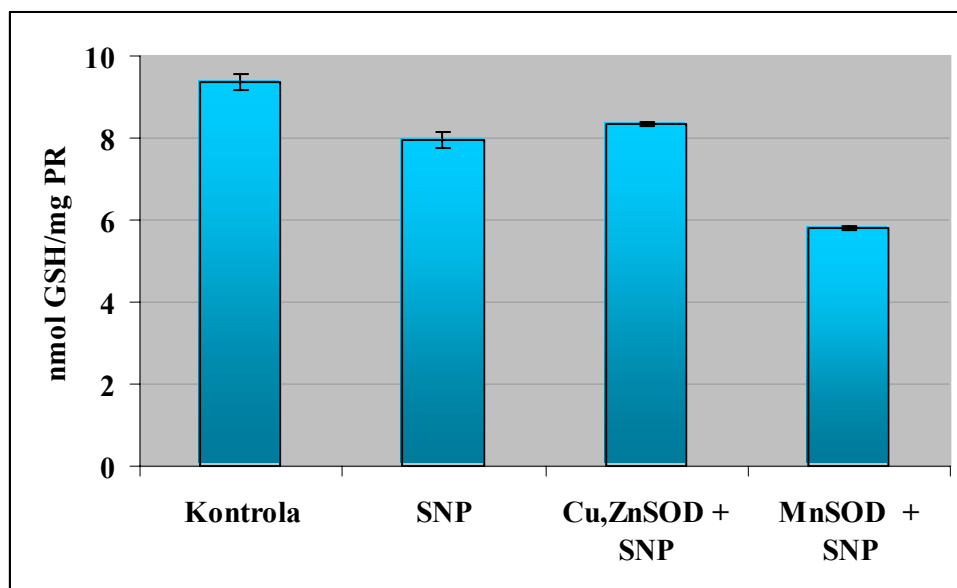
Grafikon 10: Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD (IU/10⁶ ćelija) u ćelijskoj liniji L929.

4.1.7. Efekti SNP na koncentraciju ukupnog glutationa (GSH +GSSG) u uzorcima ćelijske linije mišijih fibroblasta (L929)

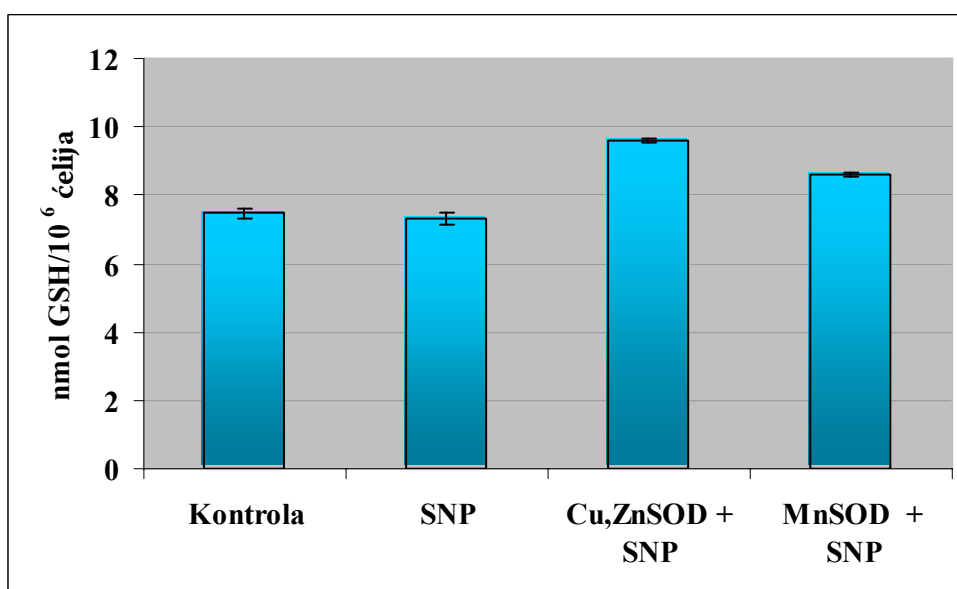
U uzorcima linije L929 trendovi vrednosti spečifične i ukupne aktivnosti glutationa unekoliko se razlikuju. Naime, ako posmatramo spečifičnu aktivnost (Tabela 9 i Grafikon 11), zapaža se pad vrednosti /mg proteina u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu. Taj pad je najznačajniji u grupi uzoraka tretiranih sa MnSOD + SNP. Nasuprot tome, ukupna aktivnost GSH + GSSG raste u sve tri grupe tretiranih uzoraka. Porast aktivnosti je najznačajniji u grupi uzoraka tretiranih sa Cu,ZnSOD +SNP.

Tabela 9. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnog glutationa (GSH +GSSG) u uzorcima ćelijske linije L929.

Grupa	nmol/mg PR	nmol/10 ⁶ ćelija
Kontrola	9.3779	7.4745
SNP	7.9517	7.3380
Cu,ZnSOD+SNP	8.3249	9.5957
MnSOD+SNP	5.8163	8.6281



Grafikon 11: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnog glutationa (nmol/mg proteina) u uzorcima ćelijske linije L929.



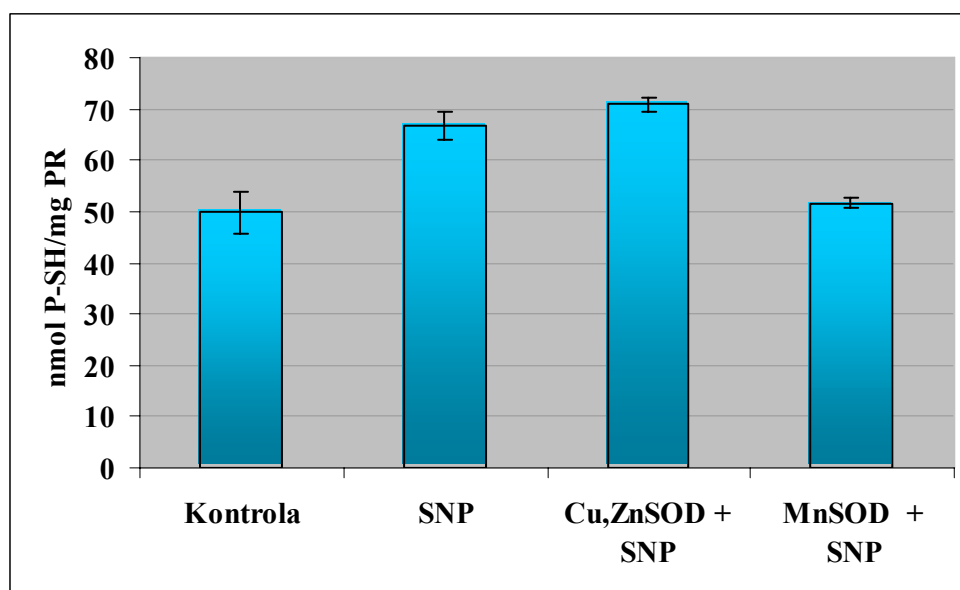
Grafikon 12: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnog glutationa (nmol/10⁶ ćelija) u uzorcima ćelijske linije L929.

4.1.8. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa u uzorcima ćelijske linije mišijih fibroblasta (L929)

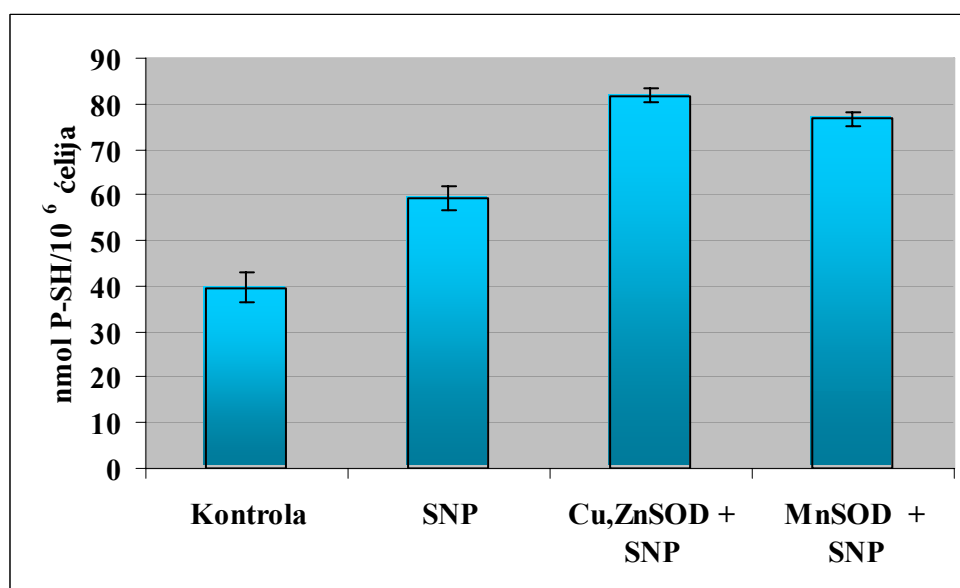
Koncentracija slobodnih tiolnih grupa je povišena u odnosu na kontrolnu grupu uzoraka u svim tretiranim grupama, kako pri rezultatima izraženim u specifičnoj, tako i u ukupnoj koncentraciji (Tabela 10, Grafikoni 13 i 14). Statistički najviša vrednost povećanja koncentracije uočava se u grupi uzoraka tretiranih sa Cu,ZnSOD + SNP.

Tabela 10. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa u uzorcima ćelijske linije L929

Grupa	nmol/mg PR	nmol/10 ⁶ ćelija
Kontrola	49.8266	39.7133
SNP	66.6815	59.1849
Cu,ZnSOD+SNP	70.9668	81.7992
MnSOD+SNP	51.6551	76.6262



Grafikon 13: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa (nmol/mg proteina) u uzorcima ćelijske linije L929.



Grafikon 14: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa (nmol/10⁶ ćelija) u uzorcima ćelijske linije L929.

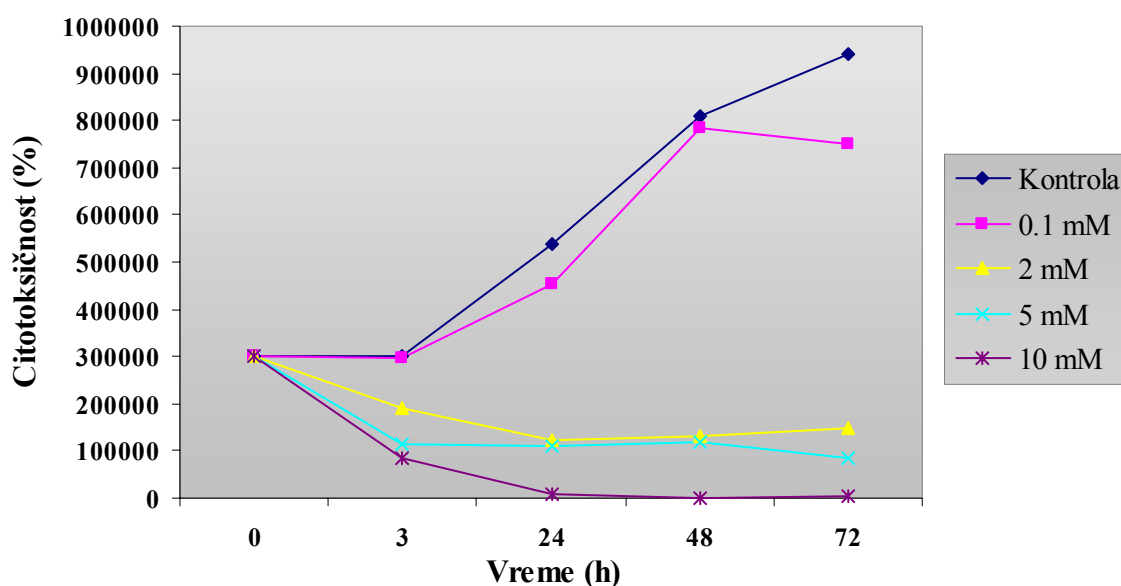
4.2. Eksperiment sa ćelijama humane eritroleukemije (K562)

4.2.1. Efekti natrijum-nitroprusida na broj ćelija praćeni testom odbacivanja boje (DET) na ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)

Praćenje broja K562 ćelija DET testom (Tabela 11 i Grafikon 15) pokazalo je kontinuiran rast u kontrolnoj grupi i u grupi sa najmanjom koncentracijom dodatog SNP. Kao i kod L929 ćelija, SNP koncentracije 2mM doveo je do sniženja broja ćelija za oko 36%, odnosno procenat preživelih ćelija bio je 64 nakon isteka prva tri časa inkubacije. Pri primeni iste koncentracije u daljoj inkubaciji uočava se pad, a potom oporavak u broju ćelija. Takođe, koncentracije nitroprusida od 5 i 10mM bile su veoma toksične za K562 ćelije već u prvoj vremenskoj tački eksperimenta.

Tabela 11. Efekti natrijum-nitroprusida na broj K562 ćelija/mL praćeni DET testom.

Vreme (h)	K	0.1	2	5	10
0	300000	300000	300000	300000	300000
3	300000	298333	191667	112500	85000
24	537500	455000	125000	110000	10000
48	810000	782500	130000	120000	1667
72	940000	750000	148333	86667	3333



Grafikon 15: Efekti natrijum-nitroprusida na preživljavanje K562 ćelija/mL praćeni DET testom.

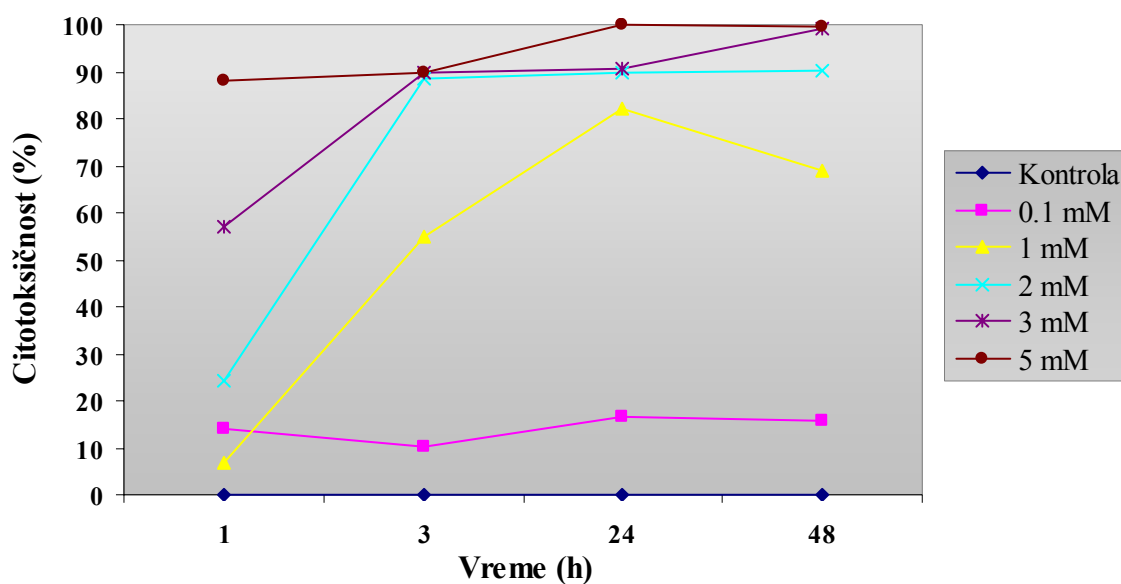
4.2.2. Citotoksičnost natrijum-nitroprusida praćena SRB testom na ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)

Tokom SRB testa odbaćen je 72. sat eksperimenta kao vremenska taćka u kojoj dolazi do zasićenja medijuma produktima ćelijskog metabolizma, a ubaćene su koncentracije od 1 i 3 mM radi boljeg praćenja dozno-zavisnih promena koje SNP izaziva tokom inkubacije u ćelijskoj kulturi K562.

Linearne dozno – zavisne promene poreklom od citotoksičnosti SNP mogu se pratiti posebno za svaku vremensku taćku eksperimenta (Tabela 12, Grafikon 16). Osim toga, linearnost u porastu procenta citotoksičnosti zapaća se i sa trajanjem inkubacije, što ukazuje na pojavu da SNP, osim što je brzi donor NO, dovodi do takvih promena koje imaju dalekosećnije posledice na ćeliju. Pritom, koncentracija od 2mM u prvom satu inkubacije sa SNP ostavlja oko 60% preživelih ćelija, što odgovara uslovima kakve smo zahtevali u eksperimentu.

Tabela 12. Citotoksičnost natrijum-nitroprusida (%) praćena SRB testom na ćelijskoj liniji K562.

Vreme (h)	Kontrola	0.1mM	1mM	2 mM	3 mM	5 mM
1	0.00	14.02	7.02	38.37	57.14	88.23
3	0.00	10.13	54.87	88.69	89.89	89.96
24	0.00	16.56	82.05	89.93	90.48	99.97
48	0.000	15.881	69.118	90.233	99.000	99.650



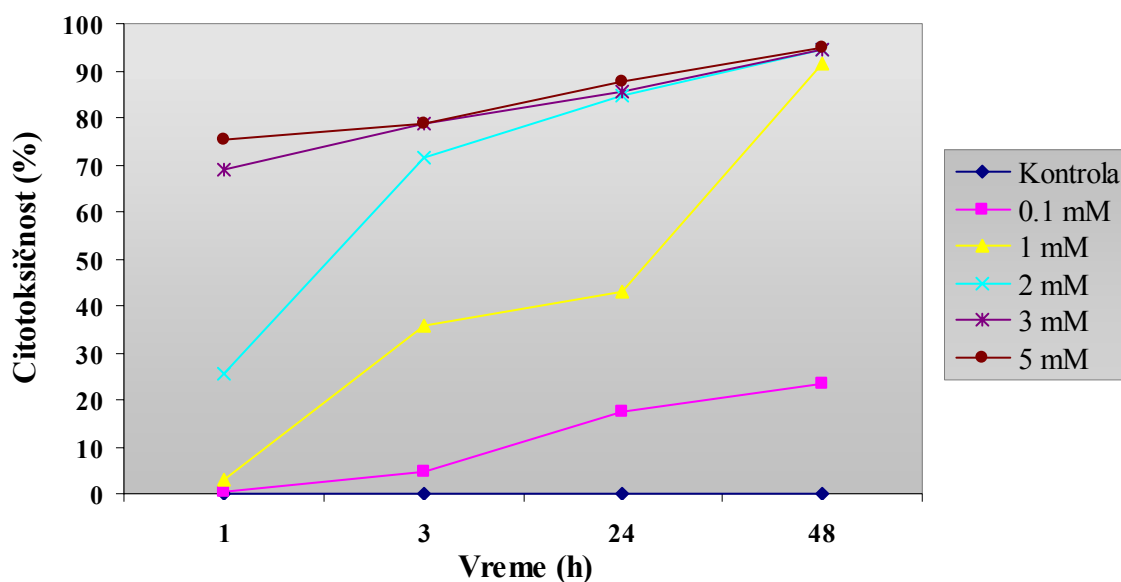
Grafikon 16: Citotoksičnost natrijum-nitroprusida (%) praćena SRB testom na ćelijskoj liniji K562.

4.2.3. Citotoksičnost natrijum-nitroprusida praćena MTT testom na ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)

Citotoksičnost SNP praćena MTT testom iskazuje se po istom modelu kao i kod SRB testa. Pri nižim koncentracijama (0.1 i 1mM), citotoksičnost je viša tek pri kraju eksperimenta, dok je pri višim koncentracijama (3 i 5mM) ona visoka već u prvom satu eksperimenta. Koncentracija od 2mM nakon jednog sata inkubacije sa SNP daje očekivani broj od oko 65% preživelih ćelija (Tabela 13, Grafikon 17).

Tabela 13. Citotoksičnost natrijum-nitroprusida (%) praćena MTT testom na ćelijskoj liniji K562.

Vreme (h)	Kontrola	0.1mM	1mM	2 mM	3 mM	5 mM
1	0.00	0.63	3.13	34.32	68.98	75.33
3	0.00	4.75	35.61	71.33	78.61	78.54
24	0.00	17.55	42.83	84.77	85.53	87.47
48	0.00	23.25	91.51	94.57	94.46	94.76



Grafikon 17: Citotoksičnost natrijum-nitroprusida (%) praćena MTT testom na ćelijskoj liniji K562.

4.2.4. Indeks proliferacije ćelija humane eritroleukemije (K562) praćen inkorporacijom ^3H timidina

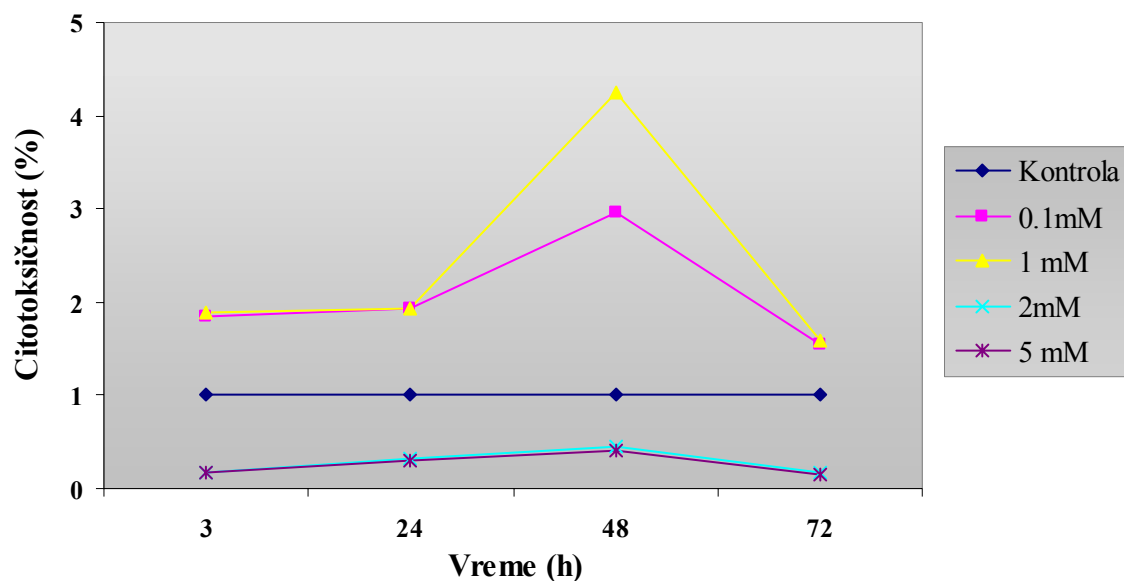
Niske vrednosti procenta citotoksičnosti pri nižim koncentracijama SNP u SRB i MTT testu, kao i prethodno poznat podatak da oksidativni/nitrozativni stres može delovati stimulatивно na proliferaciju malignih ćelija, naveli su nas na ideju da na K562 ćelijskoj liniji izvedemo i test inkorporacije ^3H timidina kojim se prati indeks proliferacije ćelija. Test je pogodan za izvođenje na flotirajućim ćelijama (kakve su i K562), jer se tokom eksperimenta tzv. “harvesterom” ćelije usisavaju i prebacuju na posebne filtere.

Kao što je prikazano u Tabeli 14 i Grafikonu 18, indeks poliferacije, odnosno posredno praćena *de novo* sinteza DNK u K562 ćelijama je posmatrana u četiri vremenske tačke eksperimenta pri koncentracijama od 0.1, 1, 2 i 5mM SNP.

Niske koncentracije deluju stimulatивно na proliferaciju K562 ćelija u kulturi, dok je kod viših koncentracija situacija suprotna, dakle, uočava se dozno-zavisani uticaj SNP na proliferaciju K562 ćelija.

Tabela 14. Efekti natrijum-nitroprusida na proliferaciju K562 ćelija praćeni inkorporacijom ^3H timidina.

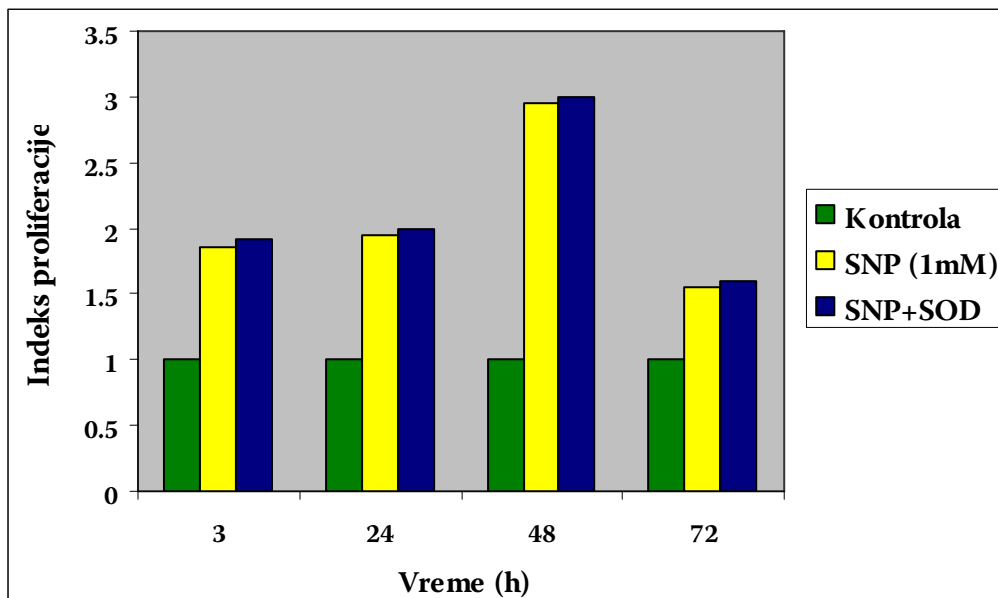
	K	c1	c2	c3	c4
3	1	1.850907	1.883233	0.176656	0.162427
24	1	1.940487	1.932809	0.312603	0.305469
48	1	2.954953	4.256629	0.460382	0.40999
72	1	1.553482	1.589387	0.175524	0.14794



Grafikon 18: Efekti natrijum-nitroprusida na proliferaciju K562 ćelija praćeni inkorporacijom ^3H timidina.

Takođe, pošto se koncentracija od 2mM SNP pokazala kao granična između stimulacije i inhibicije proliferacije za ispitivanu ćelijsku liniju, u daljem toku eksperimenta uzorci su inkubirani samo sa 1mM Na-nitroprusidom, kao i sa kombinacijom 1mM SNP i 0.1 μ M Cu,ZnSOD (Grafikon 19). Pritom smo želeli da vidimo da li inkubacija sa Cu,ZnSOD doprinosi proliferativnom efektu SNP.

SNP koncentracije 1mM dovodi do proifercije K562 ćelija u svim vremenskim tačkama eksperimenta, a posebno u 48. satu. Predtretman sa Cu,ZnSOD u kombinaciji sa SNP pokazuje evidentnu, ali ne i statistički značajnu stimulaciju ćelijske proliferacije u poređenju sa SNP-tretiranom grupom.



Grafikon 19: Indeks proliferacije K562 ćelija praćen inkorporacijom ^3H timidina u prisustvu SNP i Cu,ZnSOD.

4.2.5. Efekti natrijum-nitroprusida na broj ćelija, vijabilnost i preživljavanje na ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)

U drugom, centralnom delu eksperimenta odabrana je koncentracija Na-nitroprusida od 2mM kao odgovarajuća za tražene uslove eksperimenta.

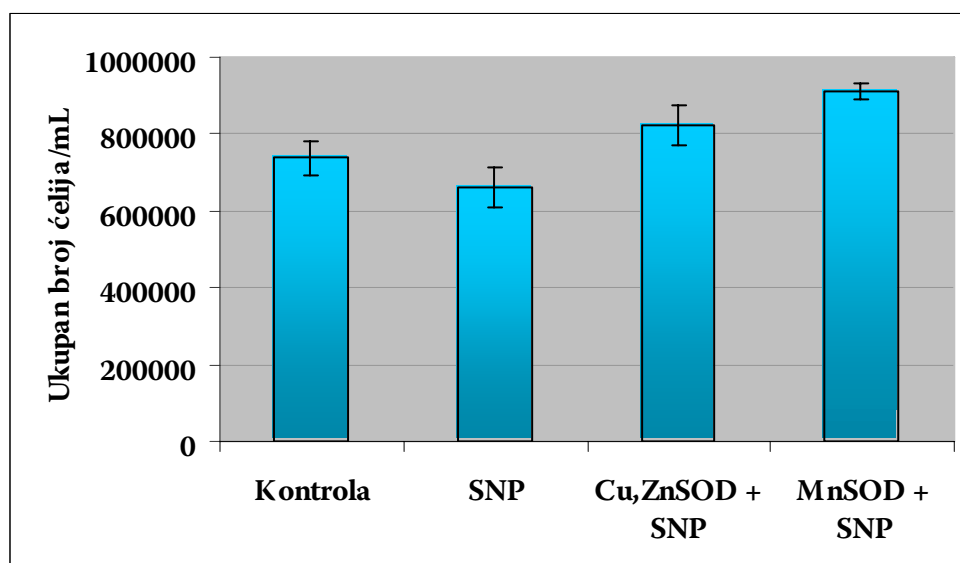
Uzorci ćelijske linije K562 podeljeni su u četiri eksperimentalne grupe:

1. Kontrolna grupa
2. Grupa sa dodatim 2mM SNP (vreme inkubacije 1h)
3. Grupa sa dodatim Cu,ZnSOD i SNP (0.5 +1h)
4. Grupa sa dodatim MnSOD i SNP (0.5 +1h).

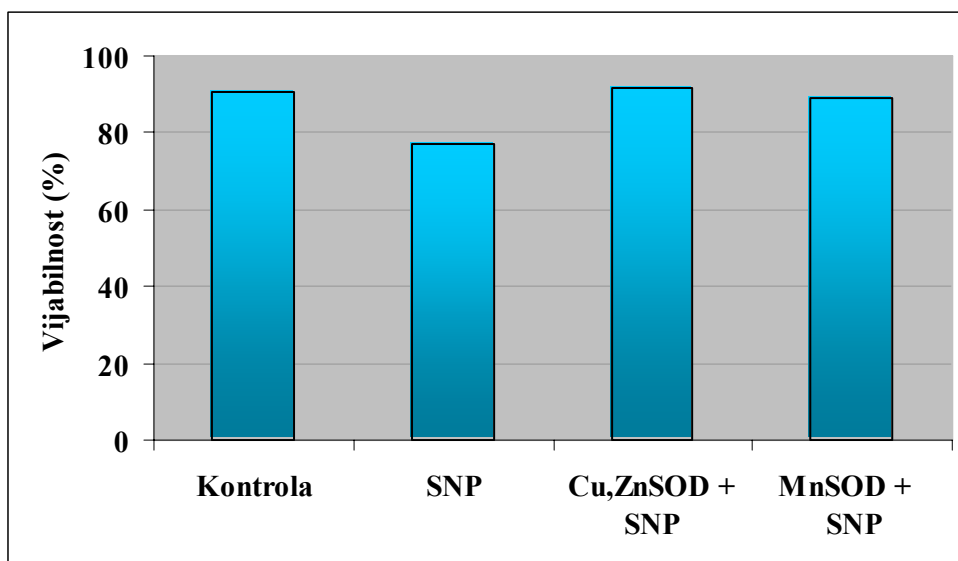
Praćenjem broja ćelija, njihove vijabilnosti i preživljavanja u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 15, Grafikoni 20-22), uočava se sniženje vrednosti sva tri parametra u grupi uzoraka inkubiranih sa 2mM SNP. Nasuprot tome, u uzorcima treće i četvrte eksperimentalne grupe zapaža se povećanje broja i proliferacija ćelija u odnosu na kontrolu, dok je u grupi sa dodatim Cu,ZnSOD povišena i vijabilnost.

Tabela 15. Efekti natrijum-nitroprusida na ukupan broj ćelija/mL, vijabilnost (%) i preživljavanje (%) u ćelijskoj liniji K562.

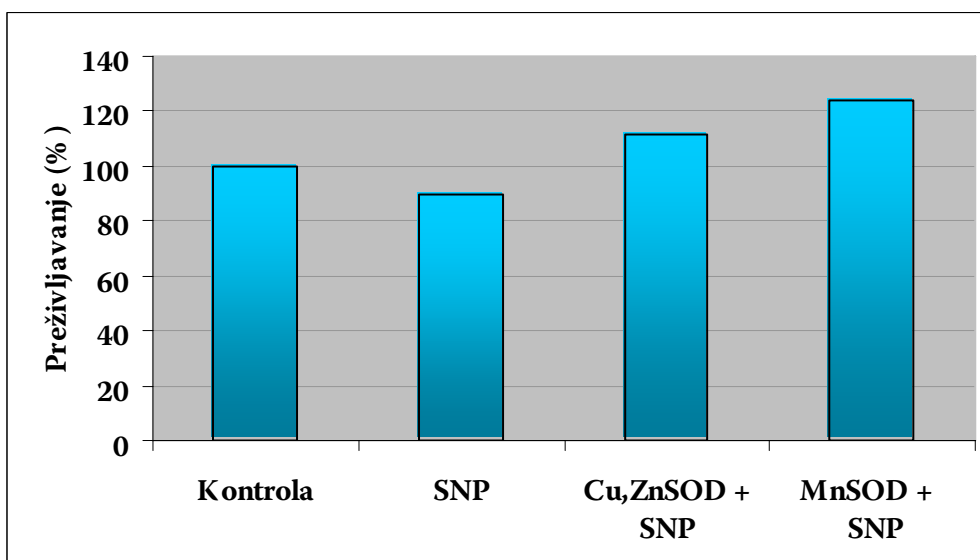
Grupa	Ukupan broj/ml	Vijabilnost (%)	Preživljavanje (%)
Kontrola	737500	90.77	100.00
SNP	662500	76.88	89.83
Cu,ZnSOD+SNP	825000	91.66	111.86
MnSOD+SNP	912500	89.02	123.73



Grafikon 20: Efekti natrijum-nitroprusida na ukupan broj ćelija/mL u ćelijskoj liniji K562.



Grafikon 21: Efekti natrijum-nitroprusida na vijabilnost (%) u ćelijskoj liniji K562.



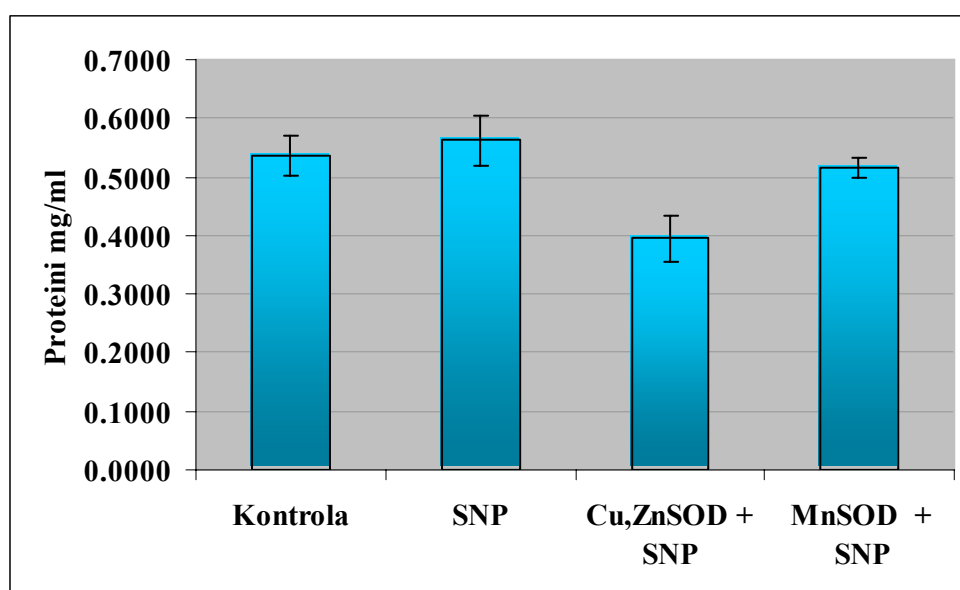
Grafikon 22: Efekti natrijum-nitroprusida na preživljavanje (%) u ćelijskoj liniji K562.

4.2.6. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina u ćelijskoj liniji humane eritroleukemije (K562)

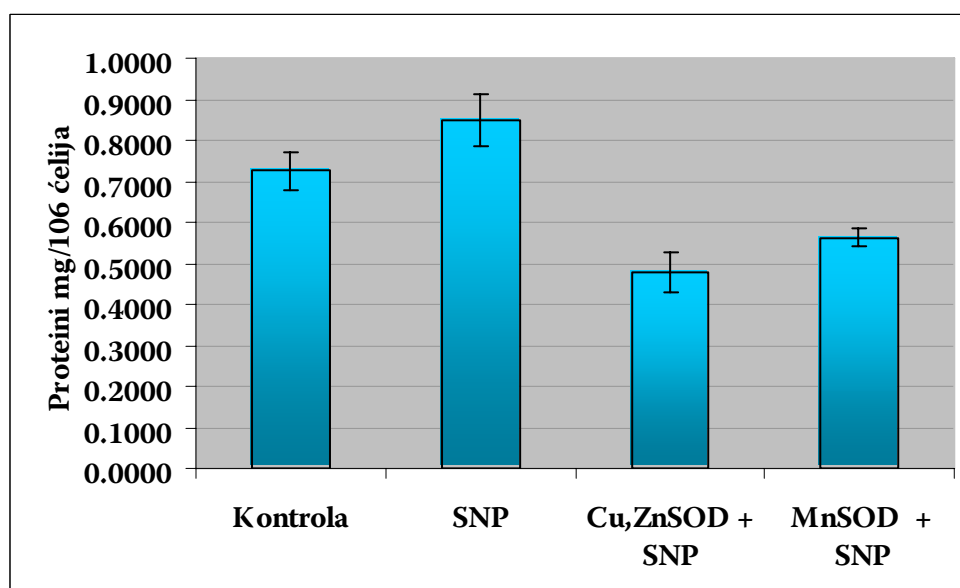
Zanimljivo je istaći da je koncentracija ukupnih proteina povišena u grupi uzoraka inkubiranih sa SNP kako u odnosu na specifičnu, tako i u odnosu na ukupnu aktivnost. U ostalim eksperimentalnim grupama koncentracija proteina je značajno snižena (Tabela 16, Grafikoni 23,24).

Tabela 16. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina u ćelijskoj liniji K562.

Grupa	Proteini mg/ml	Proteini mg/10 ⁶ ćelija
Kontrola	0.5354	0.7260
SNP	0.5628	0.8495
Cu,ZnSOD+SNP	0.3948	0.4785
MnSOD+SNP	0.5140	0.5633



Grafikon 23: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina (mg/mL) u ćelijskoj liniji K562.



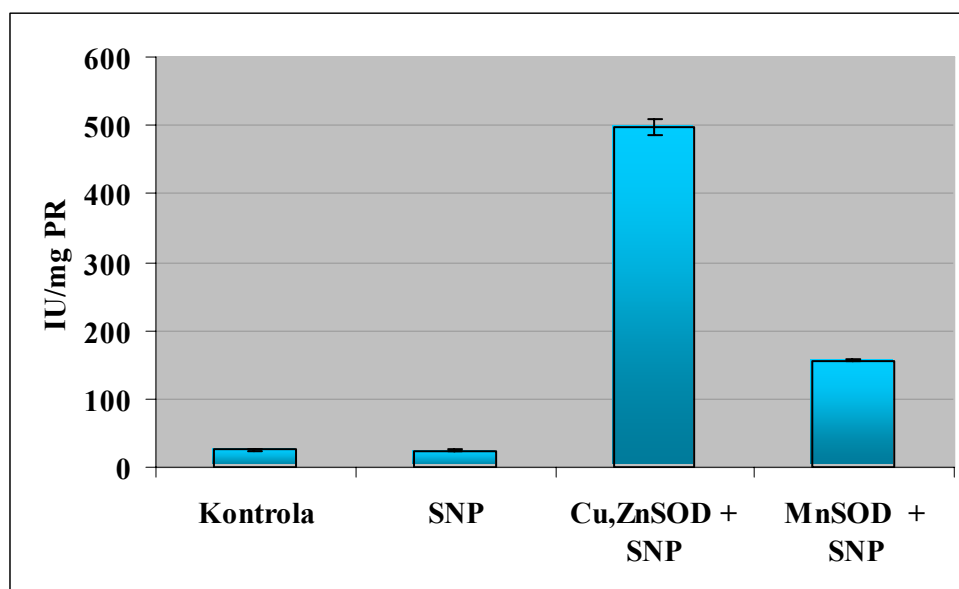
Grafikon 24: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnih proteina (mg/10⁶ ćelija) u ćelijskoj liniji K562.

4.2.7. Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD u uzorcima ćelijske linije humane eritroleukemije (K562)

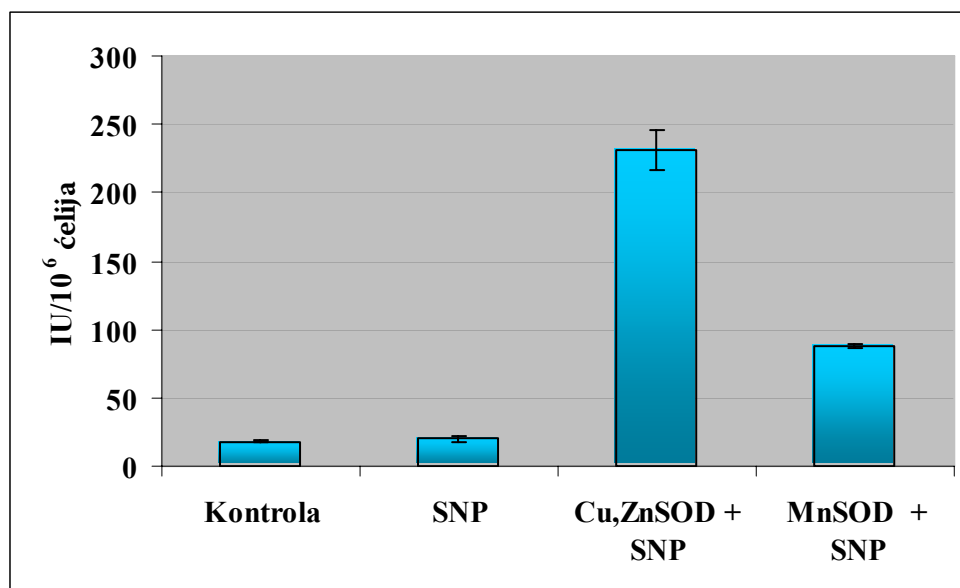
I specifična i ukupna aktivnost SOD nije statistički značajno promenjena u grupi uzoraka K562 ćelija inkubiranih sa 2mM SNP. Statistički značajno povišenje aktivnosti zapaža se u grupama inkubiranim sa 2mM SNP koje su prethodno tretirane Cu,ZnSOD, odnosno MnSOD-om (Tabela 17, Grafikoni 25 i 26).

Tabela 17. Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD u ćelijskoj liniji K562.

Grupa	IU/mg PR	IU/10 ⁶ ćelija
Kontrola	25.0797	18.2070
SNP	24.0618	20.0139
Cu,ZnSOD+SNP	497.5242	230.8321
MnSOD+SNP	155.9843	87.8641



Grafikon 25: Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD (IU/mg proteina) u ćelijskoj liniji K562.



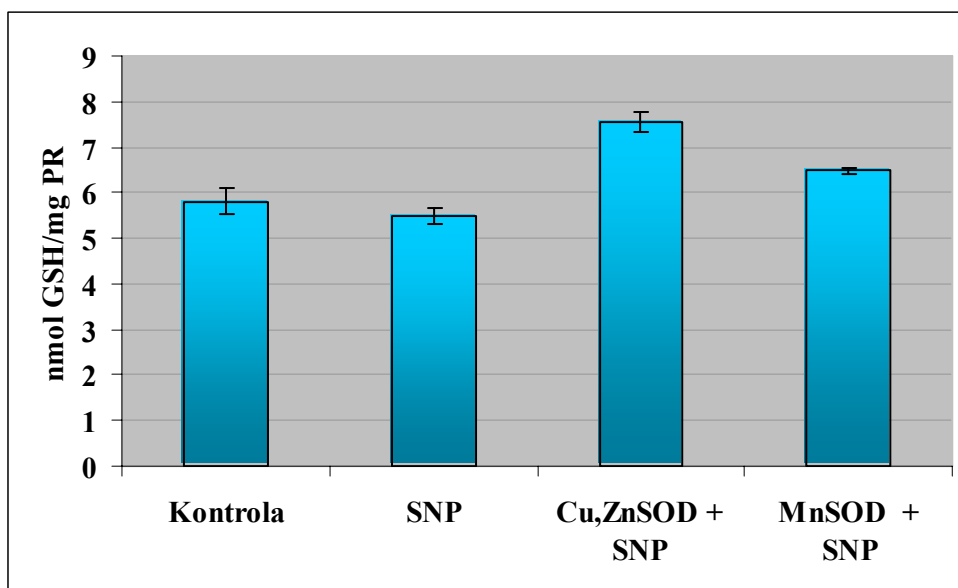
Grafikon 26: Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupne SOD (UI/10⁶ ćelija) u ćelijskoj liniji K562.

4.2.8. Efekti SNP na koncentraciju ukupnog glutaciona (GSH+GSSG) u uzorcima ćelijske linije humane eritroleukemije (K562)

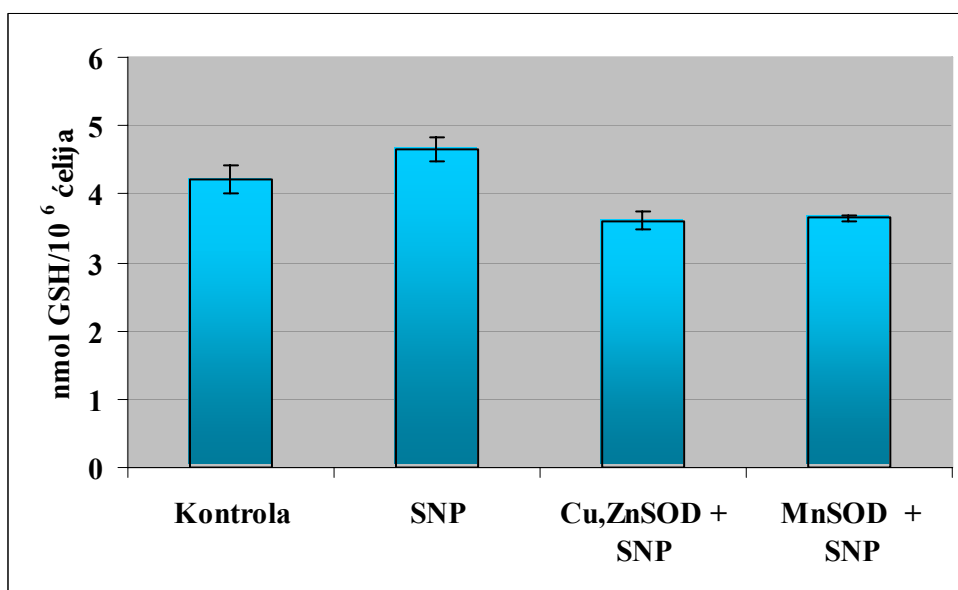
SNP snižava specifičnu koncentraciju ukupnog glutatona, dok u kombinaciji sa Cu,ZnSOD odnosno MnSOD dovodi do povišenja koncentracije ovog ćelijskog redoks pufera (Tabela 18, Grafikon 27). Nasuprot tome, koncentracija glutaciona izražena kao ukupna pokazuje povećanje u grupi uzoraka tretiranih sa SNP (Tabela 18, Grafikon 28), dok je u grupama predtretiranim SOD-om zapaženo značajno sniženje koncentracije.

Tabela 18. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnog glutaciona (GSH+GSSG) u uzorcima ćelijske linije K562.

Grupa	nmol/mg PR	nmol/10 ⁶ ćelija
Kontrola	5.8121	4.2194
SNP	5.4826	4.6575
Cu,ZnSOD+SNP	7.5505	3.6133
MnSOD+SNP	6.4783	3.6491



Grafikon 27: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnog glutationa (nmol GSH/mg proteina) u uzorcima ćelijske linije K562.



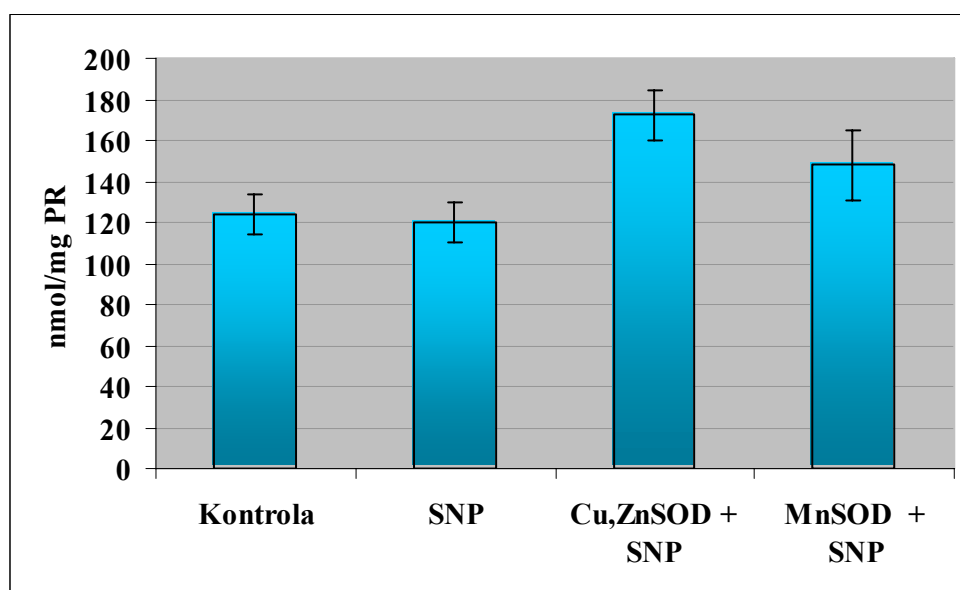
Grafikon 28: Efekti natrijum-nitroprusida na aktivnost ukupnog glutationa (nmol/ 10⁶ ćelija) u uzorcima ćelijske linije K562.

4.2.9. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa u uzorcima ćelijske linije humane eritroleukemije (K562)

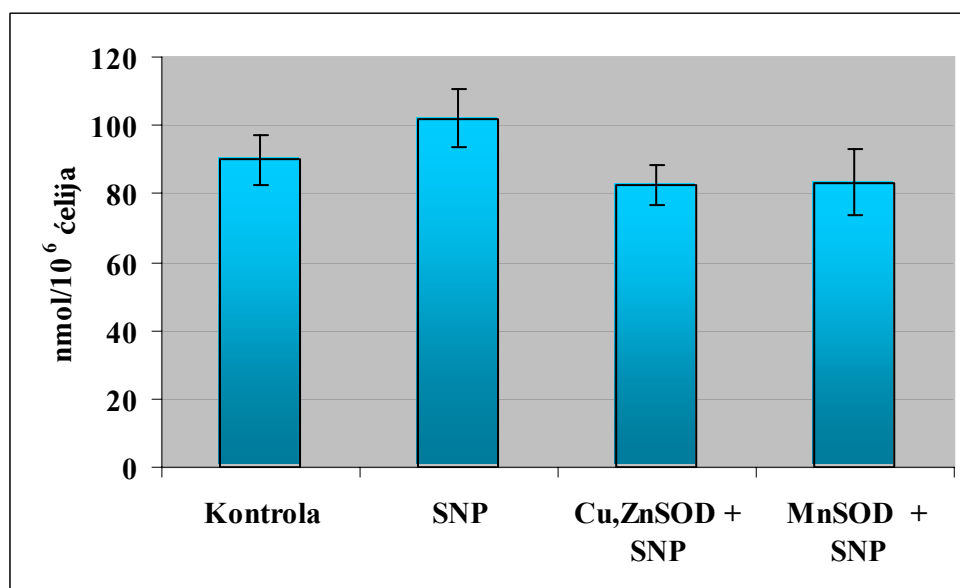
SNP snižava specifičnu koncentraciju slobodnih tiolnih grupa, dok u kombinaciji sa Cu,ZnSOD odnosno MnSOD dovodi do povišenja njihove koncentracije (Tabela 19, Grafikon 29). Nasuprot tome, koncentracija slobodnih tiolnih grupa izražena kao ukupna pokazuje značajno povećanje u grupi uzoraka tretiranih sa SNP (Tabela 19, Grafikon 30), dok je u grupama predtretiranim SOD-om zapaženo sniženje koncentracije.

Tabela 19. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa u uzorcima ćelijske linije K562.

Grupa	nmol/mg PR	nmol/10 ⁶ ćelija
Kontrola	123.9078	89.9528
SNP	120.1411	102.0610
Cu,ZnSOD+SNP	172.5569	82.5763
MnSOD+SNP	147.9214	83.3223



Grafikon 29: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa (nmol/mg proteina) u uzorcima ćelijske linije K562.



Grafikon 30: Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa (nmol/10⁶ ćelija) u uzorcima ćelijske linije K562.

4.3. Rezultati dvofaktorske analize varijanse (two-way ANOVA)

Tabela 20. Indeks inkorporacije timidina u ćelije K562 kulture. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=8).

	kontrola	0.1 mM	1 mM	2 mM	5 mM	
K562	3h	10148 \pm 4130	16694 \pm 6094	19111 \pm 799	1793 \pm 250	1648 \pm 231
	24h	7365 \pm 852	5599 \pm 2549	1715 \pm 199	2302 \pm 247	2250 \pm 250
	48h	3924 \pm 837	11597 \pm 1906	16705 \pm 271	1807 \pm 116	1609 \pm 149
	72h	11658 \pm 1107	16731 \pm 787	18289 \pm 903	1938 \pm 101	1809 \pm 174

Tabela 21. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) inkorporacije timidina sa vremenom i koncentracijama kao faktorima (**** - $p < 0.001$).

	Vreme (t)	Koncentracija (c)	T x c	Greška
Df	3	4	12	140
K562 MS	341 x 10 ⁶	1 x 10 ⁹	129 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁶
F	98****	303****	37****	

Može se reći da povećanje koncentracija uzrokuje pad inkorporacije, koje se vremenom restituiše kod grupa koje su tretirane nižim koncentracijama.

Tabela 22. Rezultati DET testa prikazani kao srednja vrednost ($\times 10^3$) \pm standardna devijacija (n=3) u kulturi K562.

	kontrola	0.1 mM	1 mM	2 mM	5 mM	
K562	0	300	300	300	300	
	3h	200	218 \pm 1	192 \pm 8	153 \pm 18	185 \pm 9
	24h	238 \pm 4	205 \pm 5	125 \pm 5	110 \pm 10	10
	48h	310 \pm 10	283 \pm 0.2	130	120 \pm 12	17 \pm 0.1
	72h	240 \pm 10	250 \pm 50	148 \pm 2	137 \pm 19	3 \pm 0.3

Tabela 23. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti DET testa sa vremenom i koncentracijama kao faktorima u kulturi K562.

		Vreme (t)	Koncentracija (c)	T x c	Greška
K562	Df	4	4	16	50
	MS	61.8×10^9	64.5×10^9	98×10^9	0.15×10^9
	F	405***	423***	64***	

Tabela 24. Rezultati DET testa prikazani kao srednja vrednost ($\times 10^3$) \pm standardna devijacija (n=3) u kulturi L929.

		kontrola	0.1 mM	1 mM	2 mM	5 mM
L929	0	100	100	100	100	100
	3h	340 ± 79	290 ± 52	283 ± 52	158 ± 30	120 ± 39
	24h	552 ± 28	462 ± 58	153 ± 46	142 ± 21	160 ± 17
	48h	1283 ± 53	1120 ± 65	115 ± 23	70 ± 9	0
	72h	1222 ± 38	1145 ± 61	83 ± 76	0	50

Tabela 25. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti DET testa sa vremenom 0, 3 i 24h i koncentracijama (c1-c4) kao faktorima u kulturi L929.

		Vreme (t)	Koncentracija (c)	T x c	Greška
L929	Df	2	4	8	30
	MS	149×10^9	760×10^9	336×10^9	1.4×10^9
	F	106***	54***	23.9***	

Sa porastom koncentracija evidentan je pad, koji je za 3h koncencracijski zavistan (viša koncentracija, veći pad), dok za 24h od 1 mM nadalje efekat je isti.

Tabela 26. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti DET testa sa vremenom i koncentracijama (0, c1 i c2) kao faktorima u kulturi L929.

		Vreme (t)	Koncentracija (c)	T x c	Greška
L929	Df	4	2	8	30
	MS	957×10^9	134×10^9	301×10^9	2.04×10^9
	F	467***	656***	147***	

Efekat je smanjenje porasta kultura tretiranih sa 0.1 mM, dok za 1 mM pada.

Tabela 27. Rezultati MTT testa prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=12) u kulturi K562.

		kontrola	0.1 mM	1 mM	2 mM	3 mM	5 mM
K562	1h	0.15 \pm 0.05	0.15 \pm 0.03	0.14 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
	3h	0.21 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.044 \pm 0.004
	24h	0.41 \pm 0.02	0.38 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.051 \pm 0.004
	48h	0.79 \pm 0.03	0.61 \pm 0.05	0.07 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01

Tabela 28. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti MTT testa sa vremenom i koncentracijama kao faktorima u kulturi K562.

		Vreme (t)	Koncentracija (c)	T x c	Greška
K562	Df	3	5	15	264
	MS	0.426	1.09	0.235	0.0004
	F	1065***	2730***	587***	

Vrednost kod kontrola raste, 0.1 mM suprimira rast, 1 mM suprimira i potpuno prekida rast posle 48h, dok ostale koncentracije inhibiraju rast već posle 1h.

Tabela 29. Rezultati MTT testa prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=12) u kulturi L929.

		kontrola	0.1 mM	1 mM	2 mM	3 mM	5 mM
L929	1h	0.34 \pm 0.06	0.34 \pm 0.06	0.33 \pm 0.05	0.24 \pm 0.07	0.14 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02
	3h	0.36 \pm 0.05	0.31 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
	24h	0.65 \pm 0.02	0.56 \pm 0.01	0.35 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
	48h	0.98 \pm 0.04	0.7 \pm 0.1	0.18 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.035 \pm 0.005	0.03 \pm 0.01

Tabela 30. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti MTT testa sa vremenom i koncentracijama kao faktorima u kulturi L929.

		Vreme (t)	Koncentracija (c)	T x c	Greška
L929	Df	3	5	12	264
	MS	0.318	2.297	0.274	0.0015
	F	209***	1505***	180***	

Vrednost kod kontrola raste, 0.1 mM suprimira rast, 1 mM suprimira i potpuno prekida rast posle 48h, dok ostale koncentracije inhibiraju rast već posle 1h, a potpuno prekidaju posle 3h.

Da bi se ispitalo da li postoje razlike u reagovanju između kultura (efekat kulture ćelija) tj. da li ćelijske kulture reaguju različito na supstancu urađena je dvofaktorska analiza varijanse u dva nezavisna testa sa kulturom kao faktorom i koncentracijom (Tabela 31) i vremenom (Tabela 32.)

Tabela 31. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti MTT testa sa kulturom i koncentracijama kao faktorima.

		Koncentracija (c)	kultura (k)	C x k	Greška
Df		5	1	5	564
MS		3.265	1.509	0.124	0.0184
F		178***	82***	6.75***	

Postoji razlika u jačini odgovora (stepenu inhibicije kod ove dve kulture); uočava se da je efekat jači na L929 kulturi.

Tabela 32. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti MTT testa sa kulturom i vremenom kao faktorima.

		kultura (k)	vreme (t)	K x t	Greška
Df		3	1	3	568
MS		0.7	1.51	0.043	0.044
F		15.88***	34***	0.978	

Nema efekta vremena, tj. sa vremenskog aspekta tretman istovremeno deluje na obe kulture.

Tabela 33. Rezultati SRB testa prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=12) u kulturi K562.

		kontrola	0.1 mM	1 mM	2 mM	3 mM	5 mM
K562	1h	0.316 \pm 0.002	0.27 \pm 0.02	0.29 \pm 0.04	0.24 \pm 0.03	0.13 \pm 0.02	0.037 \pm 0.005
	3h	0.438 \pm 0.003	0.394 \pm 0.002	0.198 \pm 0.001	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
	24h	0.882 \pm 0.005	0.74 \pm 0.05	0.16 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.084 \pm 0.005	0.001 \pm 0.003
	48h	1.668 \pm 0.005	1.4 \pm 0.1	0.51 \pm 0.06	0.163 \pm 0.005	0.02 \pm 0.03 (n=11)	0.004 \pm 0.005 (n=6)

Tabela 34. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti SRB testa sa vremenom i koncentracijama kao faktorima u kulturi K562.

		Vreme (t)	Koncentracija (c)	T x c	Greška
K562	Df	3	5	15	257
	MS	2.562	5.398	0.971	0.0009
	F	2835***	5972***	1074***	

Tabela 35. Rezultati SRB testa prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=12) u kulturi L929.

		kontrola	0.1 mM	1 mM	2 mM	3 mM	5 mM
L929	1h	0.15 \pm 0.01	0.15 \pm 0.03	0.14 \pm 0.02	0.074 \pm 0.005	0.035 \pm 0.004	0.03 \pm 0.01
	3h	0.38 \pm 0.03	0.34 \pm 0.05	0.18 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
	24h	0.82 \pm 0.05	0.77 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
	48h	1.67 \pm 0.04	1.49 \pm 0.05	0.26 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01

Tabela 36. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti SRB testa sa vremenom i koncentracijama kao faktorima u kulturi L929.

	Vreme (t)	Koncentracija (c)	T x c	Greška	
L929	Df	3	5	15	264
	MS	3.7	5.25	1.2	0.00059
	F	6282***	8920***	2039***	

Da bi se ispitalo da li postoje razlike u reagovanju između kultura (efekat kulture ćelija) tj. da li ćelijske kulture reaguju različito na supstancu urađena je dvofaktorska analiza varijanse u dva nezavisna testa sa kulturom kao faktorom i koncentracijom (Tabela 37) i vremenom (Tabela 38), kao i u slučaju sa MTT testom.

Tabela 37. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti SRB testa sa kulturom i koncentracijama kao faktorima.

	Koncentracija (c)	kultura (k)	C x k	Greška
Df	5	1	5	557
MS	10.68	0.236	0.051	0.096
F	111***	0.118	0.756	

Kulture reaguju istovetno. Koncentracija utiče i kod jedne i kod druge u istom pravcu i istom jačinom.

Tabela 38. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti MTT testa sa kulturom i vremenom kao faktorima.

	vreme (t)	kultura (k)	K x t	Greška
Df	3	1	3	561
MS	7.22	0.46	1	0.152
F	47.6***	3.03	0.659	

Vremenski tok tokom tretmana je kod obe kulture istovetan.

Dakle, obe kulture preko SRB testa imaju isti efekat, tj. nema razlike između kultura.

Tabela 39. Broj ćelija (10^6 po ml). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=4).

	kontrola	SNP	CuZnSOD + SNP	MnSOD + SNP	ANOVA
K562	0.74 ± 0.04 ^{ab}	0.66 ± 0.05 ^a	0.83 ± 0.05 ^{bc}	0.91 ± 0.02 ^c	P < 0.001
L929	1.65 ± 0.02 ^a	1.59 ± 0.01 ^a	1.25 ± 0.14 ^b	1.38 ± 0.06 ^b	P < 0.001

Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku.

Kod L929: kontrola i SNP se razlikuju od druge dve grupe, ali ne i međusobno.

Kod K562, različitost je izukršтана.

Tabela 40. Rezultati statističke obrade podataka - srednja vrednost \pm SD (n) po parametrima ukupni glutation, tiolne grupe i ukupna SOD sa kulturom i tretmanom kao faktorima.

		kontrola	SNP	SNP + CuZnSOD	SNP + MnSOD
GSH (po mg prot)	K	5.8 ± 0.8 (8)	5.5 ± 0.5 (6)	7.6 ± 0.7 (6)	6.5 ± 0.2 (6)
	L	9.4 ± 0.6 (8)	8 ± 0.5 (6)	8.3 ± 0.1 (6)	5.8 ± 0.1 (6)
GSH (po broju ćelija)	K	4.2 ± 0.6 (8)	4.7 ± 0.4 (6)	3.6 ± 0.3 (6)	3.6 ± 0.1 (6)
	L	7.5 ± 0.5 (8)	7.3 ± 0.4 (6)	9.6 ± 0.2 (6)	8.6 ± 0.2 (6)
SH (po mg prot)	K	124 ± 10 (6)	120 ± 10 (6)	173 ± 12 (6)	148 ± 17 (6)
	L	50 ± 12 (8)	67 ± 8 (7)	71 ± 4 (8)	52 ± 3 (6)
SH (po broju ćelija)	K	90 ± 7 (6)	102 ± 8 (6)	83 ± 6 (6)	83 ± 10 (6)
	L	40 ± 9 (8)	59 ± 7 (7)	82 ± 4 (8)	77 ± 4 (6)
SOD (po mg prot)	K	25 ± 0.7 (6)	24 ± 2.5	498 ± 31 (6)	156 ± 3 (6)
	L	10 ± 1.1 (6)	10 ± 1.4 (6)	25 ± 1.3 (8)	18 ± 0.5 (6)
SOD (po broju ćelija)	K	18.2 ± 0.5 (6)	20 ± 2.1 (9)	238 ± 15 (6)	88 ± 1.6 (6)
	L	8.2 ± 0.8 (6)	9.1 ± 1.3 (6)	29 ± 1.4 (8)	27 ± 0.8 (6)

Tabela 41. Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) vrednosti sa kulturom i tretmanom kao faktorima.

		Kultura (K)	Tretman (T)	K x T	Greška
GSH (po mg prot)	Df	1	3	3	44
	MS	30.2	8.31	11.7	0.26
	F	114***	31.5***	44.3***	
GSH (po broju ćelija)	Df	1	3	3	44
	MS	228	1.4	7.3	0.15
	F	1565***	9.6***	50***	
SH (po mg prot)	Df	1	3	3	45
	MS	86351	3135	1589	105
	F	823***	29.9***	15.1***	
SH (po broju ćelija)	Df	1	3	3	45
	MS	8252	891	2077	53
	F	156***	16.8***	39***	
SOD (po mg prot)	Df	1	3	3	45
	MS	330058	179858	158467	107
	F	3094***	1686***	1485***	
SOD (po broju ćelija)	Df	1	3	3	45
	MS	68394	43037	29795	25.6
	F	2673***	1682***	1164***	

Legenda:

K- kultura K562

L - kultura L929

n - kontrolna grupa

s – grupa sa dodatim SNP

sc – grupa sa sodatim Cu,Zn-SOD

sm - grupa sa sodatim Mn-SOD

Tumačenje rezultata

GSH (po mg prot)	K<L	n = sc < s < sm, efekat zavistan od ćelijske linije
GSH (po broju ćelija)	K<L	sc > n = s = sm, efekat zavistan od ćelijske linije
SH (po mg prot)	K>L	n < s < sm < sc, efekat zavistan od ćelijske linije
SH (po broju ćelija)	K>L	n < s = sc = sm, efekat zavistan od ćelijske linije
SOD (po mg prot)	K>L	sc > sm > s = n, efekat zavistan od ćelijske linije
SOD (po broju ćelija)	K>L	sc > sm > s = n, efekat zavistan od ćelijske linije

Rezultati dvofaktorske analize varijanse pokazuju da se ekperimentalne kulture razlikuju u nivoima posmatranih parametara, kao i da je efekat aplikovanih supstanci drugačiji.

5. Diskusija

Regulacija metabolizma odvija se preko aktivacije mreže signal transdukcionih puteva u ćelijama koji određuju adekvatni metabolički odgovor na promenu uslova sredine (290). Azot oksid i vodonik peroksid kao signalni molekuli predstavljaju predmet intenzivnog proučavanja poslednjih godina (291).

Tokom prethodne decenije azot oksid je bio u fokusu istraživanja, ali je nedavno postalo jasno da i drugi azotni oksidi i redoks aktivni potomci produkovani *in vivo* iz NO mogu imati značajnu fiziološku i/ili patofiziološku ulogu. Zbog toga smo dizajnirali naše eksperimente tako da korišćenjem klasičnog donora NO - natrijum nitroprusida (SNP) i dve vrste superoksid dismutaza Cu,Zn SOD i Mn-SOD stvorimo uslove generisanja više vrsta signalnih molekula i ispitamo odgovor transformisanih (L929) i malignih (K562) ćelija na njih.

Natrijum nitroprusid je fotoreaktivan, tranzicioni metal-NO kompleks koji spontano oslobađa NO uglavnom kao nitrozonijum jon NO^+ (70%), dok je NO^- zastupljen sa oko 30% (272). Ovaj linearni donator NO istovremeno otpušta i cijanidne jone (maksimalno pet ekvivalenata CN^- po molu SNP) (272,273). Dominacija nitrozonijum jona među potomcima natrijum nitroprusida pretpostavlja i njegovu glavnu ulogu u ćelijskom metabolizmu. Međutim, najnoviji radovi (292,293) ukazuju na činjenicu da SNP u ćeliji produkuje NO^- jone dovodeći do posledičnog formiranja S-nitrozotiola i peroksinitrita. Takođe, danas se zna da NO^- pokazuje diskretan hemizam u odnosu na ostale RNS i da ostvaruje snažne citotoksične efekte (293). Natrijum nitroprusid izaziva koncentraciono - zavisnu proliferaciju ili inhibiciju ćelijskog rasta *in vitro* (9).

Efekte donora NO natrijum nitroprusida (koji se i klinički koristi u tretmanu akutnih hipertenzivnih kriza) na ćelijske linije L929 i K562 u kulturi u našem eksperimentu praćeni su da bi se odredile odgovarajuća koncentracija i vreme inkubacije uzoraka sa SNP koje dovode do rezultata da je u datoj tački eksperimenta procenat preživelih ćelija oko 70%. Naime, ovakvi efekti bili su nam potrebni kao preduslov za dalje eksperimente, gde smo SNP već određene koncentracije inkubirali zajedno sa Cu,Zn-SOD, odnosno Mn-SOD, prateći redoks promene u ćelijama preko nekoliko parametara. Pritom nam je bilo važno da polazni efekat SNP na ćelije bude takav, da bi se ispoljila evidentna citotoksičnost, a u isto vreme, da bi preostalo dovoljno preživelih ćelija za uspešno izvođenje eksperimenta.

Prikazani rezultati SRB testa pokazuju da SNP kao brzi, linearni donator NO, svoje efekte iskazuje već u prvom satu inkubacije sa uzorcima L929 ćelija. Pritom, koncentracija od 2mM u toj vremenskoj tački eksperimenta daje traženi efekat od oko 60-70% preživelih ćelija, odnosno citotoksičnost od oko 35% praćeno DET i SRB testom.

Mada metodološki u osnovi različit od SRB testa, i MTT test je dao vrlo slične rezultate u praćenju citotoksičnosti SNP različitih koncentracija na uzorcima ćelijske linije L929. I u ovom eksperimentu prikazani rezultati pokazuju da je za traženi efekat potrebna koncentracija od 2mM SNP inkubiranog sa uzorcima ćelija 1h.

Praćenje broja K562 ćelija DET testom pokazalo je stabilan rast u kontrolnoj grupi i u grupi sa najmanjom koncentracijom dodatog SNP. Kao i kod L929 ćelija, SNP koncentracije 2mM doveo je do sniženja broja ćelija za oko 36%, odnosno procenat preživelih ćelija bio je 64 nakon isteka prva tri časa inkubacije. Linearne dozno - zavisne promene poreklom od citotoksičnosti SNP mogu se pratiti posebno za svaku vremensku tačku SRB - eksperimenta. Osim toga, linearnost u porastu procenta citotoksičnosti održava se sa trajanjem inkubacije, što ukazuje na pojavu da SNP, osim što je brzi donator NO, dovodi i do takvih promena koje imaju dalekosežnije posledice na ćeliju. Pritom, koncentracija od 2mM u prvom satu

inkubacije sa SNP ostavlja oko 60% preživelih ćelija, što odgovara uslovima kakve smo zahtevali u centralnom eksperimentu.

Citotoksičnost SNP praćena MTT testom iskazuje se po istom modelu kao i kod SRB testa. Pri nižim koncentracijama (0.1 i 1mM), citotoksičnost je visoka tek pri kraju eksperimenta, dok se pri višim koncentracijama (3 i 5mM) ona ispoljava već u prvom satu eksperimenta. Koncentracija od 2mM nakon jednog sata inkubacije sa SNP daje očekivani broj od oko 65% preživelih ćelija K562.

Niske vrednosti procenta citotoksičnosti pri nižim koncentracijama SNP u SRB i MTT testu, kao i prethodno poznat podatak da oksidativni/nitrozativni stres može delovati stimulatивно na proliferaciju malignih ćelija, naveli su nas na ideju da na K562 ćelijskoj liniji izvedemo i test inkorporacije ³H timidina kojim se prati indeks proliferacije ćelija. Test je pogodan za izvođenje na flotirajućim ćelijama (kakve su i K562), jer se tokom eksperimenta tzv. "harvesterom" ćelije usisavaju i prebacuju na posebne filtere. Rezultati eksperimenta su pokazali da niske koncentracije SNP deluju stimulatивно na proliferaciju K562 ćelija u kulturi, dok je kod viših koncentracija situacija suprotna, dakle, uočava se dozno-zavisan negativni uticaj SNP na proliferaciju K562 ćelija.

Pošto se koncentracija od 2mM SNP pokazala kao granična između stimulacije i inhibicije proliferacije K562 ćelija, u daljem toku eksperimenta uzorci su inkubirani SNP-om niže koncentracije (1mM), kao i sa kombinacijom 1mM SNP i 0.1 μM SOD.

Kada je prvi put izolovana humana superoksid dismutaza, još nije bila poznata njena aktivnost i smatrana je "bakarnim proteinom", nejasnog značaja koji se može naći u eritrocitima, mozgu i jetri. Protein je nazvan eritrokuprein, cerebrokuprein ili hepatokuprein u zavisnosti od mesta nalaženja. Superoksid dismutaze (EC 1.15.1.1) čine glavnu liniju odbrane od toksičnosti koju stvara kiseonik u živim ćelijama. Postoji nekoliko vrsta superoksid dismutaza koje koriste metalne jone za reakcije dismutacije. Klasifikacija je izvršena prema jonu metala koji se nalazi u aktivnom mestu. Tu spadaju Cu,Zn-SOD koja se pre svega nalazi u citoplazmi eukariota, Fe-SOD koja se nalazi u prokariotskim ćelijama, Mn-SOD koja se nalazi i u eukariotskim i u prokariotskim ćelijama (294) i Ni-SOD koja je najkasnije otkrivena u soju *Streptomyces* (2). Za distribuciju ovih enzima u prokariotskim i eukariotskim organizmima dugo se smatralo da su klase Mn- i Fe-SOD karakteristične za prokariotske organizme a Cu,Zn - i Mn-SOD za eukariotske organizme. Na prve izuzetke od ovog pravila ukazao je A. M. Michelson otkrićem Cu,Zn-SOD u *Photobacterium leigonathi* (294). Najnoviji rezultati ukazuju da *E. coli* poseduje tri vrste superoksid dismutaze koje se razlikuju u njihovoj lokalizaciji i ekspresiji sa obe Fe- i Mn-SOD u citoplazmi i Cu,Zn-SOD lociranoj u periplazmi (295). Ovaj aspekt je godinama bio zanemaren jer se u literaturi do 1996. godine spominjalo samo prisustvo Fe- i Mn-SOD, ali ne i Cu,Zn-SOD kod *E. coli*. Tako su brojna istraživanja mutagenih i citotoksičnih efekata slobodnih radikala na *E. coli* previdela činjenicu prisustva ove treće vrste koja može imati značajan udeo u rezistenciji na izvor radikala kao što je herbicid parakvat (294).

Primena Cu,Zn-SOD u našim eksperimentima zasnovana je na sledećim osobinama ovog enzima. Na fiziološkom pH, ukoliko nema prisutnih katalizatora, konstanta brzine reakcije dismutacije superoksida je $k=1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ – reakcija se odvija brzo, ali ukoliko je prisutan egzogeni enzim SOD onda je konstanta brzine gornje reakcije mnogo veća i iznosi $k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (2).

Cu,Zn-SOD je stabilna u odnosu na NO čak i posle prolongiranog izlaganja (211). Neosetljivost Cu,Zn-SOD na azotmonoksid može biti objašnjena time da ona pripada klasi Cu-sadržavajućih proteina koji ne vezuju NO. NO produkuje beznačajne efekte na njegovu strukturu i aktivnost. Zbog toga je u kombinaciji SNP + CuZn-SOD primenjenoj u našem eksperimentu stabilizovana količina NO iz SNP.

Tokom primene u kombinaciji SNP+Cu,Zn-SOD cijanidni joni iz natrijum nitroprusida dovode do inhibicije aktivnosti ovog enzima (293). Novija istraživanja pokazala su da NO modulira ekspresiju ecSOD u mišićnim ćelijama krvnih sudova u kulturi, kao i ekspresiju ecSOD *in vivo*. Ovaj efekat NO je moduliran cGMP protein-kinaznim obrascem (296).

Imajući u vidu navedene rezultate, prisustvo Cu,Zn-SOD u medijumu zaista stabilizuje NO i eliminiše moguće negativne efekte nastanka CN. S druge strane, Cu,Zn superoksid dismutaza deluje na NO⁺ dovodeći do njegove stabilizacije i prevencije građenja peroksinitrita.

Pre-tretman ćelija u kulturi sa Cu,Zn-SOD u kombinaciji sa SNP pokazuje evidentnu, ali ne i statistički značajnu stimulaciju ćelijske proliferacije u poređenju sa SNP-tretiranom grupom. SNP koncentracije 1mM dovodi do proliferacije K562 ćelija u svim vremenskim tačkama eksperimenta.

Primena Mn-SOD poreklom iz *E.coli* u našim eksperimentima zasnovana je na novijoj naučnoj činjenici da Mn-SOD osim katalizovanja dismutacije superoksida katalizuje i disproporcionisanje azot oksida uz nitrozilaciju i raspadanje enzima, koje je po analogiji sa dismutacijom superoksida nazvano dismutacija azot oksida (297).

U najnovijim istraživanjima pokazano je da Mn-SOD vezuje azot oksid i stimuliše njegovu razgradnju i pod aerobnim i pod anaerobnim uslovima (295). Time je pokazano da se prethodno utvrđena anaerobna produkcija nitroksila i nitrozonijum jona dešava i u prisustvu molekuskog kiseonika. Pri tome se Mn-SOD sama razgrađuje i produkuje značajne količine vodonik peroksida.

Za razliku od jedinjenja koja stvaraju NO čije se fiziološko delovanje ostvaruje preko povećane produkcije cGMP, efekti HNO nisu praćeni povećanim nivoom sekundarnog prenosnika (mesendžera) cGMP. Umesto toga uočena je povećana koncentracija peptida povezanog sa kalcitonin genom (CGRP). Reč je o peptidu koji sadrži 37 aminokiselinskih ostataka i koji nastaje iz primarnog RNK transkripta gena za kalcitonin u senzornim neuronima. CGRP se može sintetizovati pod mnogim uslovima i raznim stimulusima kao što su ishemija, nikotin, kapsacin, nitroglicerol i nitroksil donor (ali ne i ostala jedinjenja od kojih nastaje NO). Pokazano je da CGRP smanjuje pulmonarni i sistemski pritisak kod srčanih bolesnika i povećava srčanu aktivnost bez stvaranja tahikardije, a efekti su praćeni povećanjem cAMP (99).

Mn-SOD iz *E. coli* u pikomolarnim koncentracijama izaziva relaksaciju NO, a imajući u vidu mogućnost dismutacije NO ovim enzimom izgleda i da je NO⁻ relaksacija prisutna. Značajno je da Fe supstitucija ne izaziva isto osim u visokim koncentracijama.

U našim eksperimentima, u eksperimentalnoj grupi sa kombinacijom SNP+Mn-SOD, kao efikasne reaktivne vrste u rastvoru smo imali nitroksil, nitrozonijum i vodonik peroksid. Različite vrste ćelija pokazuju veoma velike razlike u odgovoru na citotoksičnost NO. U kombinaciji NO i vodonik peroksida, koncentracija redukovano glutaciona (GSH) je uvek snižena. Ćelije koriste različite obrasce u održavanju koncentracije glutaciona u odgovoru na nitrozativni stres, a generalna sposobnost ćelije da održi kritičnu količinu GSH korelira sa osetljivošću na NO-indukovanu ćelijsku smrt. L929 fibroblasti su rezistentni prema NO (298). Zbog toga smo pratili količinu glutaciona i slobodnih tiola u našim eksperimentima kod tretiranih L929 i K562 ćelija.

Proteini koji nose tirole takođe mogu iskazivati redoks-modulatorne osobine. *In vitro* istraživanja pokazuju da je u malignim ćelijama visok nivo GSH (2). Dodatkom SOD dolazi do deplecije glutaciona u ćelijama kancera. Podaci u ovom radu ukazuju da neravnoteža u ćelijskom oksidativnom stresu/antioksidativnom balansu dovodi do privremene deplecije glutaciona i povećane osetljivosti ćelija na citotoksičnost, kao i do pokretanja apoptotskog mehanizma (299).

NO-zavisna S-nitrozacija tiola do S-nitrozotiola je veoma bitan obrazac za metabolizam NO. *In vivo*, s-nitrozoglutacion (GSNO) brzo reaguje sa superoksidom dajući glutacion disulfide i

ekvimolarne količine nitrita i nitrata. Superoksid može biti fiziološki modulator reakcija S-nitrozilacije putem direktnog izazivanja razgradnje S-nitrozotiola (214,220,300). NO zavisna S-nitrozacija tiol nosećih peptida i proteina dovodi do nastanka S-nitrozotiola. Njihova sinteza se dovodi u vezu sa mnogobrojnim fiziološkim funkcijama. Ključni su intermedijeri u aktivnosti većine nitrovazodilatatornih jedinjenja kao što su SNP, nitriti i nitrati. Stamler i saradnici pretpostavljaju da S-nitrozoderivati hemoglobina mogu regulisati vaskularni tonus i tkivnu oksigenaciju putem prenosa NO između različitih pulova tiola. Dalje, S-nitrozo proteini kao što je nitrozo forma malog GTP-vezujućeg proteina p21ras je važna u signalnoj transdukciji (214,220).

Mehanizmi kojima S-nitrozotoli modiliraju svoju aktivnost pripisuju se transnitrozionim reakcijama između različitih pulova tiol-nosećih peptida i proteina ili cepanjem S-NO veza što dovodi do otpuštanja slobodnog NO. Poznato je da glutation (GSH) stimuliše dekompoziciju S-nitrozotiola putem redukcije Cu^{2+} do Cu^{1+} (301). Bakar vezan za protein pojačava dekompoziciju S-nitrozotiola, što vodi do pretpostavke da Cu,Zn-SOD, zajedno sa redukujućim agensom kao što je GSH, može direktno uticati na razgradnju većine S-nitrozotiola (302).

S-nitrozo jedinjenja su bitna kao izvor NO (donori), ali i kao učesnici u skladištenju, transportu i metabolizmu NO *in vivo*. Cu,Zn-SOD može biti fiziološki katalizator za dekompoziciju S-nitrozotiola male molekulske mase kao što su GSNO i CysNO. Cu,Zn-SOD indukovana dekompozicija različitih S-nitrozotiola dovodi do produkcije slobodnog NO pri čemu je bakar $1+$ u aktivnom mestu ključan za ovu pojavu. Kada je bakar u Cu,Zn-SOD redukovan do $+1$, dekompozicija GSNO ili CysNO se dešava u odsustvu GSH, a njegova redukcija je u potpunosti inhibirana neokuproinom, Cu^{1+} helatorom.

Pretpostavlja se da se GSH (i ostali redukujući agensi) vezuju u blizini aktivnog mesta enzima i redukuju bakar vezan za SOD. Moguće je i da dolazi do direktne interakcije između GSH i bakra vezanog u enzimu putem transfera elektrona između velikih razdaljina (303).

U ovom radu je pokazano da superoksid dovodi do dekompozicije GSNO do nitrita, nitrata i GSSG, bez pratećeg otpuštanja slobodnog NO iz GSNO. Smatra se da, u fiziološkim uslovima, brza dismutacija superoksida pomoću SOD favorizuje otpuštanje slobodnog NO iz GSNO. Visoke koncentracije GSH mogu limitirati degradaciju GSNO pomoću Cu,Zn-SOD po za sada nerazjašnjenom mehanizmu koji ne podleže MM kinetici. Jedno od mogućih objašnjenja je da se frakcija NO otpuštena GSH/SOD interakcijom sa GSNO može značajno autooksidovati dajući N_2O_3 sa posledičnom nitrozilacijom viška GSH (303).

NO brzo inhibira ćelijsku respiraciju delujući reverzibilno na kompleks IV. Tokom vremena, inhibicija postaje ireverzibilna zbog vezivanja azot oksida za oksihemoglobin, a prethodi joj sniženje koncentracije intraćelijskog redukovanog glutationa. S-nitrozilacija različitih enzima azot oksidom može se desiti jedino u uslovima narušene redoks homeostaze ćelije (304).

Naši rezultati pokazuju da se u uzorcima ćelijske linije L929 vrednosti specifične i ukupne količine glutationa razlikuju. Naime, ako posmatramo specifičnu količinu po mg proteina, zapaža se pad vrednosti u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu. Taj pad je najznačajniji u grupi uzoraka tretiranih sa Mn-SOD+SNP ukazujući na najintenzivniju S-nitrozilaciju u ovoj grupi. Nasuprot tome, ukupna količina GSH + GSSG raste u sve tri grupe tretiranih uzoraka. Porast je najznačajniji u grupi uzoraka tretiranih sa Cu,Zn-SOD + SNP.

Kod kulture K562, SNP snižava specifičnu količinu ukupnog glutationa, dok u kombinaciji sa Cu,Zn-SOD odnosno Mn-SOD dovodi do povišenja koncentracije ovog ćelijskog redoks pufera. Nasuprot tome, koncentracija glutationa izražena kao ukupna pokazuje povećanje u grupi uzoraka tretiranih sa SNP, dok je u grupama pretretiranim SOD-om zapaženo značajno sniženje koncentracije.

Efekti SNP na slobodne tiolne grupe u uzorcima ćelijske linije L929 pokazuju da je njihova koncentracija povišena u odnosu na kontrolnu grupu uzoraka u svim tretiranim grupama,

kako pri rezultatima izraženim u specifičnoj, tako i u ukupnoj koncentraciji. Statistički najviša vrednost povećanja koncentracije uočava se u grupi uzoraka tretiranih sa Cu,Zn-SOD + SNP. Kod ove ćelijske linije najuočljivije je da prisustvo Mn-SOD (favorizovanje nitroksil + H₂O₂ efekata) smanjuje količinu tiolnih grupa u odnosu na Cu,Zn-SOD (favorizovanje efekata nitrozonijuma + azot oksida).

Efekat SNP na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa u uzorcima ćelijske linije K562 pokazuje da SNP snižava specifičnu koncentraciju slobodnih tiolnih grupa, dok u kombinaciji sa Cu,Zn-SOD odnosno Mn-SOD dovodi do povišenja njihove koncentracije. Nasuprot tome, koncentracija slobodnih tiolnih grupa izražena kao ukupna pokazuje značajno povećanje u grupi uzoraka tretiranih sa SNP, dok je u grupama pretretiranim SOD-om zapaženo sniženje koncentracije. Ove razlike uzrokovane su promenama u količini proteina.

Pored efekata reaktivnih vrsta, u našim eksperimentima imamo i mogućnost endocitoze CuZn-SOD i Mn-SOD. Spečifični efekti vezani za kulturu ćelija i uticaj antioksidativnih enzima i antioksidativnog i redoks statusa na homeostazu biće razmotreni u sledećem delu diskusije.

Kultura ćelija kao sistem sa kontrolisanim uslovima predstavlja pogodan model za izučavanje elementarnih procesa rasta, razvoja i deobe ćelija, kao i biohemijskih i populacionih fenomena. Ćelije u kulturi zadržavaju mnoge osobine tkiva od kojeg su potekle, međutim, stiču i neke specifičnosti vezane za gajenje *in vitro*. Zbog rasta u sudovima za kulturu, one uglavnom opstaju u jednoslojnoj ("monolayer") grupaciji ćelija. Za razliku od tumorskog tkiva u organizmu, koje je stalno izloženo varijacijama u nivou kiseonika, ćelijske linije u *in vitro* uslovima neprekidno su eksponirane podjednakom (visokom) nivou kiseonika i nemaju komunikaciju sa drugim tipovima ćelija. Oksidacioni stres u kulturi ćelija može uticati na adaptaciju u pogledu antioksidacionog statusa (1,60).

Ćelije koje započinju neoplastičnu transformaciju prolaze kroz niz izmena u metabolizmu. Jedna od univerzalnih izmena za sve maligne ćelije je defekt u metabolizmu glukoze (3). Ćelije tumora imaju povišen nivo glikolize u kombinaciji sa sniženom respiracijom (4). Ove promene u metabolizmu su praćene povišenim oksidativnim stresom poreklom od superoksida nastalog u mitohondrijama (8). Prvi podaci o mogućoj ulozi superoksida u malignoj transformaciji ćelija nalaze se u radu Michelsona iz 1974 (294). Od tog vremena pokazana je uloga i drugih reaktivnih vrsta nastalih iz molekulskog kiseonika (ROS) u mnogim vrstama maligniteta.

Oksidovano stanje u ćeliji pogoduje imortalizaciji, stimuliše proliferaciju i podržava razvoj malignog fenotipa (3). Pro-oksidanti stimulišu ćelijsku proliferaciju, mutacije i genomsku nestabilnost, dok antioksidanti inhibiraju ove procese (2).

Superoksid dismutaze (SODs), katalaza (CAT) i glutation peroksidaze (GSH-Px) čine prvu liniju odbrane od ROS. SOD su esencijalni enzimi koji eliminišu superoksid radikal i tako štite ćelije od oštećenja indukovano ROS-om. Aktivna produkcija superoksida i niska aktivnost SOD može učiniti ćelije kancera veoma zavisnim od SOD u preživljavanju i osetljivim na inhibiciju SOD. Inhibicija ovog enzima izaziva akumulaciju ćelijskog superoksida, otpuštanje citohroma iz mitohondrija i apoptozu malignih ćelija (270,305).

Superoksid dismutaza koja sadrži mangan lako može da se indukuje u uslovima povećane količine ROS, a sintetiše se u citosolu i post-translatorno modifikovana transportuje se u mitohondrije (297,303). Povećana aktivnost Mn-SOD predstavlja faktor preživljavanja koji je neophodan da bi se očuvao integritet ćelija izloženih nepovoljnim uslovima sredine (295). Pokazano je da povećana aktivnost Mn-SOD štiti kardiomiocite od štetnih efekata adrijamicina najverovatnije uklanjajući štetne reaktivne vrste nastale tokom njegovog metabolizma (295).

Mn-SOD verovatno ima značajnu ulogu u oksidativnoj odbrani i apoptozu brzorastućih malignih ćelija (306). Njegova aktivnost može biti indukovana citokinima, oksidantima,

hiperoksijom ili citotoksičnim supstancama (295,307). Uticaj Mn-SOD na rast, proliferaciju, invaziju i otpornost *in vitro* ispitivan je dodavanjem ovog antioksidanta tumorskim ćelijama (308-311). Mnogi eksperimentalni modeli i studije na ćelijskim linijama doveli su do zaključka da Mn-SOD ima antiproliferativni efekat i tumor-supresivne karakteristike sugerišući potencijalne inhibitorne efekte ovog antioksidanta na rast i otpornost ćelija kancera (312). Klonovi kultivisanih ćelija humanih fibroblasta kojima je dodat Mn-SOD imaju snižen rast, smanjenu sposobnost prilepljivanja za podlogu i viši nivo morfološke diferencijacije u odnosu na kontrolne ćelije (313). Postoje i studije sa suprotnim zaključcima, ali se one uglavnom odnose na eksperimentalne uslove u kojima je modulirano više od jednog faktora. U eksperimentu u kome je izvršena overekspresija Mn-SOD na HeLa ćelijama došlo je do zaštite od usporenog rasta izazvanog deprivacijom seruma, za šta se smatra da je u vezi sa promenama u intraćelijskim oksidativnim procesima (314). Ovi rezultati zadiru u kompleksnost karcinogeneze i značaj balansa multiplih mehanizama regulacije oksidativnog stresa u nastanku tumora.

Objavljeni rezultati u vezi nivoa SOD i tumorske ćelijske invazije nisu konzistentni. Prema jednom istraživanju, rekombinantna SOD dovodi do širenja metastaza karcinoma kolona u eksperimentalnih miševa (315), dok je u drugom eksperimentu na mišijem modelu rekombinantna SOD dovela do redukcije metastaza pulmonarnog fibrosarkoma (316). Redukcija Cu,Zn-SOD korišćenjem antisens Cu,Zn-SOD izaziva veću pokretljivost ćelija sarkoma u kulturi (317). Takođe, kombinacija Cu,Zn-SOD sa hemoterapeutskim agensima kao što je adriamicin ima značajan antimetastatski efekat na model mišijeg sarkoma, dovodeći do zaključka da ovaj antioksidant poseduje terapijski potencijal u tretmanu metastaza (318). Transfekcija Ec-SOD u fibroblaste suprimira metastaze u plućno tkivo (193). *In vitro* ispitivanja malignih ćelija generalno pokazuju da upregulacija SOD suprimira maligni fenotip. Nivo mRNK Cu,Zn-SOD je povišen u radijaciji i dejstvom hemikalija u kultivisanim ćelijama (133-135), sugerišući potencijalne efekte ovog antioksidanta na rast i otpornost ćelija kancera.

Publikovane studije koje se bave uporedo SOD i malignom ćelijom pokazuju signifikantnu varijabilnost rezultata. Većina humanih tumora iskazuje ekspresiju visokih vrednosti SOD, što je najčešće u vezi sa agresivnim karakteristikama tumora. U manjem broju studija ističe se niska aktivnost SOD u tumorskim ćelijama.

Overekspresija Mn-SOD u ćelijama i tkivima izaziva povišenu otpornost na radijaciju, lekove i oksidante. Protektivna uloga Mn-SOD potvrđena je *in vivo* i *in vitro* i na animalnom i na modelu ćelijske kulture (319,320). Međutim, čak i u eksperimentima gde je transfekcija Mn-SOD dovela do povišene otpornosti ćelija kancera na različite stresne stimuluse, krajnji efekat može biti ćelijski specifičan i zavisiti od faktora okruženja i od balansa antioksidativnih enzima u ćeliji (321). U eksperimentima na ćelijama fibrosarkoma pokazano je da transfekcija sa Mn-SOD dovodi do sniženja radiosenzitivnosti u kulturi (321). Nasuprot tome, petostruko povišena ekspresija Mn-SOD bez promena u drugim antioksidativnim enzimima čini ćelije glioma osetljivijim na zračenje, posebno u uslovima oksidativnog stresa (322). Leukemijske ćelijske linije imaju nisku bazalnu ekspresiju Mn-SOD (315,323).

Cu,Zn-SOD deficitne ćelije su mnogo osetljivije na kiseonično oštećenje od Mn-SOD deficitnih ćelija i SOD komplementizacija u citosolu ne može kompenzovati gubitak SOD u mitohondrijama (324).

Dakle, većina istraživanja potvrđuje da povišenje nivoa SOD inhibira invazivnost tumora i njegov rast, dok sniženje SOD dovodi do suprotnih efekata. Međutim, manji broj istraživanja daje potpuno različite rezultate. Za to postoje dva moguća objašnjenja: 1. Postoje inherentne razlike među malignim ćelijama/tumorima koje dovode do toga da iste izmene redoks statusa dovode do različitih efekata; 2. Promene u nivou jedne od superoksid dismutaza ne moraju uvek prethoditi izmenama u ćelijskom redoks statusu.

U dinamičnom procesu održanja homeostaze višćelijski organizmi zavise od vrlo kompleksne mreže ekstracelularnih i intracelularnih signala putem koje usklađuju međćelijsku signalizaciju. Sve je više eksperimentalnih dokaza koji ukazuju da reaktivne vrste nastale iz molekuskog kiseonika nisu samo oštećujući sporedni produkti aerobnog metabolizma već takode i esencijalni učesnici u prenosu signala i regulaciji ćelijskog metabolizma.

Ukupni redoks status je generalno prihvaćen kao glavni faktor u regulaciji funkcije kako normalne, tako i maligne ćelije.

Malo povećanje redoks potencijala prema oksidaciji može značajno povećati proliferativni kapacitet malignih ćelija (1).

Generalno, ćelijsko redoks stanje ima značajan uticaj na kontrolu preživljavanja, apoptoze i ekspresiju tumor supresornih gena (2). Oksidovano stanje u ćeliji pogoduje nastanku tumora, dok redukovano redoks okruženje povišava intenzitet apoptoze.

ROS i RNS izazivaju promene u ćelijskom redoks statusu aktivirajući multiple signalne obrasce, učestvuju u regulaciji ćelijskog rasta i smrti i indukuju sintezu zaštitnih proteina u normalnim i malignim ćelijama (2). Većina mutacija bitna za aktivaciju onkogeni uključuje redoks-senzitivna regulatorna mesta, što dovodi do gubitka normalne redoks kontrole ćelijskog rasta i razvoja (3,6,7).

Povećana aktivnost Mn-SOD povišava produkciju unutarćelijskog vodonik peroksida. Akumulacija superoksida se sprečava njegovim konvertovanjem u peroksid procesom koji je katalisan superoksid dismutazom (295).

Pokazano je da je samo unutarćelijski vodonik peroksid uključen u direktnu modulaciju aktivnosti redoks senzitivnog transkripcionog faktora NFκB. Takođe, u ćelijama sa viškom Mn-SOD povišava se i aktivnost glutation-proksidaze kao kompenzacija na povišen nivo vodonik peroksida (295).

Mnogobrojne studije registruju povišen nivo oksidativnog stresa i narušenu redoks homeostazu u ćelijama koje stupaju u apoptozu. Mitohondrije su glavni intraćelijski izvor ROS i verovatno igraju važnu ulogu u apoptozu. Promene koje se dešavaju u mitohondrijama preapoptotskih manifestacija u jedru uključuju izmenu energije i redoks stanja, narušavanje mitohondrijalnog transmembranskog potencijala, permeabilnosti i otpuštanje citohroma c. Skupljači radikala, tiol redukujuci agensi i ciklosporin A blokiraju mitohondrijalnu permeabilnost i apoptozu (1).

Donori NO mogu indukovati, a inhibitori NO sintetaze sprečiti apoptozu u velikom broju ćelija u kulturi uključujući i neurone. Sniženje kiseoničnih intermedijera u mitohondrijama u prisustvu NO može imati protektivni efekat protiv TNF-alfa plus aktinomycin D - indukovane apoptoze (292,297).

Superoksid radikali igraju ključnu ulogu u neuronalnoj apoptozu izazvanoj dejstvom SNP. SNP izaziva pad mitohondrijalnog transmembranskog potencijala (16,293).

Može se zaključiti da manipulacija ćelijskim redoks balansom pomoću prooksidanata/antikosidanata u kulturi ima multiple efekte na ćelijsku proliferaciju i preživljavanje. Pritom, efekti u najvećoj meri zavise od vrste ćelija i njihovih malignih karakteristika. Glavni efekti podrazumevaju sniženje nivoa proliferacije i bolju diferencijaciju malignih ćelija tretiranih Mn-SOD-om.

Podaci u ovom radu su u skladu sa najmanje dva mehanizma prema kojima povišen nivo Mn-SOD može sprečiti membransku lipidnu peroksidaciju. Jedan se odnosi na sniženje produkcije peroksinitrita, a drugi na uklanjanje viška vodonik peroksida povišenom aktivnošću GSH-Px. (325).

Zbog navedenih podataka odlučili smo da u našim eksperimentima koncentrišemo pažnju na signalne molekule koji mogu inicirati sve navedene promene.

6. Zaključci

- U našim eksperimentima, korišćenjem donora NO - natrijum nitroprusida (SNP) i dve vrste superoksid dismutaza, Cu,Zn-SOD i Mn-SOD, stvorili smo uslove generisanja više vrsta signalnih molekula i ispitali odgovor transformisanih (L929) i malignih (K562) ćelija na njih.
- Praćenje broja L929 ćelija DET testom pokazalo je stabilan rast u kontrolnoj grupi i stimulaciju ćelijske deobe u grupi sa dodatim SNP najniže koncentracije. Koncentracija natrijum-nitroprusida od 2mM dovela je do sniženja broja ćelija za 40% nakon prva tri časa inkubacije. Rezultati SRB testa pokazuju da SNP, kao brzi donor NO svoje efekte iskazuje već u prvom satu inkubacije sa L929 ćelijama. Pritom, koncentracija od 2mM u toj vremenskoj tački eksperimenta daje traženi efekat od 60-70% preživelih ćelija, odnosno citotoksičnost od 35%. MTT test je dao vrlo slične rezultate u praćenju citotoksičnosti različitih koncentracija SNP na istim uzorcima. I u ovom eksperimentu rezultati pokazuju da je za traženi efekat potrebna koncentracija od 2mM SNP inkubiranog sa uzorcima ćelija 1h.
- Broj K562 ćelija u DET testu pokazuje identičan trend stabilnog rasta u kontrolnoj i u grupi sa najnižom koncentracijom dodatog SNP. SNP koncentracije od 2mM doveo je do sniženja broja ćelija za 36%, odnosno procenat preživelih ćelija bio je 64 nakon isteka prva tri časa inkubacije. SRB test je pokazao da koncentracija SNP od 2mM u prvom satu inkubacije ostavlja 60% preživelih ćelija. Citotoksičnost SNP praćena MTT testom iskazuje se po istom modelu kao i kod SRB testa. Pri nižim koncentracijama (0.1 i 1mM), citotoksičnost je visoka tek pri kraju eksperimenta, dok se pri višim koncentracijama (3 i 5mM) ona ispoljava već u prvom satu. Koncentracija od 2mM nakon jednog sata inkubacije sa SNP daje očekivani broj od oko 65% preživelih K562 ćelija.
- Niske vrednosti procenta citotoksičnosti pri nižim koncentracijama SNP u SRB i MTT testu, kao i podatak da oksidativni/nitrozativni stres može delovati stimulatивно na proliferaciju malignih ćelija, naveli su nas na ideju da na K562 ćelijskoj liniji izvedemo i test inkorporacije ³H timidina. Rezultati eksperimenta su pokazali da niske koncentracije SNP deluju stimulatивно na proliferaciju K562 ćelija u kulturi, dok je kod viših koncentracija situacija suprotna, odnosno uočava se dozno-zavisan negativni uticaj SNP na proliferaciju K562 ćelija. Pre-tretman ćelija K562 sa CuZn-SOD u kombinaciji sa SNP pokazuje evidentnu, ali ne i statistički značajnu stimulaciju ćelijske proliferacije u poređenju sa SNP-tretiranom grupom.
- U uzorcima linije L929 trendovi vrednosti specifične i ukupne količine glutaciona unekoliko se razlikuju. Naime, kod specifične vrednosti (količina/mg proteina) zapaža se sniženje u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu. Ta pojava je najznačajnija u grupi uzoraka tretiranih kombinacijom Mn-SOD i SNP. Nasuprot tome, ukupna količina GSH + GSSG raste u sve tri grupe tretiranih uzoraka. Povišenje je najznačajnije u grupi uzoraka tretiranih sa Cu,Zn-SOD +SNP.
- U kulturi K562, SNP snižava specifičnu količinu ukupnog glutaciona, dok u kombinaciji sa Cu,Zn-SOD odnosno Mn-SOD dovodi do povišenja koncentracije ovog ćelijskog redoks pufera. Nasuprot tome, koncentracija glutaciona izražena kao ukupna pokazuje povećanje u grupi uzoraka tretiranih sa SNP, dok je u grupama pretretiranim SOD-om zapaženo značajno sniženje koncentracije.

- U uzorcima ćelijske linije L929, koncentracija slobodnih tiolnih grupa je povišena u odnosu na kontrolnu grupu uzoraka u svim tretiranim grupama, kako pri rezultatima izraženim u specifičnoj, tako i u ukupnoj koncentraciji. Statistički najviša vrednost povećanja koncentracije uočava se u grupi uzoraka tretiranih sa CuZn-SOD + SNP. Kod ove ćelijske linije najuočljivije je da prisustvo Mn-SOD (favorizovanje nitroksil + H₂O₂ efekata) smanjuje količinu tiolnih grupa u odnosu na CuZn-SOD (favorizovanje efekata nitrozonijuma + azot oksida).
- Efekat SNP na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa u uzorcima ćelijske linije K562 pokazuje da ovaj donor NO snižava specifičnu koncentraciju slobodnih tiolnih grupa, dok u kombinaciji sa Cu,Zn-SOD odnosno Mn-SOD dovodi do povišenja njihove koncentracije. Nasuprot tome, koncentracija slobodnih tiolnih grupa izražena kao ukupna pokazuje značajno povećanje u grupi uzoraka tretiranih sa SNP, dok je u grupama pretretiranim SOD-om zapaženo sniženje koncentracije. Ove razlike koreliraju sa promenama u količini proteina.
- Rezultati naših eksperimenata pokazuju da izabrani parametri (količina slobodnih tiolnih grupa i glutaciona) mogu biti relevantni za praćenje efekata egzogenog azot oksida i njegovih redoks potomaka kod različitih, transformisanih i malignih ćelijskih linija.

7. Literatura

1. Valko M, Liebfrid, Moncol J, Cronin MT, Maur M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 29:44-84.
2. Kinnula V, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free radical Biology & Medicine* 2004; 6: 718-744.
3. Spitz DS, Sim JE, Ridnour LA, Galoforo SS, Lee YJ. Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells: a fundamental defect in metabolism? *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2000; 899: 349-362.
4. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative disease. *Science* 1983; 221:1256-1262.
5. Oberley LW, Oberley TD, Buettner GR. Cell division in normal and transformed cells: the possible role of superoxide and hydrogen peroxide 1981; *Med. Hypoth* 7: 21-42.
6. Smith CV, Jones DP, Guertner TM, Lash LH, Lauterburg BH. Contemporary issues in toxicology. Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1996; 140:1-12.
7. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 1999; 13:1169-1183.
8. Muller T., Gebel S. The cellular stress response induced by aqueous extracts of cigarette smoke is critically dependent on the intracellular glutathione concentration. *Carcinogenesis* 1998; 19:797-801.
9. Veech RL, Eggleston LV, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver. *Biochem J* 1969; 155:609-619.
10. Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulfide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acid Res* 1992; 20: 38821-38830.
11. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, Mc Manus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Invest.* 1998; 78: 893-913.
12. Brunelle JK, Chandel NS. Oxygen deprivation induced cell death: an update. *Apoptosis* 2002; 7: 475-482.
13. Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, Wahl GM. M-myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell* 2002; 9: 1031-1044.
14. Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, Fernandez DM, Glassford J, Medema RH, Man DJ, Lam EW. Hydrogen peroxide induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 2180-2188.
15. Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW, Aaronson SA. Inhibition of p21 mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J* 2002; 21: 38-47.

16. Schafer F, Buettner G. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 30: 1191-1212.
17. Moldovan L, Moldovan NI. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 395-412.
18. Hay R, Macy M, Chen TR, Mc Clintock P, Reid Y. *American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, Sixth Edition*, 1988.
19. *European Catalogue of Cell Cultures and Hybridomas, 7th Edition*, 1996/97.
20. Okamoto T, Ogiwara H, Hayashi T, Mitsui A, Kawabe T, Yodoi J. Human thioredoxin/adult Tcell leukemia-derived factor activates the enhancer binding protein of human immunodeficiency virus type1 by thiol redox control mechanism. *Int. immunol* 1992; 4: 811-819.
21. Luthman M, Holmgren A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase; purification and characterisation. *Biochemistry* 1982; 21:6628-6633.
22. Lee SR, Bar-Noy S, Kwon J, Levine RL, Stadtman TC, Rhee SG. Mammalian thioredoxin reductase; oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity. *Proc. Natl. acad Sci. USA* 2000; 97:2521-2526.
23. Torchinsky YM., *Sulphur in proteins*. Oxford UK; Pergamon, 1981.
24. Seres T, Ravichandran V, Moriguchi T, Rokutan K, Thomas JA, Johnston RB. Protein s-thiolation and dethiolation during respiratory burst in human monocytes. *J.Immunol.* 1996; 156:1973-1980.
25. Watanabe A, Tabeta K, Kosaka K. Glutathione-dependent interconversion of microheterogenous forms of glucose -6- phosphate dehydrogenase in rat liver. *J. Biochem* 1972; 72:695-701.
26. Ernest MJ, Kim KH, Regulation of rat liver glycogen synthetase. Reversible inactivation of glycogen synthetase D by sulfhydryl disulfide exchange. *J.Biol. Chem* 1973; 248:1550-1555.
27. Di Simplicio P, Cacace MG, Lusini L, Gianmerini F, Guistarnini D, Rossi R. Role of protein -SH groups in redox homeostasis - the erythrocyte as a model system. *Arch. Biochem. Biophys* 1998; 355:145-152.
28. Babior BM. NADPH oxidase an update. *Blood* 1999; 93:1464-1476.
29. Saran M. To what and does nature produce superoxide NADPH oxidase as an autocrine modifier of membrane phospholipids generating paracrine lipid messengers. *Free Radic Res* 2003; 37:1045-1059.
30. Baker MA, Lawen A. Plasma membrane NADH-oxydo-reductase system: a critical review of the structural and functional data. *Antioxid. Redox Signal* 2000; 2:197-212.
31. Berridge MV, Tan AS. Cell surface NAD(P)H-oxydase: relationship to trans-plasma membrane NADH-oxydoreductase and a potential source of circulating NADH-oxydase. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2:277-288.
32. Kerteen EA, Raines RT. Catalysis of protein folding by protein disulfide isomerase and small-molecule mimics. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5:413-424.

33. Duchen MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 2004; 53(suppl 1) S96-S102.
34. Tanaka T, Hosoi F, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Masutani H, Ueda S, Nishiyama A, Takeda S, Wada H et al. Thioredoxin 02 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J* 2002; 1695-1703.
35. Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med* 1999; 27:936-944.
36. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free radic. Biol. Med* 2000; 28:1387-1404.
37. Simons SS, Pratt WB. Glucocorticoid receptor thiols and steroid-binding activity. *Methods enzymol* 1995; 251:406-422.
38. Okamoto K, Tanaka H, Ogawa H, Makino Y, Eguchi H, Hayashi S, Yoshikawa N, Poellner L, Umesono K, Makino I. Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem* 1999; 274:10363-10371.
39. Soderhahl T, Enoksson M, Lundberg M, Holmgren A, Ottersen OP, Orrenius S, Bolocfoldi G, Cotgreave IA. Visualisation of the compartmentalization of glutathione and protein-glutathione mixed disulfides in cultured cells. *FASEB J* 2003; 17:124-126.
40. Hamilos DL, Zelarney P, Mascali JJ. Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes; direct relationship between glutathione availability and the proliferative response. *Immunopharmacology* 1989; 18:223-235.
41. Nobel CI, Kimland M, Lind B, Orrenius S, Slater AF. Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox - active copper. *J. Biol. Chem* 1995; 270:26202-26208.
42. Shaw JP, Chou IN. Elevation of intracellular glutathione content associated with mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts. *J. Cell. Physiol* 1986; 129:193-198.
43. Li N, Oberley TD. Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase - overexpressing NIH/3T3 fibroblast during the cell cycle. *J. Cell. Physiol* 1998; 177:148-160.
44. Dypbukt JM, Ancarcrona M, Burkitt M, Sjöholm A, Strom K, Orrenius S, Nikotera P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis or insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J. Biol. Chem* 1994; 269: 30553-30560.
45. Burdon RH, Rice-Evans C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun* 1989; 6:345-358.
46. Alaluf S, Muir-Howie H, Hu HL, Evans A, Green MR. Atmospheric oxygen accelerates the induction of a post-mitotic phenotype in human dermal fibroblasts: the key protective role of glutathione. *Differentiation* 2000; 66:147-155.
47. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell - free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86:147-157.
48. Richter C, Schweitzer M, Cossarizza A, Francesci C. Control of apoptosis by cellular ATP level. *FEBS Lett* 1996; 378:107-110.
49. Searle J, Kerr FJ, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct models of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu* 1982; 17:229-259.

50. Lee Y, Shacter E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J.Biol. Chem* 1999; 274: 19792-19798.
51. Lelli JL, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med* 1998; 25:694-702.
52. Eastman A. The mechanism of action of cisplatin: from adducts to apoptosis. In: Lippert B., ed. *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*. Zurich, Switzerland: Wiley-VCH. 1999; 111-134.
53. Lee YL, Galoforo SS, Sim JE, Ridnour LA, Choi J, Forman HJ, Corry PM, Spitz DR. Dominant-negative Jun N-terminal protein kinase (JNK-1) inhibits metabolic oxidative stress during glucose deprivation in a human breast carcinoma cell line. *Free Radic. Biol. Med* 2000; 28:575-584.
54. Kolb H, Kolb - Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunology Today* 1992; 13, N° 5.
55. Whitaker SJ. DNA Damage by Drugs and Radiation: What is Important and How is it Measured? *Eur J Cancer* 1992; vol 28, No1 273 - 276.
56. Tatsua O, Takaaki A, Takashi H., Hiroshi M. Oxygen radicals in influenza - induced pathogenesis and treatment with pyran polymer conjugated SOD. *Science* 1989; 244:974-976.
57. Upham BJ, Kang K-S, Cho H.-Y, Trosko JE. Hydrogen peroxide inhibits gap junctional intercellular communication in glutathione sufficient but not glutathione deficient cells. *Carcinogenesis* 1997; 18 no1 377-442.
58. Zikić, Stajn AS, Saičić ZS, Spasić MB, Milovanović SR. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. *Monografija* 2000; 1-150.
59. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
60. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*. 1999; 3rd ed. New York ,Oxford University Press Inc.
61. Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999; 13:1007-1024.
62. Keller NJ, Kindy MS, Holtsberg FW, St. Clair DK., Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce - Keller AJ, Hutchins JB., Mattson M. P. MITOCHONDRIAL MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE PREVENTS NEURAL APOTOSIS AND REDUCES BRAIN INJURY: Suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. *The Journal of Neuroscience* 1998; 18 (20):687-697.
63. Miller JK, Brezinska - Slobodzinska E. Oxidative stress, Antioxidants and Animal function. *J Dairy Sci* 1993; 76 no 9:2812-2823.
64. Kvam E, Tyrrell RM. Artificial background and induced levels of oxidative base damage in DNA from human cells, Short communication. *Carcinogenesis* 1997; 18 no 11:2281-2283.
65. Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward. *Cardiovasc Res* 2000; 47:410-418.
66. Jovanović A. Uticaj selena na antioksidativni sistem eritrocita i jetre šarana. 1993; PMF Novi Sad.

67. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 1989; 58:79-110.
68. Halliwell B. Oxidation of low-density lipoprotein: questions of initiation, propagation and the effects of antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:670S-677S.
69. Stahl W, Nicolai S, Briviba C, Broszeit G, Peters M, Martin H. - D, Sies H. Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis* 1997; 18: no1 89-92.
70. Safford SE, Oberley TD, Urano M, St Clair DK. Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Research* 1994; 54:4261- 265.
71. Scott G. Antioxidants the modern elixir. *Chem Britain* 1995; 31:879-882.
72. Nigam S, Schewe T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488:167-181.
73. Röhrdanz E, Kahl R. ALTERATIONS OF ANTIOXIDANT ENZYME EXPRESSION IN RESPONSE TO HYDROGEN PEROXIDE. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; 24:27-38.
74. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.
75. Ewing JF, Janero DR. Microplate Superoxide Dismutase Assay Employing a Nonenzymatic Superoxide Generator. *Analytical Biochemistry* 1995; 253:243-248.
76. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153:83-104.
77. Jung K, Henke W. Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radical Biology & Medicine* 1996; 20:N° 4, 613-617.
78. Allen RG. Oxygen - Reactive Species and Antioxidant Responses during Development: The Metabolic Paradox of Cellular Differentiation. *P.S.E.B.M* 1991; 196.
79. Salo D, Lin SW, Pacifici RE, Davies KJA. Superoxide Dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine* 1988; 5:335-339.
80. Touati D, Spencer BF. Elevated Mutagenesis in Bacteria Lacking SOD. *Methods in Enzymology* 1999; 186 Academic Press. Inc.
81. Semrau F, Kuhl JR., Ritter S, Ritter K. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) and Autoantibodies Against MnSOD in Acute Viral Infections. *Journal of Medical Virology* 1998; 55:161-167.
82. Macmillan-Crow LA & Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res* 2001; 34: 325-336.
83. Radi R, Rodriguez M, Castro L, & Telleri R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys* 1994; 308:89-95.
84. Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, & Richter C. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J. Biol. Chem* 1999; 274: 31185-31188.
85. Stankov K, Kovačević Z. Oxidative stress and glutathione - associated antioxidative systems in malignant cells. *Archive of Oncology* 1993; 6(3):109-13.

86. Uhlig S, Wendel A. The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sciences* 1992; 51:1083-1094.
87. Marinho HS, Antunes F, Pinto RE. Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase levels in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free Rad Biol Med* 1997; 22:871-883.
88. Jovanović M. *Zaštita ljudi od jonizujućeg zračenja hemijskim sredstvima*, Vojnoizdavački i novinski centar Beograd, 1987.
89. Mc Vean M, Liebler DC. Inhibition of UV B induced DNA photodamage in mouse epidermis by topically applied α - tocopherol. *Carcinogenesis* 1997; 8:1617-1622.
90. Volm M, Stammer G. Expression of heat shock proteins, glutathione peroxidase and catalase in childhood acute lymphoblastic leukemia and nephroblastoma. *Cancer Letters* 1996; 99:35-42.
91. Chow KC. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 1994; 11:215-232.
92. Karin B, Kenneth J. Vitamins A and E: Further Clues for Prostate Cancer Prevention. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90, N^o 6.
93. Sweetman SF, Strain JJ, McKelvey - Martin VJ. Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and repair in human lymphoblastoid cells. *Nutr Cancer* 1997; 27(2):122-30.
94. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res* 1998; 65:1-21.
95. Furchgott MH, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
96. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235:437-476.
97. Chen Z, Zhang J, & Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 8306-8311.
98. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxy nitrite. *Free Rad Biol Med* 1998; 25:385-391.
99. Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Guissani A. EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 1993; 7:1124-1134.
100. Fukuto JM. Chemistry of nitric oxide. Biologically relevant aspects. IN: Ignarro L, Murad F. *Nitric oxide: biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications*. Academic press. Inc Adv pharmacol, 34:1-15, 1995.
101. Wink DA & Feelisch M. Formation and Detection of Nitroxyl and Nitrous Oxide. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 403-412. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
102. Eiserich JP, Patel RP, & O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med* 1998; 19:221-357.
103. Moncada S, Palmer RM, & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev* 1992; 43:109-142.

104. McAndrew J, Patel RP., Jo H, Cornwell T, Lincoln T, Moellering D, White CR., Matalon S, & Darley-Usmar V. The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. *Semin. Perinatol* 1997; 21:351-366.
105. Fukuto JM. and Mayer B. The enzymology of nitric oxide synthase. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 147-160. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
106. Alderton WK, Cooper CE, & Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J* 2001; 357:593-615.
107. Abu-Soud HM, Ichimori K, Presta A, & Stuehr DJ. Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem* 2001; 275:17349-17357.
108. Adak S, Wang Q, & Stuehr DJ. Molecular basis for hyperactivity in tryptophan 409 mutants of neuronal NO synthase. *J. Biol. Chem* 2001; 275:17434-17439.
109. Sagami I, Sato Y, Noguchi T, Miyajima M, Rozhkova E, Daff S, & Shimizu T. Electron transfer in nitric-oxide synthase. *Coord. Chem. Rev* 2002; 226:179-186.
110. Xia Y. & Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:6954-6958.
111. McKnight GM, Smith LM, Drummond RS, Duncan CW, Golden M, & Benjamin N. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut* 1997; 40:211-214.
112. Zweier JL, Wang P, Samouilov A, & Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat. Med* 1995; 1:804-809.
113. Lancaster JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1994; 91:8137-8141.
114. Chen B, Keshive M, & Deen WM. Diffusion and reaction of nitric oxide in suspension cell cultures. *Biophys* 1998; 75: 745-754.
115. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide. Insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 1998; 25:434-456.
116. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Rad Biol Med* 2002; 33:1440-1450.
117. Radi R. Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem. Res. Toxicol* 1996; 9:828-835.
118. Wink DA, & Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med* 1998; 25: 434-456.
119. Traylor T, & Sharma VS. Why NO? *Biochemistry* 1998; 31:2847-2849.
120. Brown GC. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem* 1995; 232:188-191.
121. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 1990; 30:535-560.

122. Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H, & Pfeilschifter J. Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J. Exp. Biol* 1999; 202:645-653.
123. Lincoln TM, Komalavilas P, Boerth NJ, MacMillan-Crow LA, Cornwell TL. cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. In: Ignarro L, Murad F. eds. Nitric oxide. Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications. Acad Press. Inc Adv pharmacol, 34:305-322, 1995.
124. McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cGMP signaling. In: Ignarro L, Murad F eds. Nitric oxide. Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications. Acad Press. Inc Adv pharmacol, 34:333-329, 1995.
125. Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, & Nims RW. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch. Biochem. Biophys* 1995; 300:115-123.
126. Stadler J, Trockfeld J, Schmalix WA, Brill T, Siewert JR, Greim H, & Doehmer J. Inhibition of cytochromes. 1994.
127. Cassina A. & Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys* 1996; 328:309-316.
128. Sharma VS, Traylor TG, Gardiner R, & Mizukami H. Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin. *Biochemistry* 1987; 26:3837-3843.
129. Kelm M, Yoshida K. Metabolic fate of nitric oxide and related N-oxides. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler J.S.), pp. 47-58. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
130. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, & Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 380: 221-226.
131. Kanner J, Harel S, & Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys* 1991; 289:130-136.
132. Lancaster JR, Jr. & Hibbs JB, Jr. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:1223-1227.
133. Pellat C, Henry Y, & Drapier JC. IFN-gamma-activated macrophages: detection by electron paramagnetic resonance of complexes between L-arginine-derived nitric oxide and non-heme iron proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1990; 166:119-125.
134. Drapier JC, Pellat C, & Henry Y. Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages. *J. Biol. Chem* 1991; 266 10162-10167.
135. Crichton RR, & Ward RJ. Iron metabolism - new perspectives in view. *Biochemistry* 1992; 31: 1255-1264.
136. Kakhlon O, & Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Rad. Biol. Med* 2002; 33:1037-1046.
137. Petrat F, de Groot H, Sustmann R, & Rauen U. The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol. Chem* 2002; 383:489-502.

138. Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, & Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J* 1986; 235:747-54.
139. Vithayathil AJ, Ternberg JL, & Commoner B. Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis. *Nature* 1965; 207:1246-1249.
140. Henry Y, Ducrocq C, Drapier JC., Servent D, Pellat C, & Guissani A. Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur. Biophys J* 1990;20:1-15.
141. Henry YA. & Singel DJ. Metal-nitrosyl interactions in nitric oxide biology probed by electron paramagnetic resonance spectroscopy. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M and Stamler JS.), pp. 357-372. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
142. Shergill JK, Cammack R, Cooper CE, Cooper JM, Mann VM, & Schapira AH. Detection of nitrosyl complexes in human substantia nigra, in relation to Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1996; 228:298-305.
143. Singel DJ, & Lancaster JR, Jr. Electron paramagnetic resonance spectroscopy and nitric oxide biology. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M and Stamler JS.), pp. 341-356. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
144. Henry Y, Guissani A, & Ducastel B. *Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology: EPR Spectroscopy of Nitrosylated Compounds*. Springer-Verlag, Berlin, 1997.
145. Kim YM, Chung HT, Simmons RL, & Billiar TR. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem* 2003; 275:10954-10961.
146. Kagan VE, Kozlov AV, Tyurina YY, Shvedova AA, & Yalowich JC. Antioxidant mechanisms of nitric oxide against iron-catalyzed oxidative stress in cells. *Antioxid. Redox. Signal* 2001; 3:189-202.
147. Gorbunov NV, Yalowich JC, Gaddam A, Thampatty P, Ritov VB, Kisin ER, Elsayed NM, & Kagan VE. Nitric oxide prevents oxidative damage produced by tert-butyl hydroperoxide in erythroleukemia cells via nitrosylation of heme and non-heme iron. Electron paramagnetic resonance evidence. *J. Biol. Chem* 1997; 272:12328-12341.
148. Sergent O, Griffon B, Morel I, Chevanne M, Dubos MP., Cillard P, & Cillard J. Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. *Hepatology* 1997; 25:122-127.
149. Vanin AF, Huisman A, Stroes ES, Ruijter-Heijstek FC., Rabelink TJ., & van Faassen EE. Antioxidant capacity of mononitrosyl-iron-dithiocarbamate complexes: implications for NO trapping. *Free Rad. Biol. Med* 2001; 30:813-824.
150. Vanin AF. Dinitrosyl iron complexes and S-nitrosothiols are two possible forms for stabilization and transport of nitric oxide in biological systems. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63:782-793.
151. Alencar JL, Chalupsky K, Sarr M, Schini-Kerth V, Vanin AF, Stoclet JC, & Muller B. Inhibition of arterial contraction by dinitrosyl-iron complexes: critical role of the thiol ligand in determining rate of nitric oxide (NO) release and formation of releasable NO stores by S-nitrosation. *Biochem. Pharmacol* 2003; 66:2365-2374.

152. Mulsch A, Mordvintcev P, Vanin AF, & Busse R. The potent vasodilating and guanylyl cyclase activating dinitrosyl-iron(II) complex is stored in a protein-bound form in vascular tissue and is released by thiols. *FEBS Lett* 1991; 294:252-256.
153. Mulsch A. Nitrogen monoxide transport mechanisms. *Arzneimittelforschung* 1994; 44:408-411.
154. Muller B, Kleschyov AL, & Stoclet JC. Evidence for N-acetylcysteine-sensitive nitric oxide storage as dinitrosyl-iron complexes in lipopolysaccharide-treated rat aorta. *Br. J. Pharmacol* 1996; 119:1281-1285.
155. Muller B, Kleschyov AL, Alencar JL, Vanin A, & Stoclet JC. Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2002; 962:131-139.
156. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994; 78:931-936.
157. Stamler JS, Lamas S, & Fang FC. Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001; 106:675-683.
158. Broillet MC. S-nitrosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci* 1999; 55:1036-1042.
159. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, & Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso - compounds. *Nature* 1994; 364:626-632.
160. Khan S, Kayahara M, Joashi U, Mazarakis ND., Sarraf C, Edwards AD, Hughes MN, & Mehmet H. Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation. *J. Cell Sci* 1997; 110:2315-2322.
161. Kim YM, Talanian RV, & Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase -3- like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem* 1997; 272:31138-31148.
162. Mannick JB, Miao XQ, & Stamler JS. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem* 1997; 272:24125-24128.
163. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, & Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 95:7631-7636.
164. Campbell DL, Stamler JS, & Strauss HC. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J. Gen. Physiol* 1996; 108:277-293.
165. Hu H, Chiamvimonvat N, Yamagishi T, & Marban E. Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ. Res* 1997; 81:742-752.
166. Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, & Tauras JM. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J. Biol. Chem* 1996; 271:19705-19709.
167. Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H, & Pfeilschifter J. Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J. Exp. Biol* 1999; 202:645-653.
168. Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J, & Stamler JS. Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 1996; 86:719-729.

169. Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, Nagahiro Y, Shimizu K, Umegae N, Hayase N, Shiono H, & Kobayashi S. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol* 2000; 47:524-527.
170. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a patho-physiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys* 1998; 356:1-11.
171. Ara J, Przedborski S, Naini AB, Jackson-Lewis V, Trifiletti RR, Horwitz J, & Ischiropoulos H. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95:7659-7663.
172. Gow AJ, Chen Q, Gole M, Themistocleous M, Lee VM, & Ischiropoulos H. Two distinct mechanisms of nitric oxide-mediated neuronal cell death show thiol dependency. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 1998; 278:C1099-C1107.
173. Kong SK, Yim MB, Stadtman ER., & Chock PB. Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:3377-3382.
174. Mallozzi C, Di Stasi AM, & Minetti M. Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3. *FASEB J* 1997; 11:1281-1290.
175. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, & Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys* 1992; 298:431-437.
176. Van der Vliet, Eiserich JP, Halliwell B, & Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J. Biol. Chem* 1997; 272:7617-7625.
177. Bagasra O, Michaels FH, Zheng YM, Bobroski LE, Spitsin SV, Fu ZF, Tawadros R, & Koprowski H. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:12041-12045.
178. Van der Veen RC, Hinton DR, Incardonna F, & Hofman FM. Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation. *J. Neuroimmunol* 1997; 77:1-7.
179. Hazen SL & Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest* 1997; 99:2075-2081.
180. Folkes LK, Candeias LP, & Wardman P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch. Biochem. Biophys* 1995; 323:120-126.
181. Niketić V, Stojanović S, & Spasić M. Regulation of cell processes by reactive oxygen and nitric oxide species – mechanisms of reactions. *Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* 1998; 34:463-477.
182. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, & Darley-Usmar VM. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1411:385-400.

183. McCleverty JA. Reactions of nitric oxide coordinated to transition metals. *Chem. Rev* 1979; 79:53-76.
184. Ford H, Watkins S, Reblock K, & Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg* 1997; 32:275-282.
185. Wink DA & Ford PC. Nitric oxide reactions important to biological systems: a survey of some kinetics investigations. *Methods* 1997; 7:14-20.
186. Wink DA, Nims RW, Darbyshire JF, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, Laval F, Laval J, Cook JA, & Krishna MC. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem. Res. Toxicol* 1994; 7:519-525.
187. Goldstein S & Czapski G. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution in absence and presence of various reductants. The nature of the oxidizing intermediates. *J. Am. Chem. Soc* 1995; 117:12078-12088.
188. Pfeiffer S, Lass A, Schmidt K, & Mayer B. Protein tyrosine nitration in cytokine-activated murine macrophages. Involvement of a peroxidase/nitrite pathway rather than peroxynitrite. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 4051-34058.
189. Huie RE & Padmaja S The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun* 1993; 18:195-199.
190. Fukuto JM. and Mayer B. The enzymology of nitric oxide synthase. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler JS.), pp. 147-160. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
191. Tyler DD. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J* 1975; 147:493-504.
192. Nikano M, Kimura H, Hara M, Kuroiwa M, Kato M, Totsune K, & Yoshikawa TA. A highly sensitive method for determining for Mn- and Cu-Zn superoxide dismutase activities in tissue and blood cells. *Anal. Biochem* 1990; 187:277-280.
193. Lancaster JR, Jr. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1994; 91: 8137-8141.
194. Bartberger MD, Fukuto JM, & Houk KN. On the acidity and reactivity of HNO in aqueous solution and biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98:2194-2198.
195. Stamler JS, Singel DJ, & Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1898-1902.
196. Hughes MN. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1411:263-272.
197. Fukuto JM, Wallace G.C, Hsieh R, & Chaudhuri G. Chemical oxidation of N-hydroxyguanidine compounds. Release of nitric oxide, nitroxyl and possible relationship to the mechanism of biological nitric oxide generation. *Biochem. Pharmacol* 1992; 43:607-613.
198. Tatarko M & Bumpus JA. Further studies on the inactivation by sodium azide of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys* 1997; 339: 200-209.

199. Sharpe MA & Cooper CE. Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem. J* 1998; 332:9-19.
200. Wade RS & Castro CE. Redox reactivity of iron(III) porphyrins and heme proteins with nitric oxide. Nitrosyl transfer to carbon, oxygen, nitrogen, and sulfur. *Chem. Res. Toxicol* 1990; 3:289-291.
201. Feelisch M & Stamler JS. Donors of nitrogen oxides. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler JS.), pp. 71-115. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
202. McDonald CC, Philips WD, & Mower HF. An electron spin resonance study of some complexes of iron, nitric oxide, and anionic ligands. *J. Am. Chem. Soc* 1965; 87:3319.
203. Woolum JC, Tiezzi E, & Commoner B. Electron spin resonance of iron-nitric oxide complexes with amino acids, peptides and proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1968; 160:311-320.
204. Vanin AF, Stukan RA, & Manukhina EB. Physical properties of dinitrosyl iron complexes with thiol- containing ligands in relation with their vasodilator activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1295:5-12.
205. Vanin AF, Malenkova IV, & Serezhenkov VA. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies. *Nitric Oxide* 1997; 1:191-203.
206. Vanin AF, Muller B, Alencar JL, Lobysheva II, Nepveu F, & Stoclet JC. Evidence that intrinsic iron but not intrinsic copper determines S-nitrosocysteine decomposition in buffer solution. *Nitric Oxide* 2002; 7:194-209.
207. Pearsall KA & Bonner FT *Aqueous Nitrosyliron(II) Chemistry. 2. Kinetics and Mechanism of Nitric Oxide reduction. The Nitrosyl Complex.* *Inorg. Chem* 1982; 21:1978-1985.
208. Ridd JH. Diffusion control and preassociation in nitrosation, nitration, and halogenation. *Adv. Phys. Org. Chem* 1979; 16:1-33.
209. Keefer LK & Williams DLH. Detection of nitric oxide via its derived nitrosation products. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler JS.), pp. 509-519. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
210. Boese M, Mordvintcev PI, Vanin AF, Busse R, & Mulsch A. S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex. *J. Biol. Chem* 1995; 270:29244-2929.
211. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, & Byrns RE. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:8103-8107.
212. Mirvish SS, Williamson J, Babcook D, & Chen SC. Mutagenicity of iso-butyl nitrite vapor in the Ames test and some relevant chemical properties, including the reaction of iso-butyl nitrite with phosphate. *Environ. Mol. Mutagen* 1993; 21:247-252.
213. Dahn H, Loewe L, Lüscher E, & Menasse R. Über die oxydation von ascorbinsäure durch salpetrige säure. Teil I: Stöchiometrie und kinetische messtechnik. *Helv. Chim. Acta* 1960; 43:287-293.

214. Arnelle DR. & Stamler JS. NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys* 1995; 318:279-285.
215. Lijinsky W. *Chemistry and biology of N-nitroso compounds*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
216. Ridd JH. Nitrosation, diazotisation, and deamination. *Q. Rev* 1961; 15:418-441.
217. Hecht SS, Carmella SG, Foiles PG, & Murphy SE. Biomarkers for human uptake and metabolic activation of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Res* 1994; 54:1912s-1917s.
218. Eritja R., Horowitz DM, Walker PA, Ziehler-Martin JP, Boosalis MS, Goodman MF, Itakura K., & Kaplan BE. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 2'-deoxynebularine and 2'-deoxyxanthosine. *Nucleic Acids Res* 1986; 14:8135-8153207.
219. Eiserich JP, Butler J, van d, V, Cross CE, & Halliwell B. Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals. *Biochem. J* 1995; 310:745-749.
220. Arnelle L & Stamler J Detection of hydroxylamine. In *Methods in nitric oxide research* (ed. Feelisch M. and Stamler JS.), pp. 541-552. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
221. Nelli S, Hillen M, Buyukafsar K, & Martin W. Oxidation of nitroxyl anion to nitric oxide by copper ions. *Br. J. Pharmacol* 2000; 131:356-362.
222. Sulc F, Immoos CE., Pervitsky D, & Farmer PJ. Efficient trapping of HNO by deoxymyoglobin. *J. Am. Chem. Soc* 2004; 126:1096-1101.
223. Bazylnski DA. & Hollocher TC. Metmyoglobin and methemoglobin as efficient traps for nitrosyl hydride (nitroxyl) in neutral aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc* 1985; 107: 7982-7986.
224. Beckman JS & Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol*, 1996; 271:C1424-C1437.
225. Miranda KM, Espey MG, Yamada K, Krishna M, Ludwick N, Kim S, Jourdeuil D, Grisham MB, Feelisch M, Fukuto JM, & Wink DA. Unique oxidative mechanisms for the reactive nitrogen oxide species, nitroxyl anion. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 1720-1727.
226. Booth BP, Tabrizi-Fard MA, & Fung H. Calcitonin gene-related peptide-dependent vascular relaxation of rat aorta. An additional mechanism for nitroglycerin. *Biochem. Pharmacol* 2001; 59:1603-1609.
227. Paolucci N, Saavedra WF, Miranda KM, Martignani C, Isoda T, Hare JM, Espey MG, Fukuto JM, Feelisch M, Wink DA, & Kass DA. Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98:10463-10468.
228. Feelisch M. Nitroxyl gets to the heart of the matter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100:4978-4980.
229. Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters. *Pharm. Res* 1989; 6:651-659.
230. Moncada S, Palmer RM., & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev* 1991; 43:109-142.

231. Culotta E & Koshland DE, Jr. NO news is good news. *Science* 1992; 258: 1862-1865.
232. Loscalzo J & Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog. Cardiovasc. Dis* 1995; 38:87-104.
233. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest* 1997; 100:417-2423.
234. Grisham MB, Granger DN, & Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Rad. Biol. Med* 1998; 25:404-433.
235. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM., Kane J, Mac Micking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, & Tweardy DJ. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J. Exp. Med* 1998; 187:917-928.
236. Palombella VJ, Conner EM, Fuseler JW, Destree A, Davis JM, Laroux FS, Wolf RE, Huang J, Brand S, Elliott PJ, Lazarus D, McCormack T, Parent L, Stein R, Adams J, & Grisham MB. Role of the proteasome and NF-kappa B in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95:15671-15676.
237. Furchgott RF & Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
238. Moncada S & Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med* 1993; 329:2002-2012.
239. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, & Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol. Life Sci* 1999; 55:1078-1087.
240. Radomski MW, Zakar T, & Salas E. Nitric oxide in platelets. *Methods Enzymol.* 1996; 269:88-107.
241. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, & Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2002; 282:1075-1079.
242. Cross AH, Misko TP, Lin RF, Hickey WF, Trotter JL, & Tilton RG. Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *J. Clin. Invest* 1994; 93:2684-2690.
243. Tilton RG, Chang K, Corbett JA, Misko TP, Currie MG, Bora NS, Kaplan HJ, & Williamson JR. Endotoxin-induced uveitis in the rat is attenuated by inhibition of nitric oxide production. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 1994; 35:3278-3288.
244. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, & Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1988; 157:87-94.
245. Cowden WB, Cullen FA, Staykova MA, & Willenborg DO. Nitric oxide is a potential down-regulating molecule in autoimmune disease: inhibition of nitric oxide production renders PVG rats highly susceptible to EAE. *J. Neuroimmunol* 1998; 88:1-8.
246. Hegardt P, Widegren B, & Sjogren HO. Nitric-oxide-dependent systemic immunosuppression in animals with progressively growing malignant gliomas. *Cell Immunol* 2000; 200:116-127.
247. Mills CD. Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J. Immunol* 1996; 146:2719-2723.

248. Van der Veen RC, Dietlin TA, Dixon GJ, & Gilmore W. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. *Cell Immunol* 2000; 199:43-49.
249. Ioannidis I, Hellinger A, Dehmlow C, Rauhen U, Erhard J, Eigler FW, & De Groot H. Evidence for increased nitric oxide production after liver transplantation in humans. *Transplantation* 1995;59:1293-1297.
250. Worrall NK, Misko TP, Sullivan PM, Hui JJ, Rodi CP, & Ferguson TB, Jr. Corticosteroids inhibit expression of inducible nitric oxide synthase during acute cardiac allograft rejection. *Transplantation* 1996; 61: 324-328.
251. Worrall NK, Lazenby WD, Misko TP, Lin TS, Rodi CP, Manning PT, Tilton RG, Williamson JR, & Ferguson TB, Jr. Modulation of in vivo alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med* 1995;181:63-70.
252. Roza AM, Cooper M, Pieper G, Hilton G, Dembny K, Lai CS, Lindholm P, Komorowski R, Felix C, Johnson C, & Adams M. NOX 100, a nitric oxide scavenger, enhances cardiac allograft survival and promotes long-term graft acceptance. *Transplantation* 2000; 69: 227-231.
253. Holscher C, McGlinchey L, Anwyl R, & Rowan MJ. 7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. *Learn. Mem* 1996; 2:267-278.
254. Holthusen H & Ding Z. Nitric oxide is not involved in vascular nociception of noxious physical stimuli in humans. *Neurosci. Lett* 1997; 227:111-114.
255. Vallance P & Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 2001; 85:342-350.
256. Katusic ZS Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2001; 281:H981-H986245.
257. Cai H. & Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res* 2000; 87:840-844.
258. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, & Hutchinson N. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81:641-650.
259. Vallance P & Moncada S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horiz* 1993; 1:77-86.
260. Rees DD. Role of nitric oxide in the vascular dysfunction of septic shock. *Biochem Soc Trans* 1995; 23: 1025-1029.
261. Barnes PJ. Nitric oxide and airway disease. *Ann. Med* 1995; 27:389-393.
262. Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, & Kolb-Bachofen V. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. *Arch. Dermatol. Res* 1998; 290:643-651.
263. Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB., & Kremsner P.G. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J. Infect. Dis* 2001; 184:330-336.
264. Vallance P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundam. Clin. Pharmacol* 2003; 17:1-10.

265. Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, & De Laet MH. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N. Engl. J. Med* 1992; 327:511-515.
266. Chung E, Curtis D, Chen G, Marsden PA, Twells R, Xu W, & Gardiner M. Genetic evidence for the neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1) as a susceptibility locus for infantile pyloric stenosis. *Am. J. Hum. Genet* 1996; 58:363-370.
267. Stewart VC & Heales SJ. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Rad. Biol. Med* 2003; 34: 287-303.
268. Schulz JB, Matthews RT, Muqit MM, Browne SE, & Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J. Neurochem* 1995; 64:936-939.
269. Nelson EJ, Connolly J, & McArthur P. Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol. Cell* 2003; 95:3-8.
270. Schulz JB, Matthews RT, & Beal MF. Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol* 1995; 8:480-486.
271. Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide. An overview. *Circ. Res* 2002; 90:21-28.
272. Hou YC, Janezuc A, Wang PG: Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Des* 1999, 15: 417-441.
273. Bates JN, Baker MT, Guerra R Jr, Harrison DG: Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem pharmacol* 1991; 42:S157-S165.
274. Feelisch M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedeberg's Arch pharmacol* 1998, 358:113-122.
275. Bauer JA, Booth BP, Fung HL. Nitric oxide donors: biochemical pharmacology and therapeutics. In: Ignarro L, Murad F, eds. *Nitric oxide: Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications*. Acad. Press. Inc Adv Pharmacol 1995; 34:361-381.
276. Rao DNR, Elguindi S, O'Brien PJ. Reductive metabolism of nitroprusside in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1990; 186:30-37.
277. Kowaluk EA, Seth P, Fung HL. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262:916-922.
278. Stamler JS, Loscalzo J. The antiplatelet effects of organic nitrates and related nitroso compounds in vitro and in vivo and their relevance to cardiovascular disorders. *J AM Coll Cardiol* 1991; 18:1529-1536.
279. Keele BB Jr, Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase from *E coli* B. A new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem* 1970; 245:6176-6181.
280. Sweetman SF, Strain JJ, McKelvey-Martin VJ. Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and repair in human lymphoblastoid cells, *Nut. Cancer* 1997; 27(2):122-30.
281. Bogdanović V. Uticaj jonizujućeg zračenja na antiosidativni sistem maligne i nemaligne ćelijske kulture, Magistarski rad, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno matematički fakultet, 2000.

282. Bogdanović G, Raletić-Savić J, Marković N. In vitro assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay. *Archive of Oncology* 1994; 2/4:181-184.
283. Shekan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S and Boyd MR. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* 1990; 13:1107-1112.
284. Mossman T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65:55-63.
285. Jakimov D, Bogdanović G, Baltić M, Turšijan S, Aleksić L, Đorđević A, Mrđanović J, Vojinović-Miloradov M. Water-Soluble fullerene C₆₀(OH)₂₄ Modulates Growth and proliferation of K562 Human Erythroleukemia Cell Line. 2002.
286. Lowry OH, Rosenbrough AL, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-7.
287. Mc Cord JM, Fridovich I. The reduction of Cytochrome C by Milk Xantine Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 1968; Vol 243; 21:5753-5760.
288. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine. *Anal. Biochem* 1980; 106:207-212.
289. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem. Biophys* 1959; 82:70-77.
290. Jones DR, Blagojević DP, Spasić MP. Uvod u molekularnu fiziologiju, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2006.
291. Rhee SG. Cell Signaling: H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science* 2006; 312. no. 5782:1882–1883.
292. Stojanović SD. Dismutacija Azot Monoksida u Biološkim i Model Sistemima: *In Vitro* Ispitivanja. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Hemijski Fakultet, Beograd, 2004.
293. Maletić SD: Efekti nitro-preparata na oksidaciono-antioksidacioni metabolizam crvenih krvnih ćelija pacova, Doktorska disertacija, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno – matematički fakultet, 2004.
294. Jones DR, Blagojević DP, Spasić MP. Once a scientist, always a scientist. A double anniversary for A. Michael Michelson in 2006: 80th birthday and 60 years in research. *Biochimie* 2006; 88:231-235.
295. Filipović MR. Ispitivanje interakcija MnSOD i MnSOD-mimetika sa azot monoksidom pod fiziološki relevantnim uslovima. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, Hemijski Fakultet, 2007.
296. Denninger JW, Marletta M. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *BBA* 1999; 1411:334-350.
297. Filipović MR, Stanić D, Raičević S, Spasić MP, Niketić V. Consequences of MnSOD interactions with nitric oxide: Nitric oxide dismutation and the generation of peroxynitrite and hydrogen peroxide. *Free Radical Research* 2007; 41(1):62-72.
298. Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Kroncke KD. Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to

- encounter nitric oxide-mediated stress. Research Group Immunobiology at the Biomedical Research Centre and Institute of Pediatrics, MED-Heinrich-Heine-University of Dusseldorf, Germany. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(7-8):773-80.
299. Slim R, Toborek M, Robertson LW, Lehmler HJ, Hennig B: Cellular Glutathione Status Modulates Polychlorinated Biphenyl-Induced Stress Response and Apoptosis in Vascular Endothelial Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2000; 166:36-42.
 300. Gaston B: Nitric oxide and thiol groups, *Biochimica et biophysica acta* 1999; 1411:323-333.
 301. Chi Wai NG, Alicja T Najbar K, Chun Guang L. Role of copper in the relaxant action of S-nitrosothiols in the rat anococcygeus muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2003; 30:(5-6), 357–361.
 302. Forman HJ, Fukuto JM, and Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C246-C256.
 303. Jourd'Heuil D, Laroux FS, Miles AL, Wink, Grisham MB. Effect of Superoxide Dismutase on the Stability of S-Nitrosothiols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999; 361:323-330.
 304. Beltrán B, Orsíl A, Clementi E and Moncada S. Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *British Journal of Pharmacology* 2000; 129:953-960.
 305. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase: a novel target for selective killing of cancer cells. *Nature* 2000; 407:390-395.
 306. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl Acad, Sci USA* 1982, 79:7634-7638.
 307. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Jansen YM, Marsh JP, Mossman BT. Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J. Biol.Chem* 1991; 266:24398-24403.
 308. Bravard A, Sabatier L, Hoffschir F, Ricoul M, Luccioni C, Dutrillaux B. SOD2; a new type of tumor-suppressor gene? *Int. J. Cancer* 1992; 51:476-480.
 309. Huang Y, Peng J, Oberley LW, Domann FE. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free, Rad. Bol. Med* 1997; 23:314-320.
 310. Huang Y, He T, Domann FE. Decreased expression of manganese superoxide dismutase in transformed cells is associated with increased cytosine methylation of the SOD2 gene. *DNA Cell. Biol* 1999; 18:643-652.
 311. Marlens F, Nicole A, Sinet PM. Lowered level of trans-latable messenger RNAs for manganese superoxide dismutase in human fibroblasts transformed by SV40. *Biochem Biophys. Res. Commun* 1985; 129:300-305.
 312. Oberley LW, Oberley TD. Role of antioxidant enzymes in the cancer phenotype. In: Clerch LB, Massaro DJ eds. *Oxygen, gene expression and cellular fraction*. Washington Dekker DC:279-308, 1997.
 313. Yan T, Oberley LW, Zhong W, St Clair DK. Manganese-containing superoxide dismutase overexpression causes phenotypic reversion in SC40-transformed human lung fibroblasts. *Cancer Res.* 1996; 56:2864-2871.

314. Palazzotti B, Pani G, Colavitti R, De Leo ME, Bedogni B, Borello S, Galleoti T. Increased growth capacity of cervical carcinoma cells over-expressing manganous superoxide dismutase. *Int. J. Cancer* 1999; 82:145-150.
315. Nonak Y, Iwagaki H, Kimura T, Fuchimoto S, Orita K. Effect of reactive oxygen intermediates on the in vitro invasive capacity of tumor cells and liver metastasis in mice. *Int. J. Cancer* 1993; 54:983-986.
316. Yoshizaki N, Mogi Y, Muramatsu H, Koike K, Kogawa K, Niitsu Y. Suppressive effect of recombinant human Cu,Zn-superoxide dismutase on lung metastasis of murine tumor cells. *Int. J. Cancer* 1994; 57:287-292.
317. Tanaka M, Kogawa K, Nishihori Y, Kuribayashi K, Nakamura K, Sakamaki S, Niitsu Y. Suppression of intracellular Cu-Zn SOD results in enhanced motility and metastasis of Meth A sarcoma cells. *Int. J. Cancer* 1997; 73:187-192.
318. Kogawa K, Muramatsu H, Tanaka M, Nishihori Y, Hagiwara S, Kuribayashi K, Nakamura. Enhanced inhibition of experimental metastasis by the combination chemotherapy of Cu,Zn SOD and adriamycin. *Clin. Exp. Metastasis*. 1999; 17:239-244.
319. Crapo JD, Tierney DF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am. J. Physiol* 1974, 226:1401-1407.
320. Tsan MF, White JE, Santana TA, Lee CY. Tracheal insufflation of tumor necrosis factor protects rats against oxygen toxicity. *J. Appl. Physiol* 1990; 68:1211-1219.
321. Urano M, Kuroda M, Reynolds R, Oberley TD, St. Clair DK. Expression of manganese superoxide dismutase reduces tumor control radiation dose: gene radiotherapy. *Cancer Res* 1995; 55:2490-2493.
322. Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, Yan T, Domann FE, St. Clair DK. Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cells. *Cell Growth* 1996; 7:1175-1186.
323. DManymaa P, Siitonen T, Guttorm T, Saily M, Kinnula V, Savolainen ER, Koistinen P. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukemia cells exposed to etoposide. *Br. J. Haematol* 2000; 108:574-581.
324. Huang TT, Yasunami M, Carlson EC, Gillespie AM, Reaume A, Hoffman EK, Chan PH, Scott RW, Epstein CJ. Superoxide-mediated Cytotoxicity in Superoxide Dismutase-Deficient Fetal Fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997; 344.
325. Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, Clair DKS, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller A, Huchkins JB and Mattson MP. Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Prevents Neural Apoptosis and Reduces Ischemic Brain injury; Suppression of peroxynitrite production, Lipid peroxidation and Mitochondrial Dysfunction. *The Journal of Neuroscience* 1998; 18(2):687-697.

Kratka biografija

Višnja Bogdanović rođena je 1969. godine u Novom Sadu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Prirodno-matematički fakultet, smer Profesor biologije - hemije, upisala je 1990., a diplomirala 1996. sa prosečnom ocenom 8.90. Iste godine zapošljava se na Institutu za onkologiju u Sremskoj Kamenici i upisuje postdiplomske studije na Departmanu za hemiju, odsek biohemija. 2000. godine sa prosečnom ocenom 10 stiče zvanje magistra hemijskih nauka i upisuje doktorske studije na istom odseku.

Autor je i koautor dva rada objavljen u međunarodnim i dva rada u časopisima od nacionalnog značaja, jednog saopštenja na nacionalnom skupu i više izvoda na međunarodnim skupovima.

Udata je i ponosna mama dve devojčice.



Novi Sad, _____.

Višnja Bogdanović

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Višnja Bogdanović
AU

Mentor: prof. dr Gordana Grubor-Lajšić
MN

Naslov rada: Redoks regulacija ćelijskog ciklusa azot-oksidiom
MR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2007.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, trg Dositeja Obradovića 2-4
MA

Fizički opis rada: Rad ima 7 poglavlja, 121 stranu, 325 lit. citata, 41 tabelu, 19 slika, 30 grafika, bez priloga.

FO

Naučna oblast: Hemija

NO

Naučna disciplina: Biohemija

ND

Ključne reči: nitrozativni stres; redoks regulacija; natrijum-nitroprusid, azot-oksidi; glutation; enzimi; maligna ćelija

PO

UDK:

Čuva se: U biblioteci Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu,
21000 Novi Sad, trg Dositeja Obradovića 2-4

Važna napomena:

VN

Izvod:

IZ

Balans redoks potencijala u živoj ćeliji predstavlja imperativ održavanja zdravog fenotipa, i u krajnjem, njenog preživljavanja. Nitrozativni stres može ozbiljno narušiti ćelijsku redoks homeostazu i, u kombinaciji sa oksidativnim stresom, uticati na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, a u nekim slučajevima i na aktivaciju maligne transformacije

U ovom radu ispitivani su efekti donora NO natrijum-nitroprusida na dve ćelijske linije u kulturi: transformisane ćelije mišijih fibroblasta (L929) i maligne ćelije humane eritroleukemije (K562). Natrijum-nitroprusid (SNP) je fotoreaktiv molekul sa veoma kratkim poluživotom koji izaziva koncentraciono - zavisnu proliferaciju ili inhibiciju ćelijskog rasta *in vitro*. NO izaziva različite efekte u zavisnosti od eksperimentalnog modela, svoje relativne koncentracije kao i okruženja u kojem nastaje. Ispitivanja mogućnosti direktne transformacije azot oksida u redoks aktivne vrste kao što su nitrozonijum katjon (NO^+) i nitroksil anjon (NO^-/HNO) i direktni efekti tih redoks potomaka u ćeliji tek su u začetku. U našim eksperimentima, korišćenjem donora NO - natrijum nitroprusida (SNP) i dve vrste superoksid dismutaza, CuZn-SOD i Mn-SOD, stvorili smo uslove generisanja više vrsta signalnih molekula i ispitali odgovor transformisanih (L929) i malignih (K562) ćelija na njih. Rezultati eksperimenata pokazuju da izabrani parametri (količina slobodnih tiolnih grupa i glutationa) mogu biti relevantni za praćenje efekata egzogenog azot oksida i njegovih redoks potomaka kod različitih, transformisanih i malignih ćelijskih linija.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:
DP

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
KO

Predsednik:

Član:

Član:

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograph type

DT

Type of record: Printed text

TR

Contents Code:

CC

Author: Višnja Bogdanović

AU

Menthor: prof .dr Gordana Grubor-Lajšić

MN

Title: Redox regulation of cell cycle through nitric-oxide

XI

Language of text: Serbian (latin)

LT

Language of abstract: English

LA

Country of publication: Republic of Serbia

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2007.

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publ. place: Novi Sad, trg Dositeja Obradovića 2-4

PP

Physical description: 7 chapters, 121 pages, 325 citations, 41 tables, 19 pictures, 30 graphics
PD

Scientific field: Chemistry
SF

Scientific discipline: Biochemistry
SD

Key words: nitrosative stress, redox regulation; sodium-nitroprusside, nitric-oxide; glutathione; enzymes; malignant cell

Holding data: Library of the University of Novi Sad, Faculty of Science, 21000 Novi Sad,
trg Dositeja Obradovića 2-4

HD Note:

Abstract:
AB

The redox potential balance in the living cell is the imperative of continuation of healthy phenotype, and subsequently of its survival. Nitrosative stress may seriously damage cell's redox homeostasis, and in combination with oxidative stress may influence cell proliferation and differentiation, in some cases even activation of malignant transformation.

This paper investigates effects of sodium nitroprusside as NO donor on two cell lines in culture: transformed cells of mice fibroblasts (L929) and malignant cells of human eritroleukemia (K562). The sodium nitroprusside (SNP) is a photo reactive molecule with very short half-life, causing concentration-dependant proliferation or inhibition of cell growth *in vitro*. The NO causes different effects depending on experimental model, its relative concentration and environment where it is formed. Investigations of possibility of direct transformation from nitrogen oxide to redox-active species as nitrosonium cation (NO^+) and nitroxyl anion (NO^-/HNO), as well as direct effects of those redox descendants within the cell are only in beginning. In our experiments, by using sodium nitroprusside (SNP) as NO donor and two kind of superoxide dismutase, CuZn-SOD and Mn-SOD, we created conditions to generate several kinds of signal molecules and investigated reaction of transformed (L929) and malignant (K562) cells to those. Results of experiments are showing the parameters chosen (amount of free thiol groups and glutathione) may be relevant in measuring the effect of exogenous nitrate oxide and its redox descendants in different, both transformed and malignant cell lines.

Accepted by the Scientific Board on:

Defended:

Thesis defend board:

Member:

Member: