

JUSTYNA GOŚCIMSKA, ALEKSANDRA AUGUSTYNIAK, ALINA BŁASZCZYK

*Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Łódzki
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
E-mail: justyna_g55@wp.pl
augustyn@biol.uni.lodz.pl
ablasz@biol.uni.lodz.pl*

NITROKSYL (HNO/NO-) – ENIGMATYCZNA CZĄSTECZKA O UNIKATOWYCH WŁAŚCIWOŚCIACH I POTENCJALE FARMAKOLOGICZNYM

WPROWADZENIE

Wykazanie endogennego powstawania tlenku azotu (NO) w organizmach ssaków, w późnych latach 80. XX w. stało się podstawą ogromnego zainteresowania różnymi jego formami. Przełomowe odkrycie roli tlenku azotu jako cząsteczki sygnałowej, rozluźniającej ściany naczyń krwionośnych, jest wynikiem prac trójki naukowców: Roberta F. Furchgotta, Ferida Murada i Luisa J. Ignarro (ZETTERSTRÖM 2009). W 1977 r. Murad, badając mechanizm działania wazodylatacyjnego nitrogliceryny zasugerował, że działanie zwiększające przepływ krwi w naczyniach krwionośnych jest wynikiem uwalniania się z jej cząsteczki tlenku azotu. Trzy lata później Furchgott stwierdził, że acetylocholina, wpływając na komórki śródbłonna naczyniowego, wywiera swoje działanie rozkurczowe na mięśnie gładkie naczyń za pomocą bliżej niezidentyfikowanej cząsteczki o charakterze przekaźnika komórkowego, nazwanej przez niego czynnikiem rozkurczowym pochodzenia śródbłonkowego EDRF (ang. endothelial derived relaxing factor). Z kolei Ignarro w 1987 r., prowadząc badania niezależnie i wspólnie z Furchgottem, doszedł do wniosku, że działanie EDRF jest tożsame z działaniem tlenkiem azotu (ZETTERSTRÖM 2009). Następstwem tych odkryć była lawina badań nad właściwościami NO oraz znaczeniem tej cząsteczki dla fizjologii komórek zwierzęcych (w tym człowieka) i roślinnych. W 1992 r. tlenek azotu został uznany przez czasopi-

smo Science molekułą roku, a trzech uczeni za wkład w rozwój badań nad tą obiecującą cząsteczką zostali w 1998 r. uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny.

Obecnie wiadomo, że znaczenie tlenku azotu dla organizmu jest wielorakie. W układzie krążenia reguluje on przede wszystkim napięcie naczyń krwionośnych, i co za tym idzie, ciśnienie tętnicze krwi, hamuje także agregację płytek i leukocytów oraz adhezję neutrofilów do powierzchni komórek śródbłonna (SOKOŁOWSKA i WŁODEK 2001). Prekursory tlenku azotu, takie jak nitrogliceryna oraz inne organiczne azotany znalazły bezpośrednie zastosowanie kliniczne w leczeniu m.in. dławicy piersiowej, nadciśnienia płucnego, niewydolności serca, fibrynolizy oraz w angioplastyce wieńcowej (SOKOŁOWSKA i WŁODEK 2001). Tlenek ten odgrywa również dużą rolę w odpowiedzi immunologicznej i zapalnej, a także posiada swój udział w funkcjonowaniu układu nerwowego i pokarmowego (KRZYŻANOWSKI i współaut. 1999).

Z uwagi na znaczenie tlenku azotu w funkcjonowaniu wielu procesów fizjologicznych oraz pozytywnego działania w licznych stanach patologicznych zaproponowano potencjalne znaczenie biologiczne także innych cząsteczek wywodzących się lub w jakiś sposób związanych z tlenkiem azotu. Szczególną uwagę przypisano tlenkom azotu na wyższych stopniach utlenienia. Wykazano

na przykład, że tlenek azotu (IV), NO_2 , jako związek relatywnie stabilny, stanowi wewnątrznaczyniowy rezerwuuar tlenu azotu w układzie krążenia, uwalniając NO^\cdot w warunkach niedotlenienia. Dla kontrastu, zredukowane formy NO^\cdot , w tym nitroksyl ($\text{HNO}/\text{NO}^\cdot$), protonowana i zredukowana cząsteczka pokrewna tlenkowi azotu, nie wzbudzały do niedawna większej uwagi. W ostatnim jednak czasie zainteresowanie nitroksylem wzrasta, co wynika w szczególności z odkryć na temat jego unikatowych właściwości chemicznych oraz istotnych aktywności biologicznych i potencjału farmakologicznego. Okazuje się, że nitroksyl oddziałuje na liczne

funkcje układu sercowo-naczyniowego, wykazując przy tym korzystne działanie w wielu stanach patologicznych, takich jak m.in. niewydolność serca, udar, dusznica bolesna, nadciśnienie tętnicze czy zawał mięśnia sercowego (IRVINE i współaut. 2008). Do pozytywnych skutków działania $\text{HNO}/\text{NO}^\cdot$ należy także dodać jego wpływ na układ nerwowy (PAOLOCCI i współaut. 2007) oraz potencjał w terapii antynowotworowej, wynikający z hamowania angiogenezy, proliferacji zmienionych rakowo komórek oraz indukowania w tych komórkach apoptozy (NORRIS i współaut. 2008).

ENDOGENNA PRODUKCJA I DETEKCYJA NITROKSYLU

Opierając się na kompleksowości działania nitroksylu oraz omówionych poniżej wyjątkowych właściwościach sygnałowych tej cząstki można by przypuszczać, iż podobnie jak tlenek azotu, jest on częścią endogennego szlaku przekazywania sygnałów oraz że może potencjalnie funkcjonować jako alternatywna dla NO^\cdot cząstka sygnałowa (FUKUTO i współaut. 2005a). Niemniej jednak należy zaznaczyć, iż, jak dotąd, nie ma jednoznacznych dowodów potwierdzających endogenną produkcję $\text{HNO}/\text{NO}^\cdot$ w organizmach ssaków (FUKUTO i współaut. 2005a). Wynika to częściowo z braku bezpośredniej, specyficznej i wystarczająco czulej metody detekcji nitroksylu, którą można by zastosować w układach biologicznych. Intensywne badania nad opracowaniem takiej metody przynoszą już jednak pierwsze pozytywne rezultaty. W ostatnim czasie opisano technikę umożliwiającą wykrywanie obecności $\text{HNO}/\text{NO}^\cdot$ w hodowanych *in vitro* komórkach, przy pomocy barwnika fluorescencyjnego BOT1 skomple-

sowanego z jonami Cu^{2+} (ROSENTHAL i LIP-PARD 2010). W mikroskopie fluorescencyjnym obserwuje się czerwoną fluorescencję komórek, w których doszło do powstania produktu reakcji między nitroksylem a kompleksem Cu^{2+} (BOT1).

Badania *in vitro* implikują możliwość i wskazują na wysokie prawdopodobieństwo spontanicznego powstawania $\text{HNO}/\text{NO}^\cdot$ w organizmie ssaków (FUKUTO i współaut. 2005a). Zaproponowano i scharakteryzowano kilka teoretycznych procesów/mechanizmów, na drodze których nitroksyl mógłby być generowany *in vivo*. Do procesów takich zalicza się m.in. reakcję S-nitrozotioili z innymi cząsteczkami tiolowymi, katalityczną aktywność syntazy tlenu azotu – NOS (ang. nitric oxide synthase), utlenianie hydroksylaminy (NH_2OH) (FLORES-SANTANA i współaut. 2009), reakcję redukcji tlenu azotu, będącą wynikiem oddziaływania na ten tlenek elementów łańcucha transportu elektronów w mitochondriach (FUKUTO i współaut. 2005b).

WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE NITROKSYLU ($\text{HNO}/\text{NO}^\cdot$)

Mimo iż nitroksyl jest prostą, trzatomową cząsteczką, jego właściwości chemiczne są zaskakująco złożone i wielowymiarowe. HNO oraz NO^\cdot są podstawowymi formami molekuł zawierających atom azotu na pierwszym stopniu utlenienia (+1). Zrozumienie równowagi między tymi dwiema cząsteczkami w środowisku jest fundamentalne w odniesieniu do zapotrzebowania komórek czy układów biologicznych na związki zawierające azot (+1) (SHAFIROVICH

i LYMAR 2002). Stała równowagi reakcji dysocjacji protonu ($\text{pK}_a = 11,4$) wskazuje, iż nitroksyl jest bardzo słabym kwasem i w pH fizjologicznym pojawia się prawie wyłącznie w postaci sprotonowanej – HNO (SHAFIROVICH i LYMAR 2002). Zasadniczą różnicą między formą HNO i NO^\cdot są stany spinowe obu cząsteczek; podstawowym stanem HNO jest stan singletowy (^1HNO), w którym wszystkie elektrony są sparowane, natomiast anion NO^\cdot posiada taką samą

Tabela 1. Stałe szybkości reakcji nitroksylu z różnymi cząstkami docelowymi (MIRANDA i współaut. 2003).

Cząsteczka docelowa	Stała szybkości reakcji k [$\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$]
Oksymyoglobin (oxyMb/MbO ₂)	1×10^7
Glutation (GSH)	2×10^6
Peroksydaza chrzanowa (HRP)	2×10^6
Metmyoglobin (metMb)	8×10^5
N-acetylocysteina (NAC)	5×10^5
Dysmutaza ponadtlenkowa	
– miedziowo-cynkowa (CuZnSOD)	10^5 – 10^6
– manganowa (MnSOD)	7×10^5
Katalaza	3×10^5
Tempol	8×10^4
Ferrytocytochrom <i>c</i>	4×10^4
Tlen (O ₂)	3×10^3

konfigurację elektronową jak tlen (O₂), dlatego jego podstawowym stanem jest stan tripletowy (dwa niesparowane elektrony na odrębnych powłokach) (³NO[•]). Fakt, iż podstawowe stany HNO i NO[•] są różne oznacza, że transfer protonu (reakcja deprotonacji HNO bądź protonacji NO[•]) wymaga zmiany stanu spinowego, co w dużym stopniu ograniczone jest prawami mechaniki kwantowej. Dlatego też proces tego typu zachodzi bardzo powoli, jeżeli w ogóle ma miejsce (PAOLOCCI i współaut. 2007).

Poza reakcją deprotonacji/protonacji o unikalnym i nietypowym charakterze, jedną z dominujących reakcji jakim ulega nitroksyl jest dimeryzacja, w konsekwencji której powstaje niestabilny kwas podazotawy (H₂N₂O₂), ulegający szybkiej dekompozycji do podtlenku azotu (N₂O) oraz wody: HNO + HNO → [HONNOH] → N₂O + H₂O (FUKUTO i współaut. 2005b). Reakcja ta zachodzi ze względnie dużą stałą szybkości w przybliżeniu wynoszącą $8 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-1}$, a jej istnienie znacząco utrudnia prace badawcze nad nitroksylem (SHAFIROVICH i LYMAR 2002).

Kinetyka reakcji HNO/NO[•] z potencjalnymi cząsteczkami docelowymi jest istotnym aspektem specyficzności przekazywania sygnałów w komórce. Biorąc pod uwagę wysoką reaktywność nitroksylu w stosunku do wielu cząstek biologicznych, aktywność w środowisku komórkowym zależy od ich stę-

żenia oraz stałych szybkości reakcji z nitroksylem (Tabela 1).

Cechą charakterystyczną nitroksylu jest jego ekstremalna tiofilowość (FUKUTO i współaut. 2005b). Może on bardzo szybko reagować z wolnymi tiolami bądź białkami zawierającymi grupy tiolowe, prowadząc do zmiany funkcji tych białek bądź wpływając na czas trwania reakcji zachodzących z ich udziałem (FUKUTO i współaut. 2009). Reakcja z tiolami jest ponadto na tyle charakterystyczna dla HNO/NO[•], że pozwala odróżnić nitroksyl od tlenku azotu (HNO jest o wiele bardziej reaktywny w stosunku do tioli niż NO[•]). Tiofilowość nitroksylu jest ważnym aspektem badań nad naturą tego związku, przede wszystkim z uwagi na obecność grup tiolowych w wielu istotnych białkach i

enzymach, uczestniczących bądź odpowiedzialnych za przebieg licznych procesów fizjologicznych w komórce. Wśród białek oraz struktur komórkowych, na których funkcje poprzez powinowactwo do tioli HNO/NO[•] oddziałuje, znajdują się m.in.: dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (LOPEZ i współaut. 2007), katepsyna B, zaangażowana w degradację lizosomalną uszkodzonych bądź niepotrzebnych komórce białek oraz prezentację antygenów (VÄÄNÄNEN i współaut. 2008), polimeraza poli(ADP-rybozy) – PARP, kluczowy enzym jądrowy wielu procesów fizjologicznych, takich jak regulacja funkcji licznych czynników transkrypcyjnych i utrzymywanie stabilności genomu, w tym inicjowanie naprawy DNA (BAI i współaut. 2001), kaspazy (białka apoptotyczne) oraz acetylotransferazy kwasów tłuszczowych, a także kanały wapniowe zawierające w swojej strukturze tiole (SWITZER i współaut. 2009). Nitroksyl wykazuje również dużą reaktywność w stosunku do metali, takich jak Fe(III), Cu(II) czy Mn(II) (FLORES-SANTANA i współaut. 2009), oddziałuje z białkami zawierającymi grupy hemowe, przy czym bardziej preferencyjnie reaguje z żelazem na trzecim stopniu utlenienia (Fe³⁺) niż żelazem dwuwarto-

ściowym (Fe^{2+}), tworząc relatywnie stabilne kompleksy (przykładem jest redukcja methemoglobiny: $\text{HNO} + \text{HbFe}^{\text{III}} \rightarrow \text{HbFe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{H}^+$). Nitroksyl reaguje również z cytoplazmatyczną dysmutazą ponadtlenkową (zawierającą miedź i cynk - CuZnSOD), w wyniku czego następuje szybka konwersja nitroksylu do tlenku azotu NO ; natomiast w reakcji z mitochondrialną manganową dysmutazą ponadtlenkową (MnSOD) NO uwalniany jest po dłuższym czasie, gdyż początkowo powstaje kompleks manganu z tlenkiem azotu (MnNO) (FLORES-SANTANA i współaut. 2009). Reakcja nitrozytacji redukcyjnej metali/metaloprotein na wyższym stopniu utlenienia (takich jak Fe(III) lub Cu(II)) jest, obok oddziaływania z tiolami, jedną z podstawowych reakcji, jakim ulega nitroksyl.

Nitroksyl oddziałuje także z tlenem, jednakże wyznaczenie stałej szybkości reakcji nitroksylu z O_2 dowiodło (Tabela 1), że interakcja ta jest stosunkowo powolna i ma prawdopodobnie niewielkie znaczenie

biologiczne *in vivo*. Niemniej jednak produktem tej reakcji jest cząsteczka o silnych właściwościach utleniających i hydroksylujących, choć nie uczestnicząca najprawdopodobniej w reakcjach rodnikowych. Produkt reakcji HNO/O_2 nie został dotychczas zidentyfikowany, wiadomo jednak, że nie jest nim nadtlenoazotyn – ONOO^\cdot (powstający w roztworach alkalicznych na skutek reakcji NO^\cdot z O_2) (FUKUTO i współaut. 2005b); jest on jednak silnie cytotoksyczny, a jego istnienie i właściwości rozważa się z uwagi m.in. na to, że po narażeniu komórek w warunkach *in vitro* na działanie nitroksylu zastosowanego w wyższych stężeniach obserwuje się indukcję pęknięć w łańcuchu DNA, a także wchodzenie komórek na drogę apoptozy i nekrozy (MIRANDA 2004). Nitroksyl wykazuje więc właściwości oksydacyjne, włączając w to utlenianie zasad azotowych w DNA oraz przede wszystkim – oksydację tioli (PAOLOCCI i współaut. 2007).

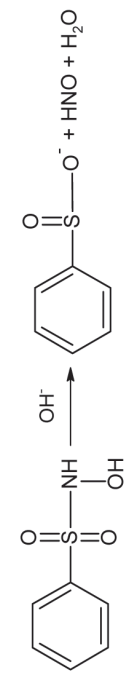
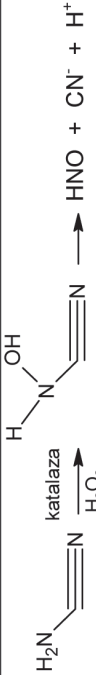
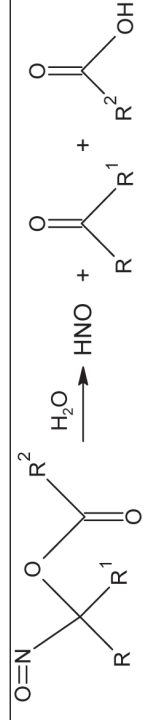
DONORY NITROKSYLU

Właściwości fizyko-chemiczne nitroksylu uniemożliwiają przechowywanie tego związku oraz bezpośrednio wykorzystanie go do badań w układach biologicznych. Ponadto wspomniana wcześniej szybka dimeryzacja do kwasu podazotowego $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$, który ulega spontanicznemu rozkładowi do podtlenku azotu (N_2O) oraz wody (H_2O), wymusza konieczność stosowania związków donorowych jako pośredniego źródła nitroksylu. Najbardziej powszechnym i jednocześnie najlepiej poznanym egzogennym źródłem nitroksylu jest azotan (II) sodu (trioksoazotan sodu, $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$), znany jako sól Angeli`ego (ang. Angeli`s salt, AS) (FUKUTO i współaut. 2008). Większość dostępnych danych na temat działania nitroksylu pochodzi z badań z użyciem tego związku, który spontanicznie generuje HNO w pH 4–8 (FUKUTO i współaut. 2008, SWITZER i współaut. 2009).

W Tabeli 2 przedstawiono najczęściej stosowane w badaniach nad właściwościami nitroksylu cząsteczki będące jego donarami. Rozwój badań nad klinicznym zastosowaniem nitroksylu wymaga niewątpliwie skonstruowania nowych związków prekursorowych, opartych na komponentach or-

ganicznych i rozpuszczalnych w wodzie. Prace nad nowymi cząsteczkami generującymi HNO/NO^\cdot prowadzone są m. in. w laboratorium prof. Kinga (West Forest University, USA) i dotyczą donorów z grupy związków α -acyloksy-C-nitrozowych (SHA i współaut. 2006). Szczególna uwaga zwracana jest na tempo uwalniania HNO/NO^\cdot w zależności od pH środowiska i na strukturę grupy acylowej związku acyloksynitrozowego, od tych właściwości bowiem zależy możliwość farmakologicznego zastosowania tych cząsteczek. W 2009 r. firma Cardioxyl Pharmaceuticals Inc. przedstawiła interesujące wyniki badań cząsteczki oznaczonej jako CXL-1020 (związek o nieujawnionej jeszcze strukturze chemicznej) przebadanej na psach z chroniczną niewydolnością serca. Podawanie dożylnie zwierzętom CXL-1020 spowodowało poprawienie funkcji lewej komory serca bez wywoływania jakichkolwiek efektów chronotropowych (przyspieszania lub zwalniania rytmu serca), powstania *de novo* zaburzeń rytmu serca, a także bez zwiększania zużycia tlenu przez mięsień sercowy (WANG i współaut. 2009). W obecnej chwili cząsteczka ta jest na etapie badań klinicznych.

Tabela 2. Zestawienie najczęściej charakteryzowanych donorów HNO/NO⁻ oraz ich właściwości (wg IRVINE'A i współprac. 2008).

Donor nitroksylu	Sposób uwalniania nitroksylu	Właściwości cząstki donorowej	Ograniczenia w zastosowaniu
Sól Angeli'ego (azotan (II) sodu) Na ₂ N ₂ O ₃	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{O}=\text{N}=\text{N}^+ \\ \\ \text{O}^- \end{array} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HNO} + \text{NO}_2^-$	Wytwarzanie HNO w zakresie pH 4-8 Czas półtrwania ~2-3 min; Uwalnianie tlenku azotu (NO ⁻) w pH < 4	Jednoczesne uwalnianie NO ₂ ⁻ Krótki czas trwania; Generowanie NO ⁻ przy wyższych stężeniach
Kwas Piloty'ego (kwas benzenosulfonohydroksamowy) (C ₆ H ₆)S(O ₂)NHOH		HNO generowany jest tylko powyżej pH fizjologicznego	Uwalnianie NO ⁻ w pH fizjologicznym; Podatność na utlenianie; Uwalnianie HNO tylko w środowisku silnie zasadowym
Cyjanamid H ₂ NCN		Bioaktywacja oksydacyjna za pośrednictwem katalazy Lek na alkoholizm	Produktom jest toksyczny cyjanek
Związki α-acyloksynitrozowe		Nitroksyl uwalniany jest po cięciu wiązania estrowego Zmienne tempo uwalniania nitroksylu	Nizszy potencjał relaksacji naczyń krwionośnych niż w przypadku soli Angeli'ego
Diazeniodiole	$[\text{RNH}-\text{N}(\text{O})=\text{NO}]^- \rightleftharpoons [\text{RN}=\text{N}(\text{O})-\text{NHO}]^- \longrightarrow \text{HNO} + \text{RNNO}^-$	Dysocjacja w pH fizjologicznym Czas półtrwania ~2.3 min; Brak uwalniania NO ₂ ⁻	W pH poniżej 7 – donory NO ⁻ Krótki czas trwania Nitrozoaminy jako koprodukty

POTENCJAŁ FARMAKOLOGICZNY NITROKSYLU

NITROKSYL A ALKOHOLIZM

Potencjał terapeutyczny nitroksylu jest już od wielu lat wykorzystywany, gdyż jeden z jego donorów, cyjanamid, stosowany jest jako lek w terapii awersyjnej u osób z przewlekłą chorobą alkoholową (DEMASTER i współaut. 1998). Terapeutyczne działanie tego czynnika zatwierdzono m.in. w Europie, Japonii oraz Kanadzie. Działanie nitroksylu w tym aspekcie opiera się na zdolności do modulowania funkcji białek tiolowych. Uwalniany z cyjanamidu nitroksyl powoduje modyfikację oksydacyjną centrum katalitycznego dehydrogenazy aldehydowej (ang. aldehyde dehydrogenase, ALDH), prowadząc tym samym do zahamowania aktywności enzymatycznej ALDH i zakłócenia prawidłowego metabolizmu alkoholu (FUKUTO i współaut. 2008). Ten podstawowy enzym metabolizujący alkohol katalizuje bowiem przekształcanie aldehydu octowego, powstającego po utlenieniu etanolu, do kwasu octowego. Hamowanie aktywności ALDH wywołuje acetaldehydemię powodującą nieprzyjemną fizjologiczną reakcję na alkohol i prowadzącą, na drodze terapii awersyjnej, do stronienia od alkoholu (MIRANDA i współaut. 2005). Kliniczne stosowanie cyjanamidu wiąże się z wywoływaniem niewielkiej toksyczności dla organizmu związanej z towarzyszącym generowaniem cyjanku (HCN) (Tabela 1), niemniej jednak występuje ona tylko po podaniu dawek przewyższających stężenia wywołujące skuteczność.

NITROKSYL A UKŁAD SERCOWO-NACZYNIOWY

Choroby układu krążenia stanowią główną przyczynę przedwczesnych zgonów we wszystkich rozwiniętych krajach świata. Ważną grupę farmaceutyków stosowanych w ich leczeniu stanowią azotany (nitraty). Działanie tych środków polega na uwalnianiu czy też poprawie biodostępności endogennie produkowanego tlenu azotu NO[•] (UFNAL i ŽERA 2010). Rola NO[•] w obwodowej regulacji układu krążenia wiąże się głównie z działaniem naczyniowo-rozkurczowym, które prowadzi do relaksacji mięśniówki naczyń krwionośnych. Ponadto tlenek azotu hamuje aktywację i agregację płytek krwi oraz proliferację komórek mięśni gładkich a także redukuje stopień oksydacji cholesterolu frakcji LDL (UFNAL i ŽERA 2010). W ostatnich latach zwraca się jednak uwagę na negatywne dzia-

łanie związków będących bezpośrednimi donorami tlenu azotu NO lub zwiększającymi jego dostępność w układzie naczyniowym. Do niekorzystnych efektów działania stosowanych donorów NO zaliczyć należy zwiększenie stresu oksydacyjnego w ścianie naczyń oraz rozwój tolerancji na ich działanie (UFNAL i ŽERA 2010). Ponadto związki te, gdy stosowane są wraz z β-adrenolitykami, powodują pogorszenie kurczliwości mięśnia sercowego (MIRANDA i współaut. 2005). Poszukiwane są więc nowe leki i w tym kontekście doniesienia na temat potencjału terapeutycznego nitroksylu w odniesieniu do chorób układu sercowo-naczyniowego mają istotne znaczenie. Podstawowy donor HNO, sól Angeli'ego, jest pełnowartościowym czynnikiem zmniejszającym ciśnienie krwi, wpływającym na kurczliwość mięśnia sercowego, a także wykazującym korzystne działanie przy niedokrwieniu mięśnia serca. Szczególny obszar zainteresowań wyznacza odkrycie, iż donor ten, w przeciwieństwie do innych czynników, takich jak na przykład nitrogliceryna, nie rozwija tolerancji naczyniowej, zarówno w zaburzeniach ostrych, jak i przewlekłych (IRVINE i współaut. 2008).

Jednym z najczęściej sugerowanych mechanizmów, poprzez który HNO działa rozkurczowo na naczynia krwi, jest, podobnie jak w przypadku NO, wzrost poziomu cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), który aktywuje mechanizmy prowadzące do rozszerzania naczyń, a będący wynikiem aktywacji rozpuszczalnej cyklicznej guanylanowej, sGC (FUKUTO i współaut. 2009). Ten hipotetyczny mechanizm potwierdzono z wykorzystaniem inhibitora cyklicznej guanylanowej (ODQ), który hamuje obniżanie ciśnienia krwi w naczyniach zarówno po zastosowaniu tlenu azotu (NO), jak i nitroksylu. Aby uwiarygodnić tezę, iż nitroksyl jest w tym względzie sam w sobie cząsteczką efektorową (nie działa zaś pośrednio jako prekursor NO) wykorzystano „zmiatacz” tlenu azotu – karboksylo-PTIO (3-tlenek 2-(4-karboksyfenylo)-4,4,5,5-tetrametyloimidazolu-1-oksylu), który, jak stwierdzono, nie zakłóca naczyniowo-rozkurczowego działania nitroksylu, generowanego przez sól Angeli'ego, blokuje jednakże efekty działania NO[•] (FUKUTO i współaut. 2009).

Innym szlakiem prowadzącym do zmniejszenia ciśnienia w naczyniach przez nitroksyl, opozycyjnym do opisanego powyżej, jest

szlak przekazywania sygnałów niezależny od signalingu β -adrenergicznego i cGMP, za to oparty na podwyższeniu poziomu peptydu związanego z genem kalcytoniny (ang. calcitonin gene-related peptide, CGRP) (FUKUTO i współaut. 2005a). CGRP to mały, niezależny od cGMP wasoaktywny neuropeptyd zlokalizowany w neuronach peptydergicznych. Aktywność tego peptydu jest skutkiem jego zdolności do aktywowania receptora podobnego do receptora kalcytoniny (ang. calcitonin-like receptor). Jest nim receptor sprzężony z cykłązą adenylanową i dlatego prowadzący do podwyższenia wewnątrzkomórkowego cyklicznego adenozyonomonofosforanu, cAMP (FUKUTO i współaut. 2005a).

Relaksację naczyń tętniczych i żylnych wiąże się także z aktywacją przez nitroksyl napięciowo-zależnych kanałów potasowych (Kv), czego konsekwencją jest hiperpolaryzacja miocytów naczyń krwionośnych (PAOLOCCI i współaut. 2007). Takie działanie HNO kwalifikuje go do grona śródbłonkowych czynników hiperpolaryzujących (ang. endothelial-derived hyperpolarizing factor, EDHF) (FUKUTO i współaut. 2009).

Wyniki badań nad aktywnością biologiczną nitroksylu wskazują, iż oddziałuje on również na pracę mięśnia sercowego. W doświadczeniach na zwierzętach obserwowano jego działanie inotropowe dodatnie polegające na zwiększaniu siły skurczu mięśnia serca w warunkach, gdy siła samoczynnego kurczenia się mięśnia jest z różnych przyczyn obniżona, oraz działanie luzotropowe dodatnie, umożliwiające relaksację, spoczynek mięśnia sercowego; obie te właściwości przyczyniają się korzystnie do zwiększenia pojemności minutowej serca (SWITZER i współaut. 2009). To działanie nitroksylu, w połączeniu ze zdolnością rozszerzania naczyń krwionośnych, jest szczególnie interesujące z uwagi na potencjał w leczeniu niewydolności serca (IRVINE i współaut. 2008), tym bardziej, że tradycyjnie stosowane czynniki rozszerzające naczynia (nitrogliceryna, donory tlenu azotu) nie wpływają na funkcję kurczliwości mięśnia sercowego (TOCCHETTI i współaut. 2007). Ponadto inne czynniki inotropowe, takie jak β -adrenolityki, podnoszące bardzo wyraźnie kurczliwość serca, gdy stosowane są długotrwale, wywołują niekiedy niepożądane efekty (IRVINE i współaut. 2008).

Obserwowano, że w zwiększaniu kurczliwości mięśnia sercowego znaczenie mogą mieć jony wapnia (Ca^{2+}) krążące w siateczce sarkoplazmatycznej (SS, główny maga-

zyn wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} w mięśniach prążkowanych). Okazało się, że donory nitroksylu powodują natychmiastowe uwalnianie Ca^{2+} z siateczki, zarówno w przypadku mięśnia serca, jak również mięśni szkieletowych (CHEONG i współaut. 2005). Takie działanie jest bezpośrednim wynikiem aktywowania receptorów rianodynowych serca (RyR2) oraz szkieletowych kanałów uwalniających Ca^{2+} (RyR1).

W niezaburzonych stanach, zawartość jonów wapnia w SS jest regulowana poprzez wychwytywanie z cytoplazmy tych jonów przez sarkoplazmatyczną, wapniowo-zależną ATPazę (ang. sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA) oraz, z drugiej strony, przez uwalnianie Ca^{2+} z kanałów rianodynowych (CHEONG i współaut. 2005). Co istotne, w przypadku egzogennie podawanego donora HNO obserwowano także stymulację sarkoplazmatycznej ATPazy SERCA, w konsekwencji prowadzącą do zwiększonego wychwytywania jonów wapnia z cytoplazmy z powrotem do siateczki sarkoplazmatycznej (PAOLOCCI i współaut. 2007). Modulowanie aktywności receptorów RyR2 kanałów wapniowych oraz ATPazy SERCA przez nitroksyl powoduje w rezultacie wzrost kurczliwości kardiomiocytów (TOCCHETTI i współaut. 2007).

HNO wpływa na homeostazę jonów wapnia najprawdopodobniej poprzez interakcję z resztami tiolowymi, które są istotnym elementem rozstrzygającym o funkcji kanałów rianodynowych (CHEONG i współaut. 2005). Znaczenie decydujących grup tiolowych dla aktywności nitroksylu w tym aspekcie wykazano za pomocą egzogennego reduktora tioli, ditiotreitolu (DTT), który po dodaniu do badanych preparatów blokował proces uwalniania z SS jonów wapniowych (FUKUTO i współaut. 2009). Godnym uwagi jest to, że w układzie sercowo-naczyniowym, dwa białka zlokalizowane w tej samej organelli (SR) i funkcjonujące w sposób przeciwstawny (RyR2 i SERCA), mogą jednocześnie podlegać regulacji przez nitroksyl.

W świetle tych danych przypuszcza się, iż nitroksyl może oferować nowe, obiecujące strategie farmakologicznego leczenia niewydolności serca, i że mógłby on zastąpić w przyszłości stosowaną w obecnej praktyce klinicznej terapię złożoną z beta-agonistów oraz inhibitorów fosfodiesterazy (wzmagających siłę skurczu), a także nitraty rozszerzające naczynia krwi (PAOLOCCI i współaut. 2007).

NITROKSYL W UKŁADZIE NERWOWYM

Nie udało się dotychczas w pełni określić działania nitroksylu w układzie nerwowym. Nie mniej jednak wykazano, że HNO oddziałuje z resztami tiolowymi receptorów N-metylo-D-asparagianu (NMDA). Receptory te odgrywają zasadniczą rolę w regulacji funkcji synaptycznych oraz komunikacji neuronalnej w ośrodkowym układzie nerwowym (PAOLOCCI i współaut. 2007), a ich nadaktywacja w warunkach patologicznych, spowodowana nadmiernym stężeniem kwasu glutaminowego w szczelinach synaptycznych, wiąże się z indukcją ekscytotoksyczności (toksyczności z pobudzenia) (FUKUTO i współaut. 2005a).

Nitroksyl, modyfikując decydujące grupy tiolowe receptorów NMDA, powoduje osłabienie napływu jonów Ca^{2+} i złagodzenie aktywności tych receptorów. W tym wymiarze aktywność nitroksylu polega więc na ochronie przed ekscytotoksycznością (PAOLOCCI i współaut. 2007). Z drugiej jednak strony, inne badania ujawniły, że HNO może wywoływać działanie dokładnie odwrotne, to znaczy zwiększać napływ jonów wapniowych. Niekontrolowany napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki może w efekcie końcowym spowodować uszkodzenie i śmierć neuronów. Zaproponowano, iż jest to skutkiem interakcji nitroksylu z jonami magnezu (Mg^{2+}) obecnymi na receptorze NMDA (FUKUTO i współaut. 2009). Jony Mg^{2+} w prawidłowych warunkach blokują kanał receptora NMDA, zamykając go dla przepływu jonów wapnia. Interakcja HNO z Mg^{2+} może natomiast skutkować uwolnieniem jonu Mg^{2+} i niekontrolowanym napływem jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki. Odmienne wyniki badań są prawdopodobnie związane z obecnością bądź brakiem tlenu (jego zużyciem na skutek długotrwałego traktowania solą Angeli'ego - donorem nitroksylu). Niezależnie od tych rozbieżności można jednak przypuszczać, że nitroksyl może modyfikować aktywność receptorów N-metylo-D-asparagianu, w sposób zarówno pozytywny, jak i negatywny (PAOLOCCI i współaut. 2007).

POTENCJAŁ PRZECIWNOWOTWOROWY
NITROKSYLU

Obok korzystnego wpływu nitroksylu na układ sercowo-naczyniowy, obserwuje się także potencjał przeciwnowotworowy tego związku, choć na tym polu potrzeba jeszcze wielu badań. Antykarcynogenny potencjał nitroksylu związany jest między innymi z jego zdolnością do hamowania procesu glikolizy,

niezbędnego dla komórek nowotworowych procesu pozyskiwania energii. Zdolność do oddziaływania cząsteczki HNO/NO⁻ na ten proces wykazano w doświadczeniach z wykorzystaniem komórek drożdży, w których obserwowano, iż toksyczny efekt nitroksylu koreluje pozytywnie z zależnością komórek od procesu glikolizy, stanowiącego podstawowe źródło pozyskiwania energii w fazie wczesnego wzrostu (LOPEZ i współaut. 2005). Istotne jest to, iż obserwowana toksyczność w znacznie mniejszym stopniu dotyczy komórek drożdży w fazie stacjonarnej, w której podstawowym źródłem energii jest proces oddychania. Stwierdzono, że hamowanie szlaku glikolitycznego opiera się na modyfikacji enzymu, dehydrogenazy 3-fosfogliceraldehydu (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), jednego z podstawowych enzymów glikolitycznych, zawierającego w centrum aktywnym grupy tiolowe. Dehydrogenaza GAPDH przekształca w trakcie metabolizmu glukozy aldehyd 3-fosfoglicerynowy do 1,3-bisfosfoglicerynianu. Białko to wpływa również na wiele innych procesów komórkowych, w tym na: endocytozę, fuzję błon, funkcje pęcherzyków wydzielniczych, transport jądrowy tRNA, a także na replikację oraz naprawę DNA (PELICANO i współaut. 2006).

Oddziaływanie nitroksylu na aktywność dehydrogenazy GAPDH jest obserwowane przy niskich stężeniach soli Angeli'ego (donora HNO/NO⁻), a biorąc pod uwagę, iż stężenie wygenerowanego nitroksylu jest zawsze niższe od stężenia donoru, wygląda na to, że enzym ten jest wyjątkowo wrażliwy na działanie tego unikatowego związku. Wiąże się to niewątpliwie z silnymi właściwościami tiofilowymi HNO/NO⁻ (LOPEZ i współaut. 2007). Specyficzna modyfikacja centrum aktywnego GAPDH ma miejsce przy obecności w komórkach dużych stężeń podstawowego tiolu wewnątrzkomórkowego, glutationu (GSH), którego poziom i stan utlenienia nie ulega zmianie. Za tę specyficzność działania odpowiada prawdopodobnie wyższa stała szybkości reakcji nitroksylu z dehydrogenazą (w porównaniu do stałej szybkości dla reakcji HNO z glutationem), bądź też fakt, że HNO hamuje aktywność enzymu w sposób nieodwracalny, podczas gdy modyfikacja GSH ma charakter odwracalny (utleniony glutation, GSSG, bardzo szybko jest redukowany przez białka komórkowe, głównie przez reduktazę glutationową) do GSH (LOPEZ i współaut. 2007). Fizjologiczne bądź

patofizjologiczne skutki takiego działania nitroksylu są bardzo istotne i jednocześnie interesujące przede wszystkim z uwagi na to, że większość komórek nowotworowych, w szczególności guzów litych, proliferuje w warunkach hipoksji, a jako podstawowe źródło energii wykorzystuje proces glikolizy (LOPEZ i współaut. 2007).

Dla antynowotworowego działania nitroksylu znaczenie mają jego właściwości hamowania proliferacji komórkowej, przy czym wydaje się, że cytotoksyczność nitroksylu może być różna w zależności od wartości pH środowiska. Intensywny metabolizm glukozy do kwasu mlekowego oraz hydroliza ATP prowadzi do zakwaszenia mikrośrodowiska komórek rakowych. W przypadku guzów aktywnie metabolizujących glukozę, zewnątrzkomórkowe pH mieści się w granicach 6,0–7,0, podczas gdy zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe pH większości prawidłowych komórek wynosi 7,4 (STOYANOVSKY i współaut. 2004). Wobec tych faktów istotnym jest, że zwiększoną cytotoksyczność nitroksylu generowanego przez sól Angeli'ego, powodującą hamowanie proliferacji komórkowej, obserwowano w środowisku o niższym pH (pH 6,2 w porównaniu z pH 7,4). Uważa się więc, że nitroksyl może w sposób selektywny oddziaływać toksycznie na komórki poddane zakwaszeniu (STOYANOVSKY i współaut. 2004). Hamowanie proliferacji komórek po działaniu nitroksylu obserwowano w hodowlach ludzkich linii raka piersi, zarówno w przypadku wysoce agresywnej linii komórkowej MDA-MB-231, jak również w przypadku nieco łagodniejszej linii komórkowej MCF-7 (NORRIS i współaut. 2008). Wyniki uzyskane w warunkach *in vitro*, potwierdzono także w doświadczeniach *in vivo* z wykorzystaniem myszy, którym przeszczepiono komórki guza (NORRIS i współaut. 2008). Podobne rezultaty uzyskano w przypadku komórek barwiaka (guza chromochłonnego), na które donor nitroksylu także działał cytotoksycznie (STOYANOVSKY i współaut. 2004).

Poza proliferacją komórkową, na ostateczny rozmiar guza wpływa także indukcja zaprogramowanej śmierci komórkowej, apoptozy. Nie dostarczono jak dotąd niepodważalnych dowodów na indukowanie śmierci apoptotycznej przez HNO, nie mniej jednak w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem myszy ksenogenicznych, którym przeszczepiono komórki raka piersi MDA-MB-231, stwierdzono wzrost liczby komórek apoptotycznych w nowotworach zwierząt, którym podawano

donor nitroksylu (sól Angeli'ego), w porównaniu kontrolą (NORRIS i współaut. 2008). Obserwowano również niewielki wzrost poziomu kaspazy-9, składnika wczesnej kaskady apoptotycznej. Przypuszcza się, że wzrost liczby komórek apoptotycznych obserwowany w tkankach guza może wynikać z braku metabolizmu glikolitycznego, zahamowania krążenia lub bezpośredniego działania nitroksylu (NORRIS i współaut. 2008).

Rozważa się również wpływ HNO na proces wykształcania wokół guza nowotworowego sieci naczyń krwionośnych (angiogenezę), czym uwarunkowany jest rozwój nowotworu, naciekanie tkanek oraz powstawanie przerzutów. W badaniach ludzkich komórek raka piersi przeszczepionych myszom obserwowano po podaniu donora nitroksylu zmniejszenie liczby naczyń krwionośnych, a także niższy poziom krążącego surowiczego naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF) oraz spadek ogólnego poziomu białka HIF- α (ang. hypoxia-induced factor), będącego czynnikiem transkrypcyjnym regulującym zdolność komórek nowotworowych do adaptacji w warunkach hipoksji (NORRIS i współaut. 2008). VEGF jest silnym, wysoce selektywnym mitogenem stymulującym komórki śródbłonka naczyniowego (SADŁECKI i współaut. 2010), a angiogeneza oraz specyficzna ekspresja genu VEGF jest regulowana przez czynnik indukowany hipoksją, HIF- α . Wykazano, iż wyższy poziom oraz stabilność białka HIF- α jest skutkiem odwracalnego hamowania aktywności hydroksylazy proliłowej czynnika HIF- α przez końcowy produkt glikolizy, pirogronian (NORRIS i współaut. 2008). Wiadomo, że komórki nowotworowe w bardzo wysokim stopniu uzależniają swoje przeżycie od szlaku glikolitycznego, co pozwala utrzymać wysokie stężenie białka HIF- α , zarówno w środowisku tlenowym, jak i beztlenowym. Stabilne białko HIF- α promuje z kolei angiogenezę oraz indukowanie czynnika VEGF, który rekrutuje komórki śródbłonka do tworzenia nowych naczyń krwionośnych (SKÓRA i współaut. 2006). Zahamowanie bądź zakłócenie neowaskularyzacji mogłoby spowodować, iż mało wydajny metabolizm, wskutek ograniczenia dopływu tlenu i substancji odżywczych dostarczanych przez naczynia krwionośne, nie pokryje wzrastającego zapotrzebowania związanego ze wzrostem guza, co w konsekwencji doprowadziłoby do cyto-stazy i śmierci zmienionych komórek.

Punktem wyjścia, wspólnym dla obserwowanych przeciwnowotworowych aktywności nitroksylu, może być prawdopodobnie pierwotne modulowanie funkcji dehydrogenazy GAPDH. Zahamowanie aktywności tego enzymu zmniejsza dostępność końcowych produktów glikolizy, w tym pirogronianu i mle-

czanu. Spadek bądź brak tych α -okso kwasów może skutkować obniżoną ekspresją czynnika HIF- α , co w sposób kaskadowy wpływa na niższą produkcję czynnika VEGF przez tkanki guza i utrudnia angiogenezę (NORRIS i współaut. 2008).

PODSUMOWANIE

Potencjał farmakologiczny i terapeutyczny związany z szeregiem aktywności nitroksylu jest w pełni obiecujący. Nie ulega jednak wątpliwości, że niezbędne są dalsze badania potwierdzające słuszność stawianych dziś hipotez. Najistotniejszym zadaniem jest opracowanie w pełni specyficznej, czulej, nieinwazyjnej i przede wszystkim bezpośredniej metody detekcji nitroksylu, która pozwoli jed-

noznacznie przypisać obserwowane efekty działaniu tej właśnie cząsteczki. Warto zaznaczyć, iż zgromadzone dotychczas wyniki stanowią podłoże nie tylko dla bardziej zaawansowanych i szerszych badań, ale w pierwszej kolejności świadczą o ogromnym potencjale tej enigmatycznej cząsteczki w opracowaniu nowych, być może skuteczniejszych niż obecnie stosowane, strategii klinicznych.

NITROKSYL (HNO/NO-) – ENIGMATYCZNA CZĄSTECZKA O UNIKATOWYCH WŁAŚCIWOŚCIACH I POTENCJALE FARMAKOLOGICZNYM

Streszczenie

Tlenki azotu biorą udział w wielu fizjologicznych procesach i są cząsteczkami o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym. Odkrycie, że tlenek azotu jest czynnikiem rozkurczowym pochodzenia śródbłonkowego (EDRF) spowodowało wzrost liczby badań dotyczących tego związku. Przez wiele lat nitroksyl (HNO/NO⁻), produkt jednoelektronowej redukcji NO, nie był przedmiotem zainteresowania naukowców, czego przyczyną był brak dowodów potwierdzających endogenną produkcję HNO *in vivo* – nie opracowano dotychczas prostej metody umożliwiającej bezpośrednią jego detekcję. Nitroksyl jest cząsteczką niestabilną, co sprawia, że w badaniach biologicznych muszą być stosowane donory tego związku. Najbardziej powszechnie stosowanym donorem jest sól Angeli`ego (Na₂N₂O₃), która generuje HNO w warunkach fizjologicznych. Wykazano, że nitroksyl preferencyjnie reaguje z białkami zawierającymi grupy hemowe, a

także z tiolami, dzięki czemu wpływa na aktywność wielu ważnych enzymów zawierających w miejscach aktywnych grupy -SH. Wykazano, że nitroksyl, podobnie jak tlenek azotu, posiada dodatnie właściwości inotropowe (podnosi siłę skurczu mięśnia serca), jak również luzotropowe (umożliwia relaksację mięśnia sercowego), które przyczyniają się do zwiększenia pojemności minutowej serca. HNO okazał się również związkiem potencjalnie antykancyrogennym. Wpływa na proces glikolizy (hamuje aktywność dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, GAPDH), który jest głównym źródłem energii dla komórek raka. Ponadto, nitroksyl hamuje angiogenezę i indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych. Unikatowe właściwości nitroksylu spowodowały w ostatnich latach znaczny wzrost zainteresowania tą cząsteczką. W niniejszej pracy omówiono chemiczne i biologiczne właściwości nitroksylu, a także jego potencjał farmakologiczny.

NITROXYL (HNO/NO-) – AN ENIGMATIC MOLECULE WITH UNIQUE PROPERTIES AND PHARMACOLOGICAL POTENTIAL

Summary

Nitrogen oxides are involved in many physiological processes and have the potential to be useful pharmacological agents. The discovery that nitric oxide (NO) is endothelial derived relaxing factor (EDRF) has led to an increase of research in this field. For many years, nitroxyl (HNO/NO⁻) which is one-electron reduction product of NO, has been overlooked, probably because no mechanism of endogenous *in vivo* HNO production has been clearly established – mainly due to a lack of a direct detection method of the compound. It is inherently unstable molecule so the studies on its biological

properties must be done with the use of donor compounds. The most common donor currently used is Angeli's salt (Na₂N₂O₃), which releases HNO at physiological pH. It was shown that nitroxyl can react preferentially with ferric heme proteins and also with thiols and thus could influence the activity of many important enzymes with -SH groups in the active site. Similar to nitric oxide, nitroxyl has been shown to cause vasorelaxation and moreover, it has positive inotropic (force of muscle contraction) as well as lusitropic (relaxation of cardiac muscle) properties which both contribute to increased

cardiac output. In addition to these effects HNO has been shown promising anticancer compound. It influences glycolysis process (nitroxyl inhibits activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) which is a major energy source for cancer cells. Furthermore, HNO inhibits angiogenesis and

induces cancer cell apoptosis. Because of unique properties of nitroxyl there has been a significant increase in interest in this molecule in the past few years. Herein, some of the chemical and biological activities and the pharmacological potential of HNO are described.

LITERATURA

- BAI P., BAKONDI E., SZABÓ É., GERGELY P., SZABÓ C., VIRÁG L., 2001. *Partial protection by poly(ADP-ribose)polymerase inhibition from nitroxyl-induced cytotoxicity in thymocyte*. Free Radic. Biol. Med. 31, 1616–1623.
- CHEONG E., TUMBEV V., ABRAMSON J., SALAMA G., STOYANOVSKY D. A., 2005. *Nitroxyl triggers Ca^{2+} release from skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum by oxidizing ryanodine receptors*, Cell Calcium 37, 87–96.
- DEMASTER E., REDFERN B., NAGASAWA H. T., 1998. *Mechanisms of inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitroxyl, the active metabolite of the alcohol deterrent agent cyanamide*. Biochem. Pharmacol. 55, 2007–2015.
- FLORES-SANTANA W., SWITZER C., RIDNOUR L. A., BASUDHAR D., MANCARDI D., DONZELLI S., THOMAS D. D., MIRANDA K. M., FUKUTO J. M., WINK D. A., 2009. *Comparing the chemical biology of NO and HNO*. Arch. Pharm. Res. 32, 1139–1153.
- FUKUTO J. M., BIANCO C. L., CHAVEZ T. A., 2009. *Nitroxyl (HNO) signaling*. Free Radic. Biol. Med. 47, 1318–1324.
- FUKUTO J. M., DUTTON A. S., HOUK K. N., 2005a. *The chemistry and biology of nitroxyl (HNO): The chemically unique species with novel and important biological activity*. Chembiochemistry 6, 612–619.
- FUKUTO J. M., SWITZER C. H., MIRANDA K. M., WINK D. A., 2005b. *Nitroxyl (HNO): Chemistry, biochemistry and pharmacology*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 335–355.
- FUKUTO J. M., JACKSON M. I., KALUDERCIC N., PAOLOCCI N., 2008. *Examining nitroxyl in biological systems*. Methods Enzymol. 440, 411–431.
- IRVINE J. C., RITCHIE R. H., FAVALORO J. L., ANDREWS K. L., WIDDOP R. E., KEMP-HARPER B. K., 2008. *Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story*. Trends Pharmacol. Sci. 29, 601–608.
- KRZYŻANOWSKI M., GOS T., HAUSER R., 1999. *Znaczenie tlenku azotu dla medycyny nie tylko sądownej*. Arch. Med. Sąd. Krym. XLIX, 23–30.
- LOPEZ B. E., RODRIGUEZ C. E., PRIBADI M., COOK N. M., SHINYASHIKI M., FUKUTO J. M., 2005. *Inhibition of yeast glycolysis by nitroxyl (HNO): a mechanism of HNO toxicity and implication to HNO biology*. Arch. Biochem. Biophys. 442, 140–148.
- LOPEZ B. E., WINK D. A., FUKUTO J. M., 2007. *The inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitroxyl (HNO)*. Arch. Biochem. Biophys. 465, 430–436.
- MIRANDA K. M., 2004. *The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology*. Coord. Chem. Rev. 249, 433–455.
- MIRANDA K. M., NAGASAWA H. T., TOSCANO J. P., 2005. *Donors of HNO*. Curr. Top. Med. Chem. 5, 649–664.
- MIRANDA K. M., PAOLOCCI N., KATORI T., THOMAS D. D., FORD E., BATRBERGER M. D., ESPEY M. G., KASS D. A., FEELISCH M., FUKUTO J. M., WINK D. A., 2003. *A biochemical rationale for the discrete behaviour of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 9196–9201.
- NORRIS A. J., SARTIPPOUR M. R., LU M., PARK T., RAO J. Y., JACKSON M. I., FUKUTO J. M., BROOKS M. N., 2008. *Nitroxyl inhibits breast tumor growth and angiogenesis*. Int. J. Cancer 122, 1905–1910.
- PAOLOCCI N., JACKSON M. I., LOPEZ B. E., MIRANDA K., TOCCHETTI C. G., WINK D. A., HOBBS A. J., FUKUTO J. M., 2007. *The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: Not just the janus face of NO*. Pharmacol. Ther. 113, 442–458.
- PELICANO H., MARTIN D. S., HU R. H., HUANG P., 2006. *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene 25, 4633–4646.
- ROSENTHAL J., LIPPARD S. J., 2010. *Direct detection of nitroxyl in aqueous solution using a tripod copper (II) BODIPY complex*. J. Am. Chem. Soc. 132, 5536–5537.
- SADŁECKI P., WALENTOWICZ-SADŁECKA M., GRABIEC M., 2010. *Rola angiogenezy w rozwoju nowotworów*. Przegł. Menopauz. 1, 28–31.
- SHA X., ISBELL T.S., PATEL R.P., DAY C.S., KING S.B., 2006. *Hydrolysis of acyloxy nitroso compounds yields nitroxyl (HNO)*. J. Am. Chem. Soc. 128, 9687–9692.
- SHAFIROVICH V., LYMAR S. V., 2002. *Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: Spin states, protic equilibria and reactivities toward oxygen and nitric oxide*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 7340–7345.
- SKÓRA J., BIEGUS J., PUPKA A., BARC P., SIKORA J., SZYBER P., 2006. *Molekularne podstawy angiogenezy*. Post. Hig. Med. Dośw. 60, 410–415.
- SOKOŁOWSKA M., WŁODEK L., 2001. *Dobre i złe strony tlenku azotu*. Folia Kardiol. 8, 467–477.
- STOYANOVSKY D. A., SCHOR N. F., NYLANDER K. D., SALAMA G., 2004. *Effects of pH on the cytotoxicity of sodium trioxodinitrate (Angeli's salt)*. J. Med. Chem. 47, 210–217.
- SWITZER C. H., FLORES-SANTANA W., MANCARDI D., DONZELLI S., BASUDHAR D., RIDNOUR L. A., MIRANDA K. M., FUKUTO J. M., PAOLOCCI N., WINK D. A., 2009. *The emergence of nitroxyl (HNO) as a pharmacological agent*. Biochim. Biophys. Acta 1787, 835–840.
- TOCCHETTI C. G., WANG W., FROELICH J. P., HUK S., AON M. A., WILSON G. M., DI BENEDETTO G., O'ROURKE B., GAO W. D., WINK D. A., TOSCANO J. P., ZACCOLO M., BERS D. M., VALVIDIA H. H., CHENG H., KASS D. A., PAOLOCCI N., 2007. *Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling*. Circ. Res. 100, 96–104.
- UFNAL M., ŻERA T., 2010. *Rola tlenku azotu, siarkowodoru oraz tlenku węgla w regulacji układu krążenia i ich potencjał farmakoterapeutyczny*. Kard. Pol. 68, 436–440.
- VÄÄNÄNEN A. J., SALMENPERÄ P., HUKKANEN M., MIRANDA K. M., HARJULA A., RAUHALA P., KANKURI E., 2008. *Persistent susceptibility of cathepsin B to irreversible modification by nitroxyl (HNO) in the presence of endogenous nitric oxide*. Free Radic. Biol. Med. 45, 749–755.
- WANG M. J., MAZHARI R., ILSAR I., WANG A., SABBAAH M. S., SABBAAH H. N., 2009. *Intravenous infusion of CXL-1020, a novel nitroxyl (HNO) donor,*

improves left ventricular systolic and diastolic function in dogs with advanced heart failure. J. Cardiac. Failure 15, Suppl., S73-S74.

ZETTERSTRÖM R., 2009. *The 1988 Nobel Prize – discovery of the role of nitric oxide as a signaling molecule.* Acta Pædiatrica 98, 593-599.