

Praca pogładowa • Review article

## 3-nitrotyrozyna - marker stresu oksydacyjnego *in vitro* i *in vivo*

### 3-nitrotyrosine as a marker of oxidative stress *in vitro* and *in vivo*

Joanna Kołodziejczyk

Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki

#### Streszczenie

Rosnąca liczba danych z badań doświadczalnych i klinicznych wskazuje na związek między stresem oksydacyjnym, a patogenezą wielu chorób. Jak oszacowano do tej pory, reaktywne formy tlenu i azotu są zaangażowane w przebieg ponad stu jednostek chorobowych.

3-nitrotyrozyna (3-NT) stanowi jeden z najbardziej obiecujących markerów zmian zachodzących w organizmie pod wpływem stresu oksydacyjnego. Nitrowanie reszt tyrozyny w białkach potwierdzono *in vivo* m.in. w chorobie wieńcowej, nowotworach, stanach niedokrwienia i reperfuzji, czy cukrzycy. Wykrycie obecności 3-NT ma nie tylko wartość informacyjną. Wykazano, że powstawanie 3-NT może zaburzać strukturę i funkcję fizjologiczną wielu białek, prowadząc nawet do utraty ich funkcji.

#### Summary

Data from numerous experimental and clinical studies demonstrate the important role of oxidative stress in the pathogenesis of various diseases. It has been established that reactive oxygen (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are implicated in over 100 disorders. ROS and RNS can cause the oxidation and nitration of different molecules, leading often to tissue/organ damage.

Nitration of free and protein tyrosine residues, that leads to 3-nitrotyrosine (3-NT) formation, was observed in many diseases, such as coronary artery disease, ischaemia and reperfusion, cancer and diabetes. The increasing interest in the clinical relevance of 3-NT has been reported. 3-NT formation is not only a marker of nitration; it may also lead to changes of protein structure and protein dysfunction. Thus, 3-NT detection is supposed to be an important biomarker of oxidative/nitrative protein damage.

**Słowa kluczowe:** stres oksydacyjny, 3-nitrotyrozyna, marker

**Key words:** oxidative stress, marker, 3-nitrotyrosine

Praca wykonana w ramach realizacji projektu badawczego 506/810 finansowanego przez Uniwersytet Łódzki.

#### Wstęp

Nasilone wytwarzanie reaktywnych form tlenu i azotu towarzyszy wielu chorobom zarówno we wczesnych stadiach rozwoju, jak i w ich późniejszym przebiegu. Dlatego też zwraca się uwagę na ocenę stresu oksydacyjnego, który może prowadzić do licznych strukturalnych i funkcjonalnych modyfikacji biomolekuł, obecnych zarówno w komórkach, tkankach, jak i płynach ustrojowych. W warunkach patofizjologicznych i przy zwiększonym wytwarzaniu reaktywnych form tlenu i azotu (RFT i RFA) w organizmie dochodzi do zmian i uszko-

dzeń cząsteczek lipidów, kwasów nukleinowych i białek. Stres oksydacyjny pojawiający się w warunkach patologicznych, może być oceniany z wykorzystaniem różnych testów i wskaźników, najczęściej na podstawie oceny peroksydacji lipidów za pomocą oznaczania poziomu TBARS (ang. *thio-barbituric acid reactive substances*), dialdehydu malonowego (MDA) czy izoprostanów. Materiał szczególnie przydatny do oceny stresu oksydacyjnego stanowią jednak białka: są trwalsze, łatwiejsze do przechowywania, występują w większym stężeniu niż np. DNA, mniejsze jest też prawdopodo-

bieństwo wystąpienia artefaktów. Wśród uszkodzeń białek zachodzących w stresie oksydacyjnym, coraz większą wagę zwraca się obecnie na proces nitrowania reszt tyrozyny, prowadzący do powstania 3-nitrotyrozyny (3-NT). Zainteresowanie 3-NT wynika zarówno z wartości informacyjnej oznaczenia, jak i również z faktu, że modyfikacja ta ma istotne konsekwencje biologiczne.

### Powstawanie 3-nitrotyrozyny

Do tworzenia 3-nitrotyrozyny w białkach dochodzi *in vivo* w wyniku działania czynników nitrujących na łańcuch polipeptydowy. Za powstawanie 3-nitrotyrozyny odpowiadają głównie 2 rodniki: tlenek azotu ( $\text{NO}^*$ ) oraz anionorodnik nadadtlenkowy ( $\text{O}_2^-$ ), które gwałtownie reagując ze sobą tworzą nadadtlenoazotyn ( $\text{ONOO}^-$ ), jeden z ważniejszych czynników utleniających i nitrujących, wytwarzany *in vivo* w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych oraz niedokrwienno-reperfuzyjnych (Ryc. 1.). Komórkami zdolnymi do uwalniania dużych ilości  $\text{NO}$  i  $\text{O}_2^-$ , co umożliwia powstawanie  $\text{ONOO}^-$ , są m.in. komórki śródbłonna, makrofagi i neutrofile [31].

Przebieg procesów zapalnych w różnych chorobach wiąże się ze wzmożoną rekrutacją i aktywnością makrofagów oraz neutrofilii, wytwarzających RFT i RFA. Powstający w takich warunkach  $\text{NO}^*$  generowany przez indukowalną syntazę tlenku azotu (iNOS, ang. *inducible nitric oxide synthase*) może prowadzić do powstawania nadadtlenoazotynu [26]. Nadadtlenoazotyn jest głównym czynnikiem powodującym powstawanie 3-nitrotyrozyny, choć nie tylko on może odpowiadać za nitrowanie reszt tyrozynowych w białkach. Pojawianie się 3-NT w białkach może być także efektem reakcji katalizowanych przez peroksydazy, takie jak mieloperoksydaza (MPO) czy peroksydaza eozynofili [32].

### Biologiczne znaczenie nitrowania tyrozyny

Biologiczna wydajność nitrowania tyrozyny jest niska: stwierdzono, że tylko od 1 do 5 reszt tyrozyny na 10 000 ulega nitrowaniu. Tak niska efektywność nitrowania jest wynikiem wielu procesów związanych zarówno z przemianami, jakim ulegają czynniki nitrujące i produkty przejściowe powstające w reakcjach nitrowania, jak i licznych endogennych mechanizmów antyoksydacyjnych [29]. Pomimo tak niewielkiej wydajności procesu nitrowania, biologiczne znaczenie 3-nitrotyrozyny wydaje się jednak być bardzo istotne. Ze względu na zwiększony poziom nitrowania reszt tyrozynowych w warunkach stresu oksydacyjnego, który towarzyszy procesom patologicznym, sugeruje się, że powstająca 3-nitrotyrozyna jest wiarygodnym markerem uszkodzeń białek. Oznaczana w białkach komórkowych i osoczowych 3-nitrotyrozyna traktowana jest przede wszystkim jako marker działania nadadtlenoazotynu, ale pochodna ta jest również aktywnym biologicznie produktem. Obecność 3-nitrotyrozyny wykazano w bardzo różnorodnych chorobach, w tym chorobie wieńcowej [25], posocznicy, chorobie Alzheimera, stwardnieniu rozsianym [12] i kardioplegii [16]. Zidentyfikowano także liczne białka, zróżnicowane zarówno pod względem budowy, jak

i pełnionej funkcji zawierające 3-nitrotyrozynę. Wśród nich znaczną część stanowią enzymy, a nitrowanie tyrozyny jest przyczyną zahamowania aktywności m.in. manganowej dysmutazy nadadtlenkowej (MnSOD, ang. *manganese superoxide dismutase*), istotnego enzymu antyoksydacyjnego [28]. Zależne od iNOS nitrowanie tyrozyny w MnSOD zachodzące w warunkach stresu oksydacyjnego w stanach patologicznych potwierdzono w badaniach nad odrzucaniem przeszczepów serca [19]. 3-nitrotyrozynę wykryto również w miocytach pacjentów z nadciśnieniem, cukrzycą typu II, po zabiegach kardiologicznych, w przypadkach kardiomiopatii u pacjentów z wirusem HIV [24], a także w naczyniach krwionośnych ze zmianami miażdżycowymi [35]. Jej obecność stwierdzono w białkach osocza chorych na celiakię [34], ostrą niewydolność oddechową (ang. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS) [9] i raka płuc, gdzie w osoczu zidentyfikowano następujące białka zawierające 3-NT: fibrynogen, transferynę, plazminogen i ceruloplazminę [27].

Roggensack i wsp. [30] wykazali wzrost aktywności śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS, ang. *endothelial nitric oxide synthase*), tworzenia 3-nitrotyrozyny oraz spadek aktywności dysmutazy nadadtlenkowej (SOD, ang. *superoxide dismutase*) w naczyniach krwionośnych kobiet ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym, co świadczy o tym, że stres oksydacyjny może prowadzić do dysfunkcji śródbłonna naczyń krwionośnych. Natomiast badania *Dhiman* i wsp. [4] nad patogenezą i przebiegiem choroby Chagasa potwierdzają znaczne nasilenie wytwarzania RFA na skutek infekcji. Ponieważ zaobserwowano, że w przebiegu tej infekcji do osocza krwi są uwalniane białka zawierające 3-NT, autorzy sugerują, że nitrowanie tyrozyny może być markerem postępu zmian chorobowych.

Rośnie także liczba danych dotyczących biologicznych efektów powstawania 3-NT w układzie krążenia i procesach związanych z hemostazą. Jej obecność stwierdzono w ścianach naczyń krwionośnych pacjentów z różnymi stopniami zaawansowania zmian miażdżycowych [1,3]. Badania kliniczne wskazują, że detekcja tej modyfikacji tyrozyny może być niezależnym wskaźnikiem ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej. Ponieważ zaobserwowano, że na ilość 3-NT ma wpływ stosowanie leków obniżających poziom czynników ryzyka incydentów wieńcowych, sugeruje się, że za pomocą oznaczeń 3-NT zmieniającego się podczas leczenia można monitorować efekty stosowanej terapii [33].

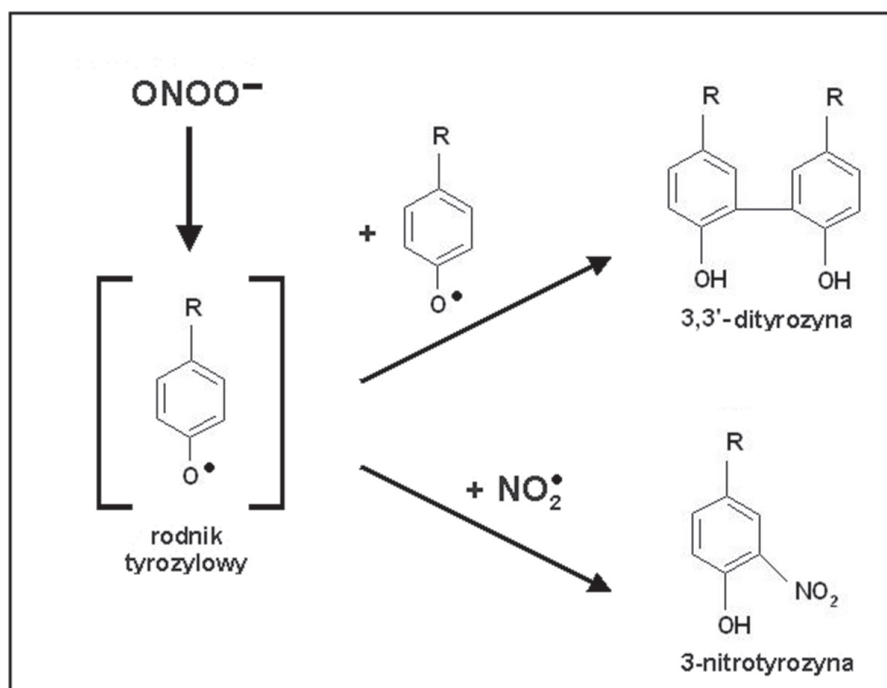
W badaniach *in vitro* wykazano natomiast, że nadadtlenoazotyn zmniejsza możliwość utrzymania równowagi pomiędzy mechanizmami pro- i antykoagulacyjnymi w osoczu poprzez zmniejszenie aktywności czynników krzepnięcia X i VII oraz kompleksu czynnika VIII i białka C. Za prawdopodobne podłoże molekularne tych zmian uważa się właśnie nitrowanie reszt tyrozynowych w tych białkach [17]. W osoczu pacjentów z chorobą wieńcową stwierdzono podwyższony poziom fibrynogenu zawierającego 3-nitrotyrozynę. Wykryto również zmiany w strukturze zarówno fibrynogenu, jak i fibryny, zaobserwowano też przyspieszenie wykrzepiania i modyfikacje

struktury skrzepu, prawdopodobnie mające wpływ na wystąpienie stanu prozakrzepowego [37]. Powstawanie 3-nitrotyrozyny wydaje się być także czynnikiem hamującym aktywność fibrynolizy [20,11]. Badania *Gugliucci* [10] pokazują, że nitrowanie plazminogenu – głównego białka układu fibrynolitycznego, może mieć istotne znaczenie w występowaniu zwiększonego potencjału prokoagulacyjnego krwi, obserwowanego u osób chorych na cukrzycę. Natomiast *Nielsen* i wsp. [18] stwierdzili, że aktywność tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) zmniejsza się wraz ze wzrostem ilości nitrowanej tyrozyny w tym białku.

### Metody oznaczania 3-nitrotyrozyny

Ponieważ 3-NT jest stabilnym produktem powstającym w wyniku zwiększonego wytwarzania RFT i RFA, można ją wykrywać i oznaczać stosując różnorodne metody, takie jak pomiar spektrofotometryczny, HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa, ang. *High Performance Liquid Chromatography*), chromatografia gazowa, spektrometria masowa, czy metody immunoenzymatyczne. Nie wszystkie z wymienionych metod nadają się jednak do wykorzystania w oznaczeniach w materiale biologicznym [36]. Pierwsze metody oznaczania zawartości 3-NT w białkach opierały się na pomiarach spektrofotometrycznych: ( $\text{pH } 11.5$ ,  $\epsilon_{430 \text{ nm}} = 4400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) [13]. Metodę tę można było stosować jedynie w prostych układach doświadczalnych z wykorzystaniem roztworów białek, ze względu na konieczność uzyskania wysokiego pH próbek i ich klarowność. Z tych powodów metoda spektrofotometryczna nie znalazła szerszego zastosowania w oznaczeniach 3-NT w materiale biologicznym.

Obecnie 3-NT wykrywa się czułymi metodami immunoenzymatycznymi, głównie różnymi odmianami testów ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) z użyciem przeciwciał anty-3-nitrotyrozynowych. Metoda ELISA pozwala na oznaczanie stopnia nitrowania tyrozyny w materiale biologicznym (m.in. osoczu, lizatach komórkowych) i wyklucza większość ograniczeń utrudniających użycie innych metod analitycznych. W odróżnieniu od metody spektrofotometrycznej i techniki Western blotting, płytkowy test immunoenzymatyczny charakteryzuje się dużą wydajnością, czułością i wymaga niewielkiej ilości białka (nano- lub mikrogramy) w badanych próbkach. Stosując bezpośredni test ELISA wykryto 3-NT m.in. w osoczu i w ścianach naczyń krwionośnych pacjentów z cukrzycą typu II, co potwierdza udział stresu oksydacyjnego w patogenezie tej choroby [2]. W 1998 *Khan* i wsp. [14] opracowali metodę do ilościowego oznaczania 3-NT, którą określili jako kompetycyjny (konkurencyjny) test ELISA (c-ELISA) z wykorzystaniem albuminy zawierającej 3-NT. Immunoenzymatyczne określenie zawartości 3-nitrotyrozyny opisane przez autorów ma charakter półilościowy - stężenie wyraża się w ilościach znitrowanego antygeny wzorcowego. Metoda ta wymaga użycia 2 antygenów: wolnego i związanego na płycie polistyrenowej. Płytki opłaszczają znitrowaną albuminą (4  $\mu\text{g/ml}$ ), a wolny antygen preinkubuje się z przeciwciałami anty-3-nitrotyrozynowymi, a następnie nanosi na opłaszczoną studzienki. W zależności od zawartości 3-NT w badanych próbkach określona ilość przeciwciał zostaje związana, tak więc mniej przeciwciał może się wiązać do opłaszczanego antygeny. W studzienkach z najwyższą zawartością 3-NT w wolnym antygenie rejestruje się najniższą



Rycina 1.

Nitrowanie tyrozyny w wyniku działania nadtlenoazotynu.

Nadtlenoazotyn nie modyfikuje tyrozyny na drodze bezpośredniej reakcji nitrowania. Na skutek działania  $\text{ONOO}^-$  na białka, z tyrozyny powstaje nietrwały rodnik tyrozylowy, który następnie może być przekształcany do 3-nitrotyrozyny. W wyniku dimeryzacji rodników tyrozylowych może natomiast dochodzić do powstawania 3,3'-dityrozyny i tworzenia wiązań krzyżowych w białkach.

wartość absorbancji, a w oznaczanych równolegle próbach kontrolnych (bez 3-NT) najwyższą. Wartość absorbancji w studzienkach kontrolnych przyjmuje się za 100% wiązania przeciwciał do związanego antygenu. O zawartości nitrotyrozyny wnioskuje się na podstawie zmian absorbancji, co odpowiada zmianom stopnia hamowania wiązania przeciwciał do związanego antygenu. Uzyskane wyniki można przedstawić ilościowo poprzez sporządzenie krzywej wzorcowej ze znitrowanego antygenu i odczytanie zawartości 3-NT w badanych próbach.

W badaniach Olas i wsp. [22,23] zmodyfikowano metodę Khana (1998), a opracowaną metodę zastosowano do oznaczeń 3-NT w płytkach krwi i osoczu poddawanych działaniu nadtlenoazotynu *in vitro*. W oznaczeniach tych zastosowano ludzki fibrynogen (1 µg/ml) jako antygen wzorcowy, który poddawano działaniu nadtlenoazotynu w celu nitrowania reszt tyrozyny. Na antygen wzorcowy wybrano fibrynogen, ze względu na obecność licznych reszt tyrozyny (120) w cząsteczce tego białka, uzyskiwany wysoki stopień nitrowania (w warunkach *in vitro* ok. 11 moli 3-NT/mol Fg - przy zastosowaniu 0,1 mM ONOO<sup>-</sup>) oraz wysokie stężenie w osoczu (ok. 3,5 mg/ml) i stabilność wyizolowanego preparatu fibrynowego. Zmodyfikowany test c-ELISA można także stosować do oceny ochronnego działania naturalnych i syntetycznych związków o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych [15,21]. Dostępne są również dane z badań *in vivo*, potwierdzające udział stresu oksydacyjnego w chorobach psychicznych (schizofrenia) i neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera) oraz możliwość zastosowania oznaczeń 3-NT, jako markera stresu oksydacyjnego u badanych pacjentów [5, 6, 7].

Istotne utrudnienia w immunoenzymatycznym oznaczaniu 3-nitrotyrozyny w materiale biologicznym stanowią nie tylko jego półilościowy charakter, ale i trudności ze standaryzacją stosowanych metod. Metody analityczne z wykorzystaniem przeciwciał charakteryzują się wysoką czułością i zaprojektowane są raczej na wykrycie nitrowania tyrozyny w materiale pochodzącym z określonych organów, komórek lub płynów ustrojowych, a nie na ilościowe oznaczenie poziomu wykrytej 3-NT. Frost i wsp. [8] zaproponowali zastosowanie chromatografii gazowej i spektrometrii masowej do oznaczania 3-NT wolnej i związanej z białkami. Autorzy podkreślają potrzebę stosowania metod typowo ilościowych do oznaczania 3-NT, co umożliwi standaryzację oznaczeń i może wykluczyć ograniczenia i artefakty pojawiające się w przypadku metod immunoenzymatycznych.

*Składam serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. Barbarze Wachowicz z Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego za wskazówki, uwagi i pomoc w przygotowaniu tej pracy.*

#### Piśmiennictwo:

- Buttery L.D., Springall D. R., Chester A. H. i wsp. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996, 75, 77-85
- Ceriello A., Mercuri F., Quagliari L. i wsp. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001, 44, 834-838
- Cromheeke K. M., Kock M. M., de Meyer G. R. i wsp. Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/peroxidation in human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res* 1999, 43, 744-754
- Dhiman M., Nakayasu E.S., Madaiah Y.H. i wsp. Enhanced Nitrosative Stress during Trypanosoma cruzi Infection Causes Nitrotyrosine Modification of Host Proteins. *Am J Pathol* 2008, 173, 728-740
- Dietrich-Muszalska A., Olas B. Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. *Platelets* 2009, 2, 90-96
- Dietrich-Muszalska A., Olas B., Głowacki R. i wsp. Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2009, 1, 1-7
- Dobrzycka W, Leszek J. Diagnostyka laboratoryjna choroby Alzheimera. *Adv Clin Exp Med* 2006, 6, 1121-1127
- Frost M. T., Halliwell B., Moore K. P. Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts. *Biochem J* 2000, 345, 453-458
- Gole M. D., Souza J. M., Choi I. I. wsp. Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 278, 961-967
- Gugliucci A. Human plasminogen is highly susceptible to peroxynitrite inactivation. *Clin Chem Lab Med* 2003, 8, 1064-1068
- Hathuc C., Hermo R., Schulze J., Gugliucci A. Nitration of human plasminogen by RAW 264.7 macrophages reduces streptokinase-induced plasmin activity. *Clin Chem Lab Med* 2006, 2, 213-219
- Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1998, 1, 1-11
- Ischiropoulos H., Al Mehdi A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* 1995, 364, 279-282
- Khan J., Brennan D. M., Bradley N. i wsp. 3-nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem J* 1998, 330, 795-801
- Kolodziejczyk J., Masullo M., Olas B. i wsp. Effects of garcinol and guttiferone K isolated from Garcinia cambogia on oxidative/nitrative modifications in blood platelets and plasma. *Platelets* 2006, 7, 487 - 492
- Mehlhorn U., Krahwinkel A., Geissler H. J. i wsp. Nitrotyrosine and 8-isoprostane formation indicate free radical-mediated injury in hearts of patients subjected to cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003, 125, 178-183
- Nielsen V. G., Crow J. P., Mogal A., Zhou F., Parks D. A. Peroxynitrite decreases hemostasis in human plasma *in vitro*. *Anesth Analg* 2004;99:21-26
- Nielsen V. G., Crow J. P., Zhou F. i wsp. Peroxynitrite inactivates tissue plasminogen activator. *Anesth Analg* 2004, 98, 1312-1317
- Nilakantan V., Halligan N. L. N., Nguyen T. K. i wsp. Post-translational modification of manganese-superoxide dismutase in acutely rejecting cardiac transplants: role of inducible nitric oxide synthase. *J Heart Lung Transplant* 2005, 24, 1591-1599
- Nowak P., Kołodziejczyk J., Wachowicz B. Peroxynitrite and fibrinolytic system; The effect of peroxynitrite on plasmin activity. *Mol Cell Biochem* 2004, 267, 141-146
- Nowak P., Saluk-Juszczak J., Olas B. i wsp. Protective effects of selenoorganic compounds against peroxynitrite-induced changes of plasma proteins and lipids. *Cell Mol Biol Lett* 2006, 11, 3-13
- Olas B., Nowak P., Kołodziejczyk J. i wsp. Protective effects of resveratrol against oxidative/nitrative modifications of plasma



- proteins and lipids exposed to peroxynitrite. *J Nutr Biochem* 2006, 17, 96-102
23. Olas B., Nowak P., Kołodziejczyk J. i wsp. The effects of antioxidants on peroxynitrite-induced changes in platelet proteins. *Thromb Res* 2004, 113, 399-406
  24. Pacher P., Schulz R., Liaudet L. i wsp. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci* 2005, 26, 302-310
  25. Paier A., Agewall S., Kublickiene K. Expression of heat shock proteins and nitrotyrosine in small arteries from patients with coronary heart disease. *Heart Vessels* 2009, 24, 260-266
  26. Patel R. P., McAndrew J., Sellak H. i wsp. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1411, 385-400
  27. Pignatelli B., Li Ch-Q., Boffetta P. i wsp. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res* 2001, 61, 778-784
  28. Quijano C., Hernandez-Saavedra D., Castro L. i wsp. Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2001, 276, 11631-11638
  29. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *PNAS* 2004, 101, 4003-4008
  30. Roggensack A. M., Zhang Y., Davidge S. T. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 1999, 33, 83-89
  31. Ronson R. S., Nakamura M., Vinten-Johansen J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc Res* 1999, 44, 47-59
  32. Schopfer F. J., Baker P. R. S., Feeman B. A. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* 2003, 28, 643-655
  33. Shishehbor M. H., Brennan M. L., Aviles R. J. i wsp. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 2003, 108, 426-431
  34. Steege J. C., Koster-Kamphuis L., van Straaten E. A. i wsp. Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Radic Biol Med* 1998, 25, 953-963
  35. Sucu N., Unlu A., Tamer L. i wsp. 3-nitrotyrosine in atherosclerotic blood vessels. *Clin Chem Lab Med* 2003, 41, 23-25
  36. Turan N. N., Ark M., Demiryurek A. T. Comparison of spectrophotometric, HPLC and chemiluminescence methods for 3-nitrotyrosine and peroxynitrite interaction. *Arch Pharm Res* 2005, 32, 358-363
  37. Vadseth C., Souza J. M., Thompson L. i wsp. Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004, 279, 8820-8826

**Adres Autora:**

Katedra Biochemii Ogólnej  
Uniwersytet Łódzki  
90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16  
tel. (42) 635 44 82  
e-mail: joannak@biol.uni.lodz.pl

(Praca wpłynęła do Redakcji: 2010.03.15)

(Praca przekazana do opublikowania: 2010.06.07)