

Received: 2008.09.08
Accepted: 2008.10.21
Published: 2008.11.05

Mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej – potencjalne zastosowania kliniczne*

Superoxide dismutase mimetics: Possible clinical applications

Michał Woźniak, Małgorzata Czyż

Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Anionorodnik ponadtlenkowy oraz jego pochodne rodnik hydroksylowy, nadtlenuk wodoru i nadtlenuk azotu odgrywają ważną rolę w procesach starzenia i w rozwoju wielu chorób, w tym w chorobach nowotworowych, neurodegeneracyjnych, naczyniowych, cukrzycy i zapaleniach. Zwiększony poziom reaktywnych form tlenu, prowadzący do poważnych uszkodzeń narządów, jest również następstwem stosowanych terapii, w tym chemio- i radioterapii, reperfuzyj po stanach niedokrwienia, np. przy transplantacji. Zastosowanie katalitycznych antyoksydantów, wspomagających leczenie może się okazać przydatnym nowym sposobem umożliwiającym ochronę tkanek prawidłowych bez zmniejszania wydajności terapii. W przeglądzie przedstawiamy aktualny stan wiedzy na temat syntetycznych, niskocząsteczkowych związków, które mogą być wykorzystane jako mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej (SODm) w leczeniu chorób o różnej etiologii i do ochrony zdrowych tkanek podczas terapii.

Słowa kluczowe:

reaktywne formy tlenu • anionorodnik ponadtlenkowy • mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej

Summary

Superoxide, and its derivatives hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and peroxynitrite, play an important role in aging and in several diseases, including cancer, diabetes, inflammation, neurodegenerative and vascular disorders. Increased level of reactive oxygen species leading to severe organ damage could also be a consequence of applied therapy, such as radiation therapy, chemotherapy, reperfusion after ischemia, or transplantation. A new approach to protect normal tissues without jeopardizing the efficacy of treatment may be to apply specific catalytic antioxidants as adjuncts to the therapy. In this review a number of synthetic low-molecular-weight agents are discussed that may be used as mimetics of superoxide dismutase enzymes (SODm) to treat diseases of various etiologies and to protect healthy tissues during therapy.

Key words:

reactive oxygen species • superoxide • superoxide dismutase mimetics

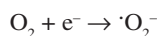
* Artykuł opracowano w ramach prac statutowych 503-1099-2 finansowanych przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=871386>**Word count:** 3898**Tables:** –**Figures:** 3**References:** 105**Adres autorki:** prof. dr hab. Małgorzata Czyż, Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: mczynz@csk.umed.lodz.pl**Wykaz skrótów:** **AIF** – czynnik indukujący apoptozę (apoptosis-inducing factor); **Akt** – kinaza serynowo-treoninowa B; **AP-1** – czynnik transkrypcyjny 1 (activating protein 1); **ATF** – aktywujący czynnik transkrypcyjny (activating transcription factor 1); **HIF-1** – czynnik indukowany przez niedotlenienie (hypoxia-inducible factor 1); **LDL** – lipoproteiny o niskiej gęstości (low density lipoproteins); **MAP** – białko aktywowane przez mitogeny (mitogen-activated protein); **MAPK** – kinaza białka aktywowanego przez mitogeny (mitogen-activated protein kinase); **MPO** – mieloperoxydaza; **NF-κB** – czynnik jądrowy kappa B (nuclear factor kappa B); **PEG₂** – hormon prostaglandynowy; **PLGA** – kwas poli-L-glutaminowy; **RFT** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa (superoxide dismutase); **SODm** – mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej (superoxide dismutase mimetics); **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworów α (tumor necrosis factor alpha).

WSTĘP

Reaktywne formy tlenu (RFT)

Reaktywne formy tlenu (RFT, reactive oxygen species) są produktami ubocznymi metabolizmu tlenowego. Najważniejszym przedstawicielem RFT jest anionorodnik ponadtlenkowy $\cdot\text{O}_2^-$ (superoxide radical anion), który jest prekursorem innych reaktywnych form tlenu. Anionorodnik ponadtlenkowy powstaje w wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu:



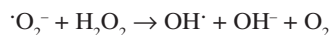
Taka reakcja występuje m.in. podczas przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Najwięcej $\cdot\text{O}_2^-$ powstaje tu w wyniku reakcji ubihydrochinonu z tlenem. Innymi enzymami katalizującymi powstanie $\cdot\text{O}_2^-$ są m.in. dehydrogenaza NADPH, oksydaza ksantynowa i cytochrom P-450 [51,88].

Nieenzymatyczna synteza anionorodnika ponadtlenkowego występuje, gdy pojedynczy elektron przenoszony jest bezpośrednio na atom tlenu z udziałem metali przejściowych, koenzymów lub ksenobiotyków, zredukowanych wcześniej przez inne enzymy [95]. Anionorodnik ponadtlenkowy i jego pochodne są wykorzystywane przez komórki fagocytyczne do eliminowania patogenów. Nadmiar anionorodnika ponadtlenkowego uwalnia żelazo z białek i utlenia kwasy tłuszczowe, steroidy oraz wprowadza uszkodzenia do kwasów nukleinowych. $\cdot\text{O}_2^-$ bierze czynny udział w zapaleniach, uszkodzeniach niedokrwiennie-reperfuzyjnych, progresji nowotworów i w procesach starzenia się [65].

Anionorodnik ponadtlenkowy w reakcji dysproporcjonowania $\cdot\text{O}_2^-$ może zostać jednocześnie zredukowany do nadtlenu wodoru H_2O_2 (hydrogen peroxide) i utleniony do tlenu cząsteczkowego O_2 :

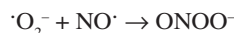


Reakcja ta może być spontaniczna lub może być katalizowana przez dysmutazę ponadtlenkową (superoxide dismutase – SOD). Nadtlenek wodoru jest trwalszy niż anionorodnik ponadtlenkowy i ma zdolność dyfuzji przez błony komórkowe. Nadmiar nadtlenu wodoru aktywuje czynniki transkrypcyjne, takie jak NF-κB (nuclear factor kappa B) czy HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1). Prowadzi to do zwiększenia proliferacji komórek i angiogenezy, wzrostu oporności na apoptozę, zwiększenia inwazyjności oraz tworzenia przerzutów nowotworów [58]. Nadtlenek wodoru może być zredukowany w obecności jonów żelaza (II) lub innych metali przejściowych, do znacznie bardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego $\cdot\text{OH}$:



Rodnik hydroksylowy jest najbardziej szkodliwym oksydantem, zdolnym do reakcji ze wszystkimi związkami występującymi w organizmie. Ma bardzo krótki okres półtrwania i jego aktywność jest ograniczona do miejsca powstania. Reaguje głównie z rodnikami alkilowymi odrywając atom wodoru lub w reakcjach addycji do wiązań podwójnych z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi.

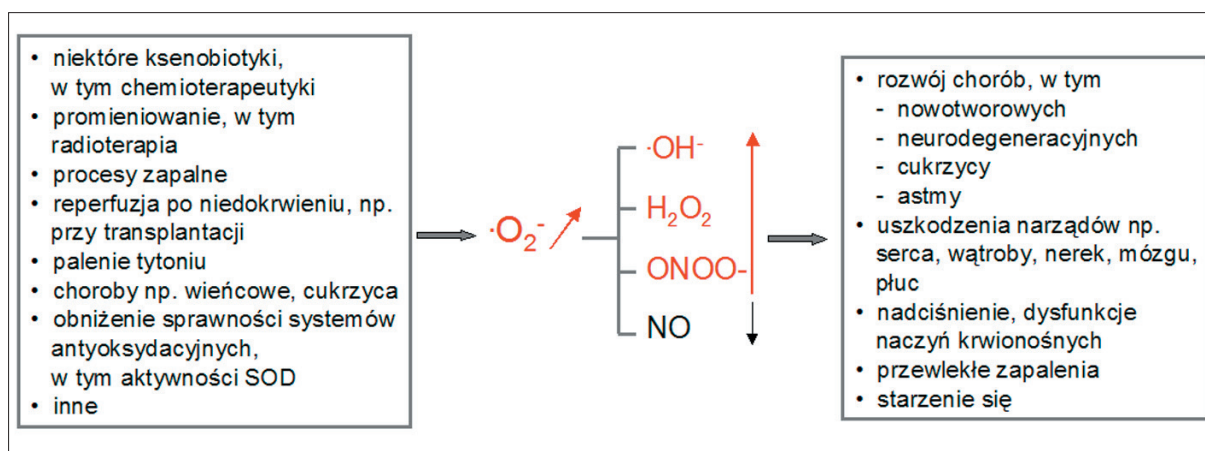
Nadtlenoazotyn (ONOO⁻; peroxyntirite) powstający w reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z rodnikiem tlenu azotu NO:



jest również szkodliwy dla komórek, wchodząc w reakcje głównie z lipidami i białkami [73], powodując oksydację kwasów tłuszczowych, nitrozylację reszt tyrozyny w centrach aktywnych wielu enzymów, oraz grup tiolowych w zredukowanym glutationie [16,36]. Indukuje również pęknięcia nici DNA, nitrowanie lub dezaminację zasad azotowych w kwasach nukleinowych.

Reaktywne formy tlenu indukują zatem wiele uszkodzeń struktur komórkowych [9] (ryc. 1).





Ryc. 1. Nadmiar reaktywnych form tlenu jest następstwem zaburzenia równowagi między szybkością ich powstawania oraz zdolnością komórki do ich usuwania. Do najczęstszych przyczyn podwyższenia poziomu ROS należą: podwyższony poziom niektórych ksenobiotyków np. przy stosowaniu chemioterapii, długotrwałe działanie promieniowania np. w radioterapii, przewlekłe choroby, głównie związane z procesami zapalnymi, reperfuza po niedokrwieniu narządów np. przy zawale czy transplantacji, palenie tytoniu i wiele innych. Nadmiar ROS pojawia się również wraz z obniżeniem sprawności systemów antyoksydacyjnych np. obniżeniem aktywności enzymów usuwających ROS czy poziomu glutationu. Zwiększenie stężenia $\cdot\text{O}_2^-$ oraz jego pochodnych: $\cdot\text{OH}$, ONOO^- , H_2O_2 , a także obniżenie stężenia NO, powoduje wiele zmian na poziomie molekularnym prowadzących do modyfikacji makrocząsteczek: lipidów, białek, kwasów nukleinowych i polisacharydów. Nagromadzenie takich zmian uszkadza struktury komórkowe i wprowadza zmiany genetyczne. W konsekwencji, oprócz naturalnych procesów, takich jak starzenie się organizmu, dochodzi do wielu zmian patologicznych, w tym rozwoju chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, naczyniowych, przewlekłych zapaleń oraz uszkodzeń narządów

W ilościach fizjologicznych, reaktywne formy tlenu nie tylko nie są szkodliwe, ale pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych [103]. Nadtlenek wodoru obecny w komórce w niskich stężeniach pełni funkcję wtórnego przekaźnika informacji, który m.in. indukuje fosforylację tyrozyny w białkach aktywujących szlak kinaz MAP (mitogen-activated protein), syntezę DNA oraz wywołuje chemotaksję [75]. Anionorodnik ponadtlenkowy może działać jako czynnik wzrostu regulujący szlak Rac/Ras-oksydaza NADH-MAPK [16]. Tlenek azotu jest z kolei głównym czynnikiem rozkurczowym naczyń krwionośnych i mięśni gładkich, modulatorem przekazywania sygnałów w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym oraz pełni istotną rolę w neutralizacji patogenów przez neutrofile i makrofagi [16].

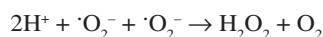
Nadmiar reaktywnych form tlenu pojawia się w sytuacjach, gdy organizm poddany jest długotrwałemu działaniu czynników fizycznych, takich jak promieniowanie jonizujące, ultradźwięki, czy promieniowanie nadfioletowe oraz chemicznych, w tym głównie ksenobiotyków, do których należą niektóre składniki pożywienia, czy dymu tytoniowego, leki i związki wchłaniane przez organizm z zanieczyszczonego środowiska. Taka sytuacja zdarza się również w wielu stanach patologicznych, np. w zapaleniu i związanych z nim chorobach, a także po zastosowaniu niektórych procedur medycznych np. radioterapii czy reperfuzy niedokrwionego obszaru mięśnia sercowego lub przeszczepionego narządu.

Nadmiar RFT jest wynikiem zaburzeń równowagi między szybkością ich powstawania i zdolnością komórki do ich neutralizacji. Przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu chronią komórkę różne niskocząsteczkowe związki organiczne oraz układy enzymatyczne. Do najważniejszych enzymów regulujących poziom reaktywnych form tlenu w organizmie należą dysmutazy ponadtlenkowe, katalizujące reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlen-

kowego do nadtlenu wodoru i tlenu oraz katalaza należąca do hemoprotein i katalizująca reakcję dysproporcjonowania nadtlenu wodoru, a także peroksydaza glutationowa, redukująca H_2O_2 do wody. Zmniejszenie aktywności tych enzymów prowadzi do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu, a powstający stres oksydacyjny może doprowadzić do zmian nowotworowych, powstania chorób neurodegeneracyjnych, miażdżycy, cukrzycy oraz uszkodzeń narządów, głównie serca, nerek, wątroby i mózgu.

DYSMUTAZY PONADTLENKOWE (SOD)

Dysmutazy ponadtlenkowe przekształcają anionorodnik ponadtlenkowy w nadtlenek wodoru i cząsteczkę tlenu według reakcji dysproporcjonowania:



Reakcja ta zachodzi wskutek interakcji anionorodnika z jonami metali obecnymi w centrum katalitycznym enzymu. Historia odkrycia dysmutazy ponadtlenkowej i funkcje jakie pełnią poszczególne izoenzymy SOD w organizmie opisano w wielu pracach [43,84,104].

U ssaków można wyróżnić 3 izoformy dysmutazy ponadtlenkowej: enzym cytoplazmatyczny zawierający jony cynku i miedzi (CuZn-SOD; SOD-1), enzym mitochondrialny zawierający jony manganu (Mn-SOD; SOD-2) oraz enzym zewnątrzkomórkowy z jonami cynku i miedzi (EC-SOD; SOD-3) [29,67]. Enzymy te:

- zapewniają bezpośrednią ochronę przed szkodliwym działaniem anionorodnika ponadtlenkowego oraz pośrednio rodnika hydroksylowego, nadtlenuazotynu i innych RFT;
- stanowią osłonę dla tlenku azotu, głównie w krążeniu naczyniowym i w komórkach śródbłonna;

- utrzymują stężenie nadtlenu wodoru na poziomie odpowiednim do pełnienia przez ten związek funkcji cząsteczki sygnałowej.

Dysmutaza ponadtlenkowa SOD-1 występuje we wszystkich komórkach. W bardzo dużych ilościach obecna jest w komórkach ścian naczyń krwionośnych. Jest białkiem homodimerycznym o masie podjednostki około 16 kDa. Jest umiejscowiona przede wszystkim w cytoplazmie, ale również w jądrze komórkowym. W centrum katalitycznym występuje kation miedziowy, który reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym, natomiast atom cynku spełnia funkcję stabilizującą strukturę trzeciorzędową enzymu. Atomy metalu są połączone z apoenzymem za pomocą reszt histydynowych. Aktywność SOD-1 stanowi 50–80% całkowitej aktywności dysmutaz ponadtlenkowych [29]. Nadekspresja enzymu chroni naczynia krwionośne mięśni przed uszkodzeniami indukowanymi LDL (low density lipoproteins) oraz przed aktywacją kaspaz [34] i zmniejsza hipertrofię naczyń. Natomiast obniżenie aktywności enzymu, wywołujące stres oksydacyjny, prowadzi m.in. do śmierci neuronów i progresji nowotworów [98].

SOD-2, manganowa izoforma dysmutazy ponadtlenkowej (homotetramer o masie 88 kDa) występuje głównie w macierzy mitochondrialnej i jest pierwszą barierą chroniącą komórkę przed nadmiarem O_2^- . Mimo że aktywność enzymu stanowi zaledwie 2–12% całkowitej aktywności SOD [29], brak genu Mn-SOD jest letalny dla myszy [41]. Brak pozostałych izoform enzymu powoduje poważne zaburzenia w funkcjonowaniu organizmu i przyspiesza jego starzenie, ale nie prowadzi do śmierci [28]. Aktywność enzymu chroni komórki naczyń krwionośnych przed uszkodzeniem mitochondriów, rozwojem miażdżycy [7], fragmentacją DNA indukowaną LDL oraz aktywacją kaspaz [29,34]. Mn-SOD działa również jako represor rozwoju nowotworów [96].

SOD-3, zewnątrzkomórkowa izoforma SOD jest tetramerym o masie 135 kDa. Występuje w postaci niezwiązanej w osoczu krwi, limfie i innych płynach pozakomórkowych, a w postaci związanej z glikoamyloglikanem np. w przestrzeni międzykomórkowej między śródbłonkiem naczyń a mięśniami gładkimi naczyń [60]. EC-SOD podlega zwiększonej ekspresji w naczyniach krwionośnych o zaburzonym przepływie krwi [68]. Uważa się, że SOD-3 odpowiada za utrzymywanie odpowiedniego stężenia tlenu azotu w naczyniach krwionośnych, neutralizując nadmiar anionorodnika ponadtlenkowego [44,105]. W ten sposób pośrednio enzym ten przeciwdziała zwiększonemu ciśnieniu krwi. Stwierdzono również, że brak tego enzymu w ośrodkowym układzie nerwowym myszy powoduje zaburzenia w kaskadzie sygnałów związanej z procesami uczenia się [55,90].

EGZOGENNE DYSMUTAZY PONADTLENKOWE

Powiązanie niedoboru dysmutaz ponadtlenkowych z rozwojem groźnych chorób spowodowało wzrost zainteresowania tymi enzymami. Pod koniec lat siedemdziesiątych ub.w. wprowadzono do badań klinicznych Orgoteinę®, preparat enzymatyczny zawierający wołową dysmutazę ponadtlenkową SOD-1 [59]. Uzyskano obiecujące wyniki w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych, jednakże po-

jawiał się problem zwiększonej odpowiedzi immunologicznej organizmu ludzkiego na enzym pochodzenia zwierzęcego. Te i inne problemy, związane z kosztami i krótkim okresem półtrwania Orgoteiny® ostatecznie spowodowały wycofanie jej z rynku. Poszukiwania substytutu Orgoteiny® doprowadziły do opracowania dysmutazy ponadtlenkowej połączonej kowalencyjnie z łańcuchem glikolu polietylenowego (PEG-SOD). Enzym w takiej postaci wykazywał wprawdzie zmniejszoną immunogenność i cechował się zwiększonym okresem półtrwania od 6 minut (dla wyjściowego enzymu) do kilku godzin [33], ale miał niewielką zdolność do wnikania przez błony komórkowe. Wykonano wiele badań z PEG-SOD, również na modelach zwierzęcych. Stwierdzono m.in., że zastosowanie PEG-SOD chroni skórę, mięsień sercowy, wątrobę i nerki przed uszkodzeniami niedokrwiennie-reperfuzyjnymi [97]. Z kolei SOD połączona z lecytyną chroniła komórki śródbłonka przed uszkodzeniem wywołanym przez niedotlenienie i reperfuzyję [47,85]. Interesujące wyniki uzyskano również z rekombinowanym enzymem zamkniętym w kapsułkach liposomalnych np. zastosowanie tej postaci w leczeniu bólu u pacjentów z chorobą Peyroniego dało poprawę w 89% przypadków [76]. Można przytoczyć jeszcze wiele przykładów obiecujących wyników badań *in vitro* i na modelach zwierzęcych, a także badań klinicznych.

MIMETYKI DYSMUTAZ PONADTLENKOWYCH (SODm)

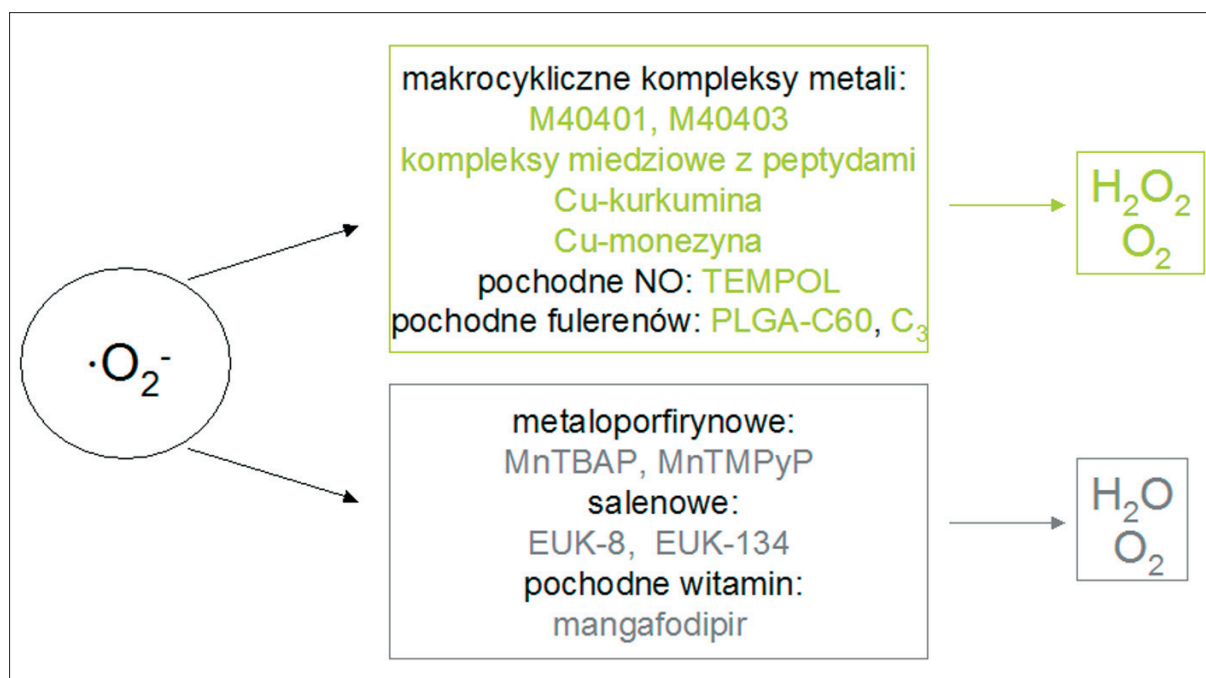
Głównym problemem z preparatami enzymatycznymi jest ich wysoka masa cząsteczkowa i gęstość ładunku, co powoduje, że wyniki farmakodynamiczne i farmakokinetyczne są niezadowolające. Stąd równoległe trwają poszukiwania niskocząsteczkowych związków, które wykazywałyby aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i byłyby zdolne redukować anionorodnik ponadtlenkowy do H_2O_2 . Obecnie wyraźnie zaznacza się podział na związki o aktywności dysmutazy oraz takie, które oprócz tej aktywności wykazywałyby, podobnie jak katalaza, zdolność do dysproporcjonowania nadtlenu wodoru (ryc. 2). Podstawą takiego podziału są poglądy, że neutralizacja anionorodnika ponadtlenkowego jest niewystarczająca, a gromadzący się nadtlenek wodoru może osiągnąć stężenie toksyczne dla komórki. W tej kwestii nie ma jednoznacznych rozstrzygnięć. Stąd w dalszej części artykułu opisano budowę, właściwości i zastosowanie niektórych grup tych związków przyjmując jako podstawę podziału ich strukturę, a nie aktywność chemiczną.

MIMETYKI SOD ZAWIERAJĄCE ATOMY METALI

Wiele lat temu zauważono, że niektóre związki kompleksowe metali przejściowych, zwłaszcza manganu czy miedzi, mogą reagować z anionorodnikiem ponadtlenkowym w sposób przypominający aktywność natywnych dysmutaz ponadtlenkowych. Stąd nazwa mimetyki SOD (SODm). Przykładami mogą być aminokwasowe kompleksy miedzi, czy związki manganu z kwasem mlekowym, cytrynowym czy szczawiovym [4] oraz takie związki jak Mn-Desferal [12] i niektóre leki przeciwzapalne [92]. Związki te były jednak nietrwałe, a ich aktywność zbyt mała.

Dotąd opisano wiele mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej zawierających jony metali przejściowych o różnej stabilności i aktywności. Związki te podzielono na trzy

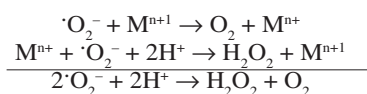




Ryc. 2. Podział mimetyków SOD ze względu na aktywność katalityczną. Kolorem zielonym wyróżniono mimetyki o aktywności wyłącznie dysmutazy ponadtlenkowej, natomiast szarym te związki, które oprócz aktywności dysmutazy mają aktywność katalazy. Produktem końcowym aktywności pseudoenzymatycznej mimetyków pierwszej grupy jest zgodnie z reakcją dysproporcjonowania: $2\text{H}^+ + \cdot\text{O}_2^- + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$, nadtlenek wodoru i tlen, natomiast w drugim przypadku, po pierwszej reakcji następuje kolejna reakcja dysproporcjonowania: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, w której nadtlenek wodoru jest rozkładany do wody i tlenu. Trwa dyskusja, czy mimetyki mające wyłącznie aktywność dysmutazy ponadtlenkowej nie powodują, że nadtlenek wodoru osiąga stężenie toksyczne dla komórki

duże grupy: metaloporfirynowe, makrocykliczne oraz Mn-saleny.

Mechanizm reakcji dysmutacji z udziałem mimetyków SOD związany jest z łatwością przechodzenia jonów metali, takich jak mangan, czy miedź na różne stopnie utlenienia. Reakcja ta wymaga przeniesienia elektronu z anionorodnika ponadtlenkowego na akceptor, którym jest jon metalu (M):



Reakcja ta nie wymaga natomiast zewnętrznego źródła energii, czy innych związków redukujących.

METALOPORFIRYNOWE MIMETYKI SOD

Wszystkie porfiryne mimetyki SOD mają również niską aktywność katalazy. Całkowita aktywność w kierunku rozkładu H_2O_2 wynosi mniej niż 1% aktywności natywnej katalazy, jednak jest ona wystarczająca, aby chronić komórki przed toksycznością związaną z wysokim stężeniem nadtlenu wodoru [25]. Aktywność katalazy porfirynowych mimetyków SOD jest możliwa dzięki jednowartościowemu utlenianiu pierścienia porfiryнового cząsteczki mimetyku. Hem, występujący w natywnych peroksydazach czy katalazach, należy również do pierścieni porfirynowych.

Jednym z pierwszych porfirynowych mimetyków SOD był MnTBAP (ryc. 3). Jest to wydajny „zmiatacz” anio-

no ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru, nadtlenuoazotynu czy rodników kwasów tłuszczowych [25,30,86]. Reakcja rozkładu nadtlenuoazotynu możliwa jest dzięki utworzeniu utlenionego kompleksu Mn(IV) oraz jego następującej redukcji do Mn(III) przez zewnątrzkomórkowe przeciwutleniacze, takie jak kwas askorbinowy czy glutation [54]. Badania z ostatnich lat udowodniły, że MnTBAP hamuje uwolnienie mitochondrialnego czynnika indukującego apoptozę (apoptosis inducing factor – AIF) [53]. AIF powoduje fragmentację DNA i kondensację chromatyny podczas apoptozy [69]. Uwalnianie AIF z mitochondriów indukuje np. śmierć neuronów [21] oraz towarzyszy ogniskowemu niedotlenieniu mózgu u myszy i szczurów, a podawanie im MnTBAP hamuje fragmentację DNA w jądrach komórek neuronalnych [53].

Reaktywne formy tlenu działając jako cząsteczki sygnałowe aktywują wiele szlaków, m.in. aktywują kinazę MAP oraz kinazy Ras i Akt w makrofagach, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- κ B, AP-1 (activator protein 1) oraz ATF (activating transcription factor) [40,94]. Te z kolei indukują uwalnianie TNF- α (tumor necrosis factor alpha), cytokinę odpowiedzialną m.in. za szok septyczny. Zastosowanie MnTBAP hamowało syntezę TNF- α przez makrofagi stymulowane bakteryjnym lipopolisacharydem, zmniejszając tym stan zapalny [93].

Innym mimetykiem SOD o budowie metalo-porfirynej jest MnTMPyP. Związek ten cechuje duża łatwość przenikania przez błony komórkowe, dlatego badana jest możliwość zastosowania tego związku w leczeniu patologii mózgu i ukła-

du nerwowego. Wykazano np. jego ochronne właściwości w zwierzęcym modelu niedokrwienia mózgu [82] oraz zaobserwowano właściwości kardioprotekcyjne w szczurzym modelu transplantacji [66]. Wydaje się, że wysoka aktywność dysmutazy/katalazy tego mimetyku odpowiada za właściwości neuroprotektoryjne. Co więcej, stwierdzono, że jest ona wyższa niż natywnych enzymów SOD i katalazy. Ponadto, MnTMPyP był wydajnym antyoksydantem zmniejszającym wydzielanie dialdehydu maleinowego (markera stresu oksydacyjnego), zapobiegającym peroksydacji lipidów oraz fragmentacji DNA indukowanej niedotlenieniem [82]. Związek MnTMPyP zmniejszał neurotoksyczność indukowaną bakteryjnymi lipopolisacharydami, oraz hamował syntezę hormonu prostaglandynowego PEG₂ [98]. Hormon ten indukuje aktywację astrocytów prowadzącą do uwolnienia cytokin prozapalnych, nadmiernego wytwarzania RFT oraz zwiększonej fagocytozy neuronów [57]. Niedawno wykazano, że aktywacja kaspazy 3, która towarzyszyła ostremu odrzuceniu przeszczepu, była hamowana przez MnTMPyP [70]. Z kolei pochodna o nazwie MnTE-2-PyP(5+) blokowała powstawanie reaktywnych form azotu zapobiegając S-nitrozylacji tioredoksyny 1 i apoptozie [89].

Poszukuje się bardziej skutecznych mimetyków SOD o budowie metalo-porfirynowej, np. prowadzone są badania mające na celu ustalenie zależności między rozkładem ładunku elektrostatycznego w cząsteczce mimetyku a wydajnością reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym [26,74].

MIMETYKI SALENOWE

Salen jest organicznym związkiem kompleksującym jony metali. Nazwa pochodzi od aldehydu salicylowego i diaminu etylenowej (salicyl aldehyde, ethylene diamine), które to związki są prekursorami salenów. Znane są dwa komercyjnie dostępne kompleksy salenowe zawierające jon manganu (III): EUK-8 oraz EUK-134 (ryc. 3). Związki te charakteryzują się dużą stabilnością oraz aktywnością SOD i katalazy, zmiatając właściwie wszystkie reaktywne formy tlenu. Jednakże reakcje te są odwracalne i jako potencjalne źródło reaktywnych form tlenu EUK-8, a zwłaszcza EUK-134 mogą stanowić duże zagrożenie dla komórek [32].

EUK-8 i EUK-134 wykazywały działanie ochronne w zwierzęcych modelach stresu oksydacyjnego towarzyszącego chorobom Alzheimera [14], Parkinsona [71], udarowi mózgu [6] oraz w stwardnieniu rozsianym [27]. Co więcej, EUK-8 oraz EUK-134 mają właściwości ochronne podczas zatrucia kadmem [102]. Wykazano również, że mimetyki salenowe podawane myszom z knock out MnSOD, dwukrotnie wydłużają czas życia zwierząt, a ponadto hamują kardiomiopatie będące następstwem usunięcia genu SOD-2 [62].

Niektóre mimetyki SOD działają ochronnie w stosunku do komórek poddanych działaniu substancji toksycznych. Przykładem mogą być opublikowane niedawno badania, wykazujące działanie ochronne EUK-134 i omawianego poniżej Tempolu na komórki nerkowe eksponowane na herbicydy [79].

MAKROCYKLICZNE KOMPLEKSY METALI

M40401 (ryc. 3) i M40403 są homologicznymi mimetykami SOD zawierającymi jon manganowy i wykazującymi

aktywność tylko wobec anionorodnika ponadtlenkowego. Związki te nie mają aktywności katalazy [78]. Mechanizm działania tych mimetyków jest podobny do pozostałych kompleksów manganu: jon manganu Mn²⁺ jest utleniany przez anionorodnik ponadtlenkowy, który redukuje się do H₂O₂. Utleniony jon manganu zostaje zredukowany przez komórkowe reduktory, takie jak glutation, dzięki czemu odzyskuje właściwości dysmutacyjnej.

M40403 należy do klasy bisykloheksylopirydynowych mimetyków, wykazujących wysoką aktywność SOD oraz zdolność przenikania przez błony. Te właściwości, a także jego niewielka masa cząsteczkowa, stwarzają możliwość zastosowania tego związku nawet w schorzeniach mózgu i układu nerwowego [83]. M40401 wykazywał ponad 100-krotną aktywność SOD w pH 7,4 w stosunku do swojego prekursora Mn40403. Aktywność M40401 była porównywalna z aktywnością natywnego enzymu SOD.

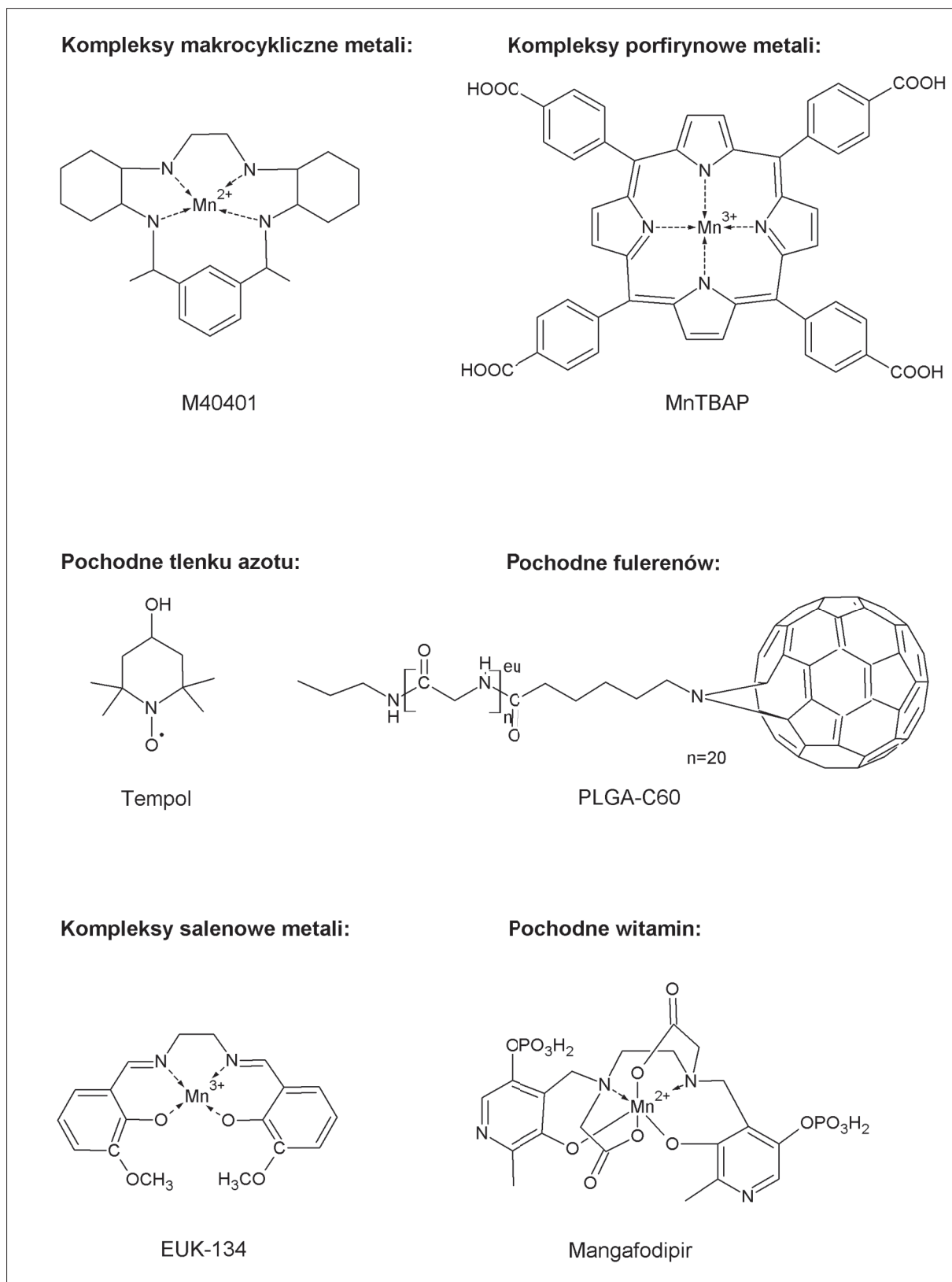
Potencjalne zastosowanie obu mimetyków testowane było na modelach zwierzęcych ze zmianami patologicznymi mózgu spowodowanymi przez RFT podczas niedokrwienia-reperfuzji [83]. Wcześniej ich działanie protekcyjne przebadano w chorobie wieńcowej występującej podczas reperfuzji poprzedzonej przedłużającym się niedokrwieniem [23]. M40401 wykazywał właściwości kardioprotekcyjne przez ograniczenie skutków niedokrwienia/reperfuzji również podczas transplantacji serca przeprowadzonej u szczurów [64]. Zastosowanie M40403 w mysim modelu hiperlipidemii i miażdżycy poprawiło zależną od śród-błonka wazorelaksację do poziomu uzyskanego w typie dzikim [42]. Stwierdzono także ograniczenie rozwoju procesu zapalnego po zastosowaniu M40401 w ostrym zapaleniu trzustki [22].

Wykazano również, że SODm mogą zapobiegać rozwojowi zapalenia, ponieważ przez obniżenie poziomu anionorodnika ponadtlenkowego, redukują poziom nadtlenuazotynu, czynnika prozapalnego powstającego w reakcji O₂⁻ z NO i powodującego m.in. modyfikację reszty tyrozyny w białkach do 3-nitrotyrozyny. Na przykład wykazano, że Mn40401 obniża stężenie anionorodnika zapobiegając powstawaniu nadtlenuazotynu [24]. SODm hamowały również infiltrację neutrofilów do miejsc zapalnych oraz uwalnianie cytokin prozapalnych [61,77].

Wadą obu związków jest ich niestabilność w pH poniżej 6,0. Zmniejsza to możliwość ich zastosowania w chorobach niedokrwiniowych, gdyż podczas zmian patologicznych pH środowiska znacznie się obniża [83].

MANGAFODIPIR (MnDPP)

Mangafodipir jest pochodną witaminy B6 (difosforan dipirydoksalu, DPP) w kompleksie z jonem manganu (ryc. 3). Od wielu lat używany jest jako związek kontrastujący w rezonansie magnetycznym wątroby i znany jest pod komercyjną nazwą Teslascan®. Stosunkowo niedawno odkryto, że mangafodipir ma dodatkowo właściwości antyoksydacyjne, jednak nadal mało jest informacji na ten temat. W 1999 r. odkryto aktywność SOD mangafodipiru [15], a kilka lat później udowodniono, że związek ten wykazywał właściwości ochronne kardiomiocytów [45] oraz chronił wątrobę przed uszkodzeniami w zwierzęcych modelach terapii przeciw-



Ryc. 3. Budowa związków należących do różnych grup mimetyków SOD

nowotworowej [11]. W kolejnych badaniach zaobserwowano, że mangafodipir wykazywał również aktywność katalazy oraz reduktazy glutationowej, zapobiegał wyczerpaniu

się aktywnej, zredukowanej postaci glutationu w komórce i neutralizował działania niepożądane leków przeciwnowotworowych, takich jak paclitaxel, oxaliplatin czy 5-fluoro-

uracyl, polegające na nadmiernym wytwarzaniu H_2O_2 [2]. Zastosowanie MnDPDP nie tylko chroniło prawidłowe komórki przed szkodliwym działaniem leków przeciwnowotworowych, ale także zwiększało ich aktywność przeciwnowotworową. Komórki nowotworowe mają mniej wydajne systemy naprawcze i ochronne, a wyjściowe stężenie nadtlenu wodoru jest wyższe niż w przypadku komórek prawidłowych [52]. Stąd, komórki te są bardziej wrażliwe na dodatkową ilość H_2O_2 dostarczaną przez leki.

KOMPLEKSY MIEDZIOWE

Dysmutaza nadtlenu SOD-1 w swoim centrum katalitycznym zawiera jon miedziowy, dlatego też w poszukiwaniu skutecznych mimetyków tej izoformy enzymu zbadano wiele kompleksów miedziowych. Odkryto dwa peptydy zdolne wiązać jony miedzi: acetylowaną postać tripeptydu His-Val-His-COAc oraz tetrapeptydu His-Val-Gly-Asp-COAc. Struktura takich kompleksów przypomina strukturę centrum katalitycznego natywnego enzymu SOD-1 [13]. Oba peptydy tworzyły z miedzią trwałe kompleksy, nawet w niskim pH. Wprowadzenie cynku do opisywanych kompleksów miedzi powodowało ich precipitację, prawdopodobnie z powodu tworzenia się polipeptydowych kompleksów [13]. Mimo że oba związki wykazywały dużą aktywność dysmutazy nadtlenu (przy czym kompleks tripeptydowy był bardziej efektywny niż tetrapeptydowy), ich reaktywność była bardzo mała, więc ich terapeutyczne zastosowanie pozostaje znacznie ograniczone.

Inne interesujące badania przeprowadzono na kurkuminie. Dotyczyły one właściwości chelatowania jonów metali przez ten związek. Kurkumina jest naturalnym polifenolem występującym w roślinie *Curcuma longa* i jest głównym składnikiem przyprawy curry. Związek ten jest wydajnym przeciwutleniaczem o właściwościach przeciwpalniczych i przeciwnowotworowych [1]. Dodatkowo, związek ten opóźnia progresję choroby Alzheimera [10]. Ostatnio wykazano, że kompleks Cu-kurkumina miał wysoką aktywność dysmutazy nadtlenu. Co więcej, kompleks ten miał własności antyoksydacyjne, chroniąc kwasy tłuszczowe przed utlenianiem [8].

MIMETYKI EC-SOD

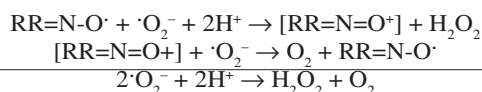
Przestrzeń międzykomórkowa uboga jest w przeciwutleniacze, dlatego też często komórki nie są wystarczająco chronione przed zewnątrzkomórkowymi reaktywnymi formami tlenu. Aby temu przeciwdziałać, zaczęto poszukiwać mimetyków, które współdziałałyby z zewnątrzkomórkową izoformą SOD. W 2005 r. otrzymano nowy mimetyk składający się z hydrofobowego rdzenia – polieterowego antybiotyku monezyny połączonego z dwuwartościowymi jonami metali [31]. Kompleks taki mógł wiązać się z błoną i neutralizować anionorodnik nadtlenu po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Przeanalizowano kilka kompleksów monezyny z różnymi metalami. Okazało się, że najwyższą aktywność SOD wykazywał kompleks Cu-monezyna w stosunku stechiometrycznym 2:1. Aktywność takiego kompleksu była porównywalna z aktywnością natywnego enzymu wyizolowanego z błony komórkowej erytrocytów wołowych (ponad 3000 U/mg). Nie wykazano żadnej aktywności wolnej monezyny, lub jej kompleksu z żelazem.

MIMETYKI SOD NIEZAWIERAJĄCE JONÓW METALI

Oprócz organicznych związków chelatujących jony miedzi czy manganu, istnieją związki, które nie zawierają w swojej cząsteczce jonów metali, jednakże wykazują wysoką aktywność rozkładu anionorodnika nadtlenu. Organiczne związki tlenu azotu, czy zmodyfikowane cząsteczki fulerenów mogą pełnić funkcje mimetyków SOD, ale mechanizm reakcji dysmutacji jest odmienny. Pomysł poszukania aktywności SOD w tej grupie związków opierał się na założeniu, że skompleksowany metal może ulegać dysocjacji, a nadmiar wolnej miedzi czy manganu może być toksyczny dla organizmu [35]. Przykłady mimetyków SOD wolnych od jonów metali zostaną omówione poniżej.

MIMETYKI SOD POCHODZĄCE OD TLENU AZOTU

Organiczne związki tlenu azotu mają aktywność dysmutazy nadtlenu. Nie mają one jednak aktywności katalazy i peroksydazy, więc nie są w stanie rozkładać nadtlenu wodoru powstającego w wyniku reakcji dysmutacji anionorodnika nadtlenu. Reakcja dysmutacji prowadzona przez mimetyki SOD pochodzące od rodnika tlenu azotu przedstawia się następująco:



W pierwszej reakcji anionorodnik nadtlenu utlenia tlenek azotu tworząc nietrwały kation oksaamoniowy ($=N=O^+$). Następująca reakcja powstałego kationu z kolejną cząsteczką anionorodnika nadtlenu redukuje go do wyjściowej cząsteczki mimetyku [48].

Najważniejszym mimetykiem należącym do tej rodziny jest Tempol (ryc. 3). Jest to rozpuszczalny w wodzie, niskocząsteczkowy związek zdolny do przechodzenia przez błonę komórkową. Związek ten jest pochodną TEMPO, nitroksylowego znacznika spinowego używanego w spektroskopii elektronowej rezonansu paramagnetycznego (EPR). Tempol neutralizuje cząsteczkę anionorodnika nadtlenu, rodnika hydroksylowego i nadtlenuazotynu, ale nie reaguje z H_2O_2 . Zmniejsza także liczbę wolnych jonów Fe^{2+} w komórce utleniając je do Fe^{3+} i ograniczając w ten sposób powstawanie rodnika hydroksylowego [19,20]. Tempol hamuje także nitrozylację tyrozyny wywołaną nadtlenuazotynem [17].

Przeprowadzono wiele doświadczeń *in vivo* na zwierzęcych modelach wielu chorób, dokumentując właściwości ochronne Tempolu, np. komórek nerwowych w dysfunkcji obwodowego układu nerwowego związanej z chorobą Parkinsona [56]. Tempol ograniczał również uszkodzenia serca, nerek czy mózgu w wyniku reperfuzji po niedokrwieniu narządów [65]. Dodatkowo, związek ten wykazywał korzystne działanie na komórki zmienione patologicznie w modelach nadciśnienia, cukrzycy czy stanów zapalnych [91]. W 2004 r. Tempol pozytywnie przeszedł I fazę badań klinicznych jako związek ochronny w chemio- i radioterapii skierowanej przeciwko nowotworowi mózgu. Korzyścią z jego stosowania był wzrost włosów w przypadkach łysienia po długotrwałej terapii przeciw-

nowotworowej [63]. Stwierdzono również, że Tempol obniżał ciśnienie krwi w modelach nadciśnienia u szczurów, przez hamowanie aktywności nerwów współczulnych [100] oraz stymulacji śródbłonna naczyń krwionośnych [81]. Jednakże mechanizm takiego działania Tempolu nie jest jak dotąd wyjaśniony.

Największą wadą Tempolu jest jego krótki czas półtrwania, wynoszący tylko 1 min [50]. Inną jego wadą jest z pewnością brak aktywności katalazy. Nadmiar nadtlenu wodoru powstający w wyniku działania Tempolu może być przekształcany przez mieloperoksydazę (MPO), enzym występujący w granulocytach obojętnochłonnych, w kwas chlorowy (I). Związek ten może ponadto powodować proteinurię w nerkach diabetyków [5].

MIMETYKI POCZODZĄCE OD ZMODYFIKOWANYCH FULERENÓW

Niedawno odkryto, że fuleren C_{60} , alotropowa postać węgla o kształcie futbolówki i jego pochodne cechują się interesującymi właściwościami, które mogą być użyte w medycynie [3]. Pochodne fulerenu C_{60} okazały się efektywnymi „zmiataczami” wolnych rodników o właściwościach dysmutazy ponadtlenkowej, dzięki występowaniu w ich strukturze wielu skumulowanych wiązań podwójnych o dużej reaktywności [49]. Aby zwiększyć rozpuszczalność C_{60} dołączono do fulerenu kowalencyjnie związany hydrofilowy „ogon”, który składał się z kwasów polikarboksylowych, np. z kwasu poli-L-glutaminowego (PLGA) [37, 39, 101]. Wykazano, że związek PLGA- C_{60} (ryc. 3) wykazywał ośmiokrotnie mniejszą aktywność niż natywny enzym SOD [39].

Innym mimetykiem zaprojektowanym w oparciu o fuleren C_{60} był C3. Zawierał trzy grupy karboksylowe przyłączone kowalencyjnie do powierzchni kuli węglowej fulerenu [3]. Związek ten przedłużał życie myszy, neutralizował nadmiar anionorodnika ponadtlenkowego gromadzącego się w mitochondriach. Wykazywał właściwości neuroprotektoryjne zmniejszając negatywne skutki stresu oksydacyjnego w starzejących się komórkach nerwowych przez

obniżenie poziomu reaktywnych form tlenu pochodzenia mitochondrialnego [72].

PODSUMOWANIE

Choroby nowotworowe, neurodegeneracyjne oraz choroby układu krwionośnego należą do chorób cywilizacyjnych, które w dużym stopniu są związane z rozwojem przemysłu, wzrostem zanieczyszczenia środowiska naturalnego i wzrostem poziomu stresu w populacji ludzkiej. Leczenie pacjentów, szczególnie z chorobami nowotworowymi, powoduje pogorszenie ich ogólnego stanu zdrowia. Zminimalizowanie działań niepożądanych, związanych z długotrwałą radio- i chemioterapią, jest jednym z celów współczesnej medycyny. Pacjenci, którzy zostali wyleczeni z choroby nowotworowej, rzadko odzyskują pełną sprawność. Poprawa indeksu terapeutycznego jest istotnym celem nie tylko w przypadku poszczególnych pacjentów, ale także dla społeczeństwa, które ponosi koszty ostrych i przewlekłych działań niepożądanych. Zastosowanie niskocząsteczkowych mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej w badaniach *in vitro* oraz na modelach zwierzęcych wskazuje na możliwość użycia tych związków do ochrony zdrowych tkanek [2, 18, 46, 80, 99]. Usuwanie nadmiaru reaktywnych form tlenu, będących efektem ubocznym stosowanych terapii, jest prawdopodobnym mechanizmem działania mimetyków SOD zmniejszającym uszkodzenia serca, mózgu i innych narządów, oraz ograniczającym zmiany powodowane starzeniem się organizmu. Jednakże odnotowano również niepożądane działania mimetyków SOD. Na przykład w komórkach progenitorowych oligodendrocytów, bardzo wrażliwych na stres oksydacyjny ze względu na niski poziom antyoksydantów i wysoki poziom żelaza, MnTBAP wzmacniał proapoptotyczny wpływ dopaminy [38]. Wymienione w artykule zalety i wady mimetyków SOD składają o podjęcia dalszych badań nad ich zastosowaniem w nowoczesnej medycynie. Zastosowanie mimetyków SOD jest rozważane w takich chorobach, jak cukrzyca, choroby naczyniowe np. miażdżyca, choroby neurodegeneracyjne, przewlekłe zapalenia, a także jako terapia wspomagająca w transplantologii, przy reperfuzji obszarów niedokrwionych, w radio- i chemioterapii.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aggarwal B.B., Kumar A., Bharti, A.C.: Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*, 2003; 23: 363–398
- [2] Alexandre J., Nicco C., Chereau C., Laurent A., Weill B., Goldwasser F., Batteux F.: Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2006; 98: 236–244
- [3] Alli S.S., Hardt J.I., Quick K.L., Kim-Han J.S., Erlanger B.F., Huang T.T., Epstein C.J., Dugan L.L.: A biologically effective fullerene (C_{60}) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 37: 1191–1202
- [4] Archibald F.S., Fridovich I.: The scavenging of superoxide radical by manganese complexes: *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982; 214: 452–463
- [5] Asaba K., Tojo A., Onozato M.L., Goto A., Fujita T.: Double-edged action of SOD mimetic in diabetic nephropathy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2007; 49: 13–19
- [6] Baker K., Marcus C.B., Huffman K., Kruk H., Malfroy B., Doctrow S.R.: Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998; 284: 215–221
- [7] Ballinger S.W., Patterson C., Knight-Lozano C.A., Burlow D.L., Conklin C.A., Hu Z., Reuf J., Horaist C., Lebovitz R., Hunter G.C., McIntyre K., Runge M.S.: Mitochondrial integrity and function in atherosclerosis. *Circulation*, 2002; 106: 544–549
- [8] Barika A., Mishra B., Shenb L., Mohana H., Kadamc R.M., Duttad S., Zhangb H.Y., Priyadarsini K.I.: Evaluation of a new copper(II) – curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005; 39: 811–822
- [9] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2003, wyd. 2
- [10] Baum L., Ng A.: Curcumin interaction with copper and iron suggest one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animals models. *J. Alzheimers Dis.*, 2004; 6: 367–377
- [11] Bedda S., Laurent A., Conti F., Chéreau C., Tran A., Tran-Van Nhieu J., Jaffray P., Soubrane O., Goulvestre C., Calmus Y., Weill B., Batteux F.: Mangafodipir prevents liver injury induced by acetaminophen in the mouse. *J. Hepatol.* 2003; 39: 765–972
- [12] Beyer W.F., Fridovich I.: Superoxide dismutase mimic prepared from desferrioxamine and manganese dioxide. *Methods. Enzymol.*, 1990; 186: 242–249

- [13] Boka B., Myari A., Sovago I., Hadjiladis N.: Copper(II) and zinc(II) complexes of the peptides Ac-HisValHis-NH₂ and Ac-HisValGlyAsp-NH₂ related to the active site of the enzyme CuZnSOD. *J. Inorg. Chem.*, 2004; 98: 113–122
- [14] Bruce A.J., Malfroy B., Baudry M.: β -amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 2312–2316
- [15] Brurok H., Ardenkjaer-Larsen J.H., Hansson G., Skarra S., Berg K., Karlsson J.O.G., Laursen I., Jynge P.: Manganese dipyrroxyl diphosphate: MRI contrast agent with antioxidative and cardioprotective properties? *In vitro* and *ex vivo* assessments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 254: 768–772
- [16] Buettler T.M., Krauskopf A., Ruegg U.T.: Role of superoxide as a signaling molecule. *News Physiol. Sci.*, 2004; 19: 120–123
- [17] Carroll R.T., Galatsis P., Borosky S., Kopec K.K., Kumar V., Althaus J.S., Hall E.D.: 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000; 13: 294–300
- [18] Chae H.J., Kim H.R., Kim D.S., Woo E.R., Cho Y.G., Chae S.W.: Saeng-Ji-Hwang has a protective effect on adriamycin-induced cytotoxicity in cardiac muscle cells. *Life Sci.*, 2005; 76: 2027–2042
- [19] Charloux C., Paul M., Loisanec D., Astier A.: Inhibition of hydroxyl radical produced by lactobionate, adenine, and tempol. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 19: 669–704
- [20] Chen Y.F., Cowley A.W., Zou A.P.: Increased H₂O₂ counters the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2003; 285: R827–R833
- [21] Cheung E.C., Melanson-Drapeau L., Cregan S.P., Vanderluit J.L., Ferguson K.L., McIntosh W.C., Park D.S., Bennett S.A., Slack R.S.: Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms. *J. Neurosci.*, 2005; 25: 1324–1334
- [22] Cuzzocrea S., Genovese T., Mazzon E., Di Paola R., Muia C., Britti D., Salvemini D.: Reduction in the development of cerulein-induced acute pancreatitis by treatment with M40401, a new selective superoxide dismutase mimetic. *Shock*, 2004; 22: 254–261
- [23] Cuzzocrea S., Misko T.P., Costantino G., Mazzon E., Micali A., Caputi A.P., Macarthur H., Salvemini D.: Beneficial effects of peroxynitrite decomposition catalyst in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *FASEB J*, 2000; 14: 1061–1072
- [24] Cuzzocrea S., Zingarelli B., Caputi A.P.: Role of constitutive nitric oxide synthase activation and peroxynitrite production in a rat model of splanchnic artery occlusion shock. *Life Sci.*, 1998; 63: 789–800
- [25] Day B.J., Batinic-Haberle I., Crapo J.D.: Metalloporphyrins are potent inhibitors of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999; 26: 730–736
- [26] DeFreitas-Silva G., Rebouças J.S., Spasojević I., Benov L., Idemori Y.M., Batinić-Haberle I.: SOD-like activity of Mn(II) beta-octabromo-meso-tetrakis(N-methylpyridinium-3-yl)porphyrin equals that of the enzyme itself. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008; 477: 105–112
- [27] Doctrow S.R., Huffman K., Marcus C.B., Musleh W., Bruce A., Baudry M., Malfroy B.: Salen-manganese complexes: combined superoxide dismutase/catalase mimics with broad pharmacological efficacy. *Adv. Pharmacol.*, 1997; 38: 247–269
- [28] Elchuri S., Oberley T.D., Qi W., Eisenstein R.S., Jackson Roberts L., Van Remmen H., Epstein C.J., Huang T.T.: CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*, 2005; 24: 367–380
- [29] Faraci F.M., Didion S.P.: Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004; 24: 1367–1373
- [30] Faulkner K.M., Liochev S.I., Fridovich I.: Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase *in vitro* and substitute for it *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 23471–23476
- [31] Fisher A.E.O., Lau G., Naughton D.P.: Lipophilic ionophore complexes as superoxide dismutase mimetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 329: 930–933
- [32] Fucassi F., Lowe J.E., Pavey K.D., Shah S., Faragher R.G., Green M.H., Paul F., O'Hare D., Cragg P.J.: α -Lipoic acid and glutathione protect against the prooxidant activity of SOD/catalase mimetic manganese salen derivatives. *J. Inorg. Biochemistry*, 2007; 101: 225–232
- [33] Galíñanes M., Ferrari R., Qiu Y., Cargnoni A., Ezrin A., Hearse D.J.: PEG-SOD and myocardial antioxidant status during ischaemia and reperfusion: dose-response studies in the isolated blood perfused rabbit heart. *J. Mol. Cell. Card.*, 1992; 24: 1021–1030
- [34] Guo Z.M., Van Remmen H., Yang H., Chen X., Mele J., Vijg J., Epstein C.J., Ho Y.S., Richardson A.: Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2001; 21: 1131–1138
- [35] Hahn S.M., Krishna C.M., Samuni A., Mitchell J.B., Russo A.: Mn(III)-desferrioxamine superoxide dismutase-mimic: alternative modes of action. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991; 288: 215–219
- [36] Halliwell B., Gutteridge J.M.: *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, UK, Oxford University Press, 1999
- [37] Hao J., Li H., Liu W., Hirsch A.: Well-defined self-assembling supramolecular structures in water containing a small amount of C₆₀. *Chem. Commun.*, 2004: 602–603
- [38] Hemdan S., Almazan G.: Deficient peroxide detoxification underlies the susceptibility of oligodendrocyte progenitors to dopamine toxicity. *Neuropharmacology*, 2007; 52: 1385–1395
- [39] Higashi N., Shosu T., Koga T., Niwa M., Tanigawa T.: pH-responsive, self-assembling nanoparticle from a fullerene-tagged poly(L-glutamic acid) and its superoxide dismutase mimetic property. *J. Colloid Interface Sci.*, 2006; 298: 118–123
- [40] Hsu T.C., Young M.R., Cmarik J., Colburn N.H.: Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 28: 1338–1348
- [41] Huang T.T., Carlson E.J., Kozy H.M., Mantha S., Goodman S.I., Ursell P.C., Epstein C.J.: Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 31: 1101–1100
- [42] Jiang F., Guo Y., Salvemini D., Dusting G.J.: Superoxide dismutase mimetic M40403 improves endothelial function in apolipoprotein(E)-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.*, 2003; 139: 1127–1134
- [43] Johnson F., Giulivi C.: Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Aspects. Med.* 2005; 26: 340–352
- [44] Jung O., Marklund S.L., Geiger H., Pedrazzini T., Busse R., Brandes R.P.: Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability. *In vivo* and *ex vivo* evidence from ecSOD-deficient mice. *Circ. Res.*, 2003; 93: 622–629
- [45] Karlsson J.O., Brurok H., Eriksen M., Towart R., Toft K.G., Moen O., Engebretsen B., Jynge P., Refsum H.: Cardioprotective effects of the MR contrast agent MnDPDP and its metabolite MnPLED upon reperfusion of the ischemic porcine myocardium. *Acta Radiol.*, 2001; 42: 540–547
- [46] Konorev E.A., Kennedy M.C., Kalyanaram B.: Cell-permeable superoxide dismutase and glutathione peroxidase mimetics afford superior protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999; 368: 421–428
- [47] Koo D.D., Welsh K.I., West N.E., Channon K.M., Penington A.J., Roake J.A., Morris P.J., Fuggle S.V.: Endothelial cell protection against ischemia/reperfusion injury by lecitinized superoxide dismutase. *Kidney Int.*, 2001; 60:786–796
- [48] Krishna M.C., Grahame D.A., Samuni A., Mitchell J.B., Russo A.: Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 5537–5541
- [49] Krusic P., Wasserman E., Keizer P.N., Morton J.R., Preston K.F.: Radical reactions of C₆₀. *Science*, 1991; 254: 1183–1185
- [50] Kuppusamy P., Wang P., Shankar R.A., Ma L., Trimble C.E., Hsia C.J., Zweier J.L.: *In vivo* topical EPR spectroscopy and imaging of nitroxide free radicals and polynitroxyl-albumin. *Magn. Reson. Med.*, 1998; 40: 806–811
- [51] Lassegue B., Clempus R.E.: Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2003; 285: R277–R297
- [52] Laurent A., Nicco C., Chereau C., Goulvestre C., Alexandre J., Alves A., Levy E., Goldwasser F., Panis Y., Soubrane O., Weill B., Batteux F.: Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res.*, 2005; 65: 948–956
- [53] Lee B.I., Chan P.H., Kim G.W.: Metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic attenuates the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and the subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 2005; 36: 2712–2717
- [54] Lee J., Hunt J.A., Groves J.T.: Manganese porphyrins as redox-coupled peroxynitrite reductases. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998; 120: 6053–6061

- [55] Levin E.D., Christopher N.C., Crapo J.D.: Memory decline of aging reduced by extracellular superoxide dismutase overexpression. *Behav. Genet.*, 2005; 35: 447–453
- [56] Liang Q., Smith A.D., Pan S., Tyurin V.A., Kagan V.E., Hastings T.G., Schor N.F.: Neuroprotective effects of TEMPOL in central and peripheral nervous system models of Parkinson's disease. *Biochem. Pharm.*, 2005; 70: 1371–1381
- [57] Liu B., Gao H.M., Wang J.Y., Jeohn G.H., Cooper C.L., Hong J.S.: Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2002; 962: 318–331
- [58] Lopez-Lazaro M.: Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett.*, 2007; 252: 1–8
- [59] Marberger H., Huber W., Bartsch G., Schulte T., Swoboda P.: ORGOTEIN: a new antiinflammatory metalloprotein drug evaluation of clinical efficacy and safety in inflammatory conditions of the urinary tract. *Int Urol. Nephrol.*, 1974; 6: 61–74
- [60] Marklund S.L.: Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982; 79: 7634–7638
- [61] Masini E., Cuzzocrea S., Mazzon E., Marzocca C., Mannaioni P.F., Salvemini D.: Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischaemia and reperfusion injury *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, 2002; 136: 905–917
- [62] Melov S., Doctrow S.R., Schneider J.A., Haberson J., Patel M., Coskun P.E., Huffman K., Wallace D.C., Malfroy B.: Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J. Neurosci.*, 2001; 21: 8348–8353
- [63] Metz J.M., Smith D., Mick R., Lustig R., Mitchell J., Cherakuri M., Glatstein E., Hahn S.M.: A phase I study of topical tempol for the prevention of alopecia induced by whole brain radiotherapy. *Clinic. Cancer Res.*, 2004; 10: 6411–6417
- [64] Murata S., Miniati D.N., Kown M.H., Koransky M.L., Lijkwan M.A., Balsam L.B., Robbins R.C.: Superoxide dismutase mimetic M40401 reduces ischemia-reperfusion injury and graft coronary artery disease in rodent cardiac allografts. *Transplantation.*, 2004; 78: 1166–1171
- [65] Muscoli C., Cuzzocrea S., Riley D.P., Zweier J.L., Thiemermann C., Wang Z. Q., Salvemini D.: On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br. J. Pharmacol.*, 2003; 140: 445–460
- [66] Nilakantan V., Zhou X., Hilton G., Shi Y., Baker J.E., Khanna A.K., Pieper G.M.: Antagonizing reactive oxygen by treatment with a manganese (III) metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimetic in cardiac transplants. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2006; 131: 898–906
- [67] Packer L.: *Methods in Enzymology*, t. 349 Superoxide Dismutase, California Academic Press, San Diego 2002
- [68] Passerini A.G., Polacek D.C., Shi C., Francesco N.M., Manduchi E., Grant G.R., Pritchard W.F., Powell S., Chang G.Y., Stoeckert C.J., Davies P.F.: Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004; 101: 2482–2487
- [69] Penninger J.M., Kroemer G.: Mitochondria, AIF and caspases-rivaling for cell death execution. *Nat. Cell Biol.*, 2003; 5: 97–99
- [70] Pieper G.M., Nilakantan V., Nguyen T.K., Hilton G., Roza A.M., Johnson C.P.: Reactive oxygen and reactive nitrogen as signaling molecules for caspase 3 activation in acute cardiac transplant rejection. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2008; 10: 1031–1040
- [71] Pong K., Doctrow S. R., Baudry M.: Prevention of 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine-induced nitration of tyrosine hydroxylase and neurotoxicity by EUK-134, a superoxide dismutase and catalase mimetic, in cultured dopaminergic neurons. *Brain Res.*, 2000; 881: 182–189
- [72] Quick K.L., Ali S.S., Arch R., Xiong C., Wozniak D., Dugan L.L.: A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice. *Neurobiol. Aging*, 2008; 29: 117–128
- [73] Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C., Castro L.: Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 1451–1464
- [74] Rebouças J.S., DeFreitas-Silva G., Spasojević I., Idemori Y.M., Benov L., Batinić-Haberle I.: Impact of electrostatics in redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrins: protection of SOD-deficient *Escherichia coli* via alternative mechanism where Mn porphyrin acts as a Mn carrier. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008; 45: 201–210
- [75] Rhee S.G.: Redox signaling: hydrogen peroxide as an intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.*, 1999; 31: 53–59
- [76] Riedel C.R., Sternig P., Gallé G., Langmann F., Vcelar B., Vorauer K., Wagner A., Katinger H., Pflüger H.: Liposomal recombinant human superoxide dismutase for the treatment of Peyronie's disease: a randomized placebo-controlled double-blind prospective clinical study. *Eur. Urol.*, 2005; 48: 656–661
- [77] Salvemini D., Mazzon E., Dugo L., Riley D.P., Serrano I., Caputi A.P., Cuzzocrea S.: Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403. *Br. J. Pharmacol.*, 2001; 132: 815–827
- [78] Salvemini D., Wang Z.Q., Zweier J.L., Samouilov A., Macarthur H., Misko T.P., Currie M.G., Cuzzocrea S., Sikorski J.A., Riley D.P.: A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science*, 1999; 286: 304–306
- [79] Samai M., Sharpe M.A., Gard P.R., Chatterjee P.K.: Comparison of the effects of the superoxide dismutase mimetics EUK-134 and tempol on paraquat-induced nephrotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 43: 528–534
- [80] Samlowski W.E., Petersen R., Cuzzocrea S., Macarthur H., Burton D., McGregor J.R., Salvemini D.: Nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase, M40403, inhibits dose-limiting hypotension associated with interleukin-2 and increases its antitumor effects. *Nat. Med.*, 2003; 9: 750–755
- [81] Sedeek M.H., Llinas M.T., Drummond H., Fortepiani L., Abram S.R., Alexander B.T., Reckelhoff J.F., Granger J.P.: Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension*, 2003; 42: 806–810
- [82] Sharma S.S., Gupta S.: Neuroprotective effect of MnTMPyP, a superoxide dismutase/catalase mimetic in global cerebral ischemia is mediated through reduction of oxidative stress and DNA fragmentation. *Eur. J. Pharm.*, 2007; 561: 72–79
- [83] Shimizu K., Rajapakse N., Horiguchi T., Payne R.M., Busija D.W.: Protective effect of a new nonpeptidyl mimetic of SOD, M40401, against focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.*, 2003; 963: 8–14
- [84] Skrzycki M., Czczot H.: Superoxide dismutase as a potential therapeutic agent. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2007; 16: 561–568
- [85] Suzuki J., Broeyer F., Cohen A., Takebe M., Burggraaf J., Mizushima Y.: Pharmacokinetics of PC-SOD, a lecithinized recombinant superoxide dismutase, after single- and multiple-dose administration to healthy Japanese and Caucasian volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, 2008; 48: 184–192
- [86] Szabo C., Day B.J., Salzman A.L.: Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages, using a novel mesoporphyrin superoxide dismutase analog and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett.*, 1996; 381: 82–86
- [87] Tanaka K., Kogawa K., Nishihori Y., Kuribayashi K., Nakamura K., Muramatsu H., Koike 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
- [88] Taniyama Y., Griendling K.K.: Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 2003; 42: 1075–1081
- [89] Tao L., Jiao X., Gao E., Lau W.B., Yuan Y., Lopez B., Christopher T., Ramachandra Rao S.P., Williams W., Southan G., Sharma K., Koch W., Ma X.L.: Nitrate inactivation of thioredoxin-1 and its role in post-ischemic myocardial apoptosis. *Circulation*, 2006; 114: 1395–1402
- [90] Thiels E., Urban N.N., Gonzalez-Burgos G.R., Kanterewicz B.I., Barrionuevo G., Chu C.T., Oury T.D., Klann E.: Impairment of long-term potentiation and associative memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 7631–7639
- [91] Thiemermann C.: Membrane-permeable radical scavengers (Tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit. Care Med.*, 2003; 31: S76–S84
- [92] Tian Y., Fang Y.Z., Sun C.P., Shen W.M., Luo Q.H., Shen M.C.: Effects of copper coordinate complexes on the scavenging of reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993; 191: 646–653
- [93] Tumorkhoo G., Koide N., Dagvadorj J., Hassan F., Islam S., Naiki Y., Mori I., Yoshida T., Yokochi T.: MnTBAP, a synthetic metalloporphyrin, inhibits production of tumor necrosis factor- α in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages cells via inhibiting oxidative stress-mediated p38 and SAPK/JNK signaling. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007; 49: 304–311
- [94] Turpaev K.T.: Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Moscow)*, 2002; 67: 281–292
- [95] Turrens J.F.: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Psychol.*, 2003; 552: 335–344

- [96] Van Remmen H., Ikeno Y., Hamilton M., Pahlavani M., Wolf N., Thorpe S.R., Alderson N.L., Baynes J.W., Epstein C.J., Huang T.T., Nelson J., Strong R., Richardson A.: Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol. Genomics*, 2003; 16: 29–37
- [97] Veronese F.M., Caliceti P., Schiavon O., Sergi M.: Polyethylene glycol-superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002; 54: 587–606
- [98] Wang T., Liu B., Qin L., Wilson B., Hong J.S.: Protective effect of the SOD/catalase mimetic MnTMPyP on inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuronal-glia cultures. *J. Neuroimmunol.*, 2004; 147: 68–72
- [99] Wangila G.W., Nagothu K.K., Steward R. III, Bhatt R., Iyere P.A., Willingham W.M., Sorenson J.R., Shah S.V., Portilla D.: Prevention of cisplatin-induced kidney epithelial cell apoptosis with a Cu superoxide dismutase-mimetic [copper2II(3,5-ditertiarybutylsalicylate)4(e-thanol)4]. *Toxicol. In Vitro*, 2006; 20: 1300–1312
- [100] Xu H., Fink G.D., Galligan J.J.: Tempol lowers blood pressure and sympathetic nerve activity but not vascular O_2^- in DOCA-salt rats. *Hypertension*, 2004; 43: 329–334
- [101] Yang J., Li L., Wang C.: Synthesis of a water soluble, monosubstituted C_{60} polymeric derivative and its photoconductive properties. *Macromol.*, 2003; 36: 6060–6065
- [102] Yang P.M., Chiu S.J., Lin L.Y.: Differential effects of salen and manganese-salen complex (EUK-8) on the regulation of cellular cadmium uptake and toxicity. *Toxicol. Sci.*, 2005; 85: 551–559
- [103] Zabłocka A., Janusz M.: The two faces of reactive oxygen species. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 118–124
- [104] Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J.: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 337–349
- [105] Zhang Y., Zhao W., Zhang H.J., Domann F.E., Oberley L.W.: Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res.*, 2002; 62: 1205–1212