

HEMOGLOBİN VE NİTRİT BAĞIMLI TİROZİN NİTRASYONU

HEMOGLOBIN AND NITRITE DEPENDENT TYROSINE NITRATION

Hasan KARAGEÇİLİ¹, Kamer KILINÇ²

ÖZET

Nitrik oksit (NO) oksihemoglobin ve oksimiyoglobin ile tepkimeye girmesi nitrat ve metHb veya metMb'nin meydana gelmesine neden olmaktadır. Nitratın tersine, nitrit NO oksidasyonunun zararsız bir son ürünü değildir. Hemoproteinlerden peroksidazların H₂O₂ varlığında nitrit oksidasyonuna neden oldukları gösterilmiştir. Hemoproteinlerin katalizlediği nitrit oksidasyonunda meydana gelen reaktif nitrojen oksitler, nitritin bakterisid ve sitotoksik etkilerinin sorumlusudurlar. Bu çalışmada Griess metodu ile hemoglobin tarafından H₂O₂ varlığında nitritin nitrata oksidasyonu araştırıldı.

Hem H₂O₂ hem de hemoglobin yokluğunda nitrit oksidasyonu gözlenmedi, bu da göstermektedir ki nitrit oksidasyonuna neden olan reaktif tür H₂O₂ ile hemoglobinin reaksiyonundan meydana gelen oksoferril kompleksidir (bileşik I). Bu çalışmada, peroksidaz enzimlerine benzer şekilde, hemoglobinin tirozin nitrasyonuna neden olduğu bulundu. Hemoglobinin katalizlediği tirozin nitrasyonu pH bağımlı olup, nitrasyonun optimum pH'si 6,0 dır. Hemoglobin ve H₂O₂ tirozin nitrasyonu için gerekli bileşenlerdir. Hemoglobin yokluğunda, çalışılan en düşük pH'de bile tirozin nitrasyonu gözlenmedi. Bununla beraber H₂O₂ varlığında hemoglobinin katalizlediği nitrit oksidasyonu esnasında, nitratlayıcı türler meydana getirilmektedir.

Sonuç olarak hemoglobin, H₂O₂ ve nitrit arasındaki reaksiyon serileri tarafından nitrojen dioksit radikali (NO₂[•]) ve/veya peroksinitrit benzeri reaktif türler meydana getirilmektedir ve bu türler tirozin nitrasyonundan sorumludurlar.

Anahtar Kelimeler: Nitratlar, Hemoglobinler, Nitritler, Nitrik Oksit.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) reacts with oxyhemoglobin or oxymyoglobin resulting in the generation of nitrate and metHb or metMb. Unlike the case of nitrate, nitrite is not an innocuous end product of NO oxidation. Hemoproteins including several peroxidases are shown to cause nitrite oxidation in the presence of H₂O₂. Reactive nitrogen oxides generated in hemoprotein-catalyzed nitrite oxidation are held responsible for bactericidal and cytotoxic actions of nitrite. In this study with Griess method the oxidation of nitrite to nitrate in the presence of H₂O₂ by hemoglobin were searched.

No nitrite oxidation was observed either in the absence of H₂O₂ or hemoglobin, showing that the reactive species causing nitrite oxidation is a oxoferryl complex (compound I) formed from the reaction of H₂O₂ with hemoglobin. In this study, similar to peroxidase enzymes, we found that hemoglobin causes the nitration of tyrosine. Hemoglobin-catalyzed tyrosine nitration was pH-dependent with the optimum pH of 6,0. Hemoglobin and H₂O₂ were essential components for tyrosine nitration. We have not observed any tyrosine nitration without hemoglobin even at the lowest pH studied. However during hemoglobin-catalyzed nitrite oxidation in the presence of H₂O₂, nitrating species are produced.

We conclude that, by the series of reactions between hemoglobin, H₂O₂ and nitrite, nitrogen dioxide radical (NO₂[•]) and/or peroxyxynitrite like reactive species are produced, and these species are responsible for tyrosine nitration.

Keywords: Nitrates, Hemoglobins, Nitrites, Nitric Oxide.

*Bu çalışma Hasan KARAGEÇİLİ isimli yazarın Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yaptığı Yüksek Lisans Tez Çalışmasıdır. Tez No: 165188

¹Yrd. Doç. Dr. Hasan KARAGEÇİLİ Siirt Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu

²Prof. Dr. Kamer KILINÇ TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

GİRİŞ VE AMAÇ

Nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) seviyeleri doğal sularımızın kalitesinin önemli göstergeleridirler. Hem NO_3^- hem de NO_2^- bütün toprak ve yüksek bitkilerin nitrojen döngüsünde bulunur. NO_2^- ile NO_3^- , amonyak ve diğer nitrojenli organik bileşiklerin biyodegradasyonu esnasında oluşabilir.¹ Hem NO_2^- hem de NO_3^- suların yaygın kirliliğini gösterir ve doğal suların kalitesinin önemli bir göstergesidir. NO_3^- 'in sularda seviyesinin yükselmesi özellikle gübrelerin tarımsal uygulaması nedeniyledir.² Kendisi zararlı olmamasına karşın, NO_3^- 'in insanlara toksisitesi esas olarak NO_2^- 'e indirgenmesine atfedilir. Yüksek seviyelerde kronik NO_3^- tüketimi ayrıca diğer sağlık problemlerine, kanserlere ve teratojenik etkilere neden olur.³

NO_3^- insanlar tarafından diyetlerinde tüketilir. Yaklaşık günlük nitratın %5'i tükürükteki bakteriler tarafından nitrite indirgenir. NO_2^- ve NO_3^- 'in pek çok tür için toksik olduğu bilinmektedir. Örneğin NO_2^- veya NO_3^- 'in sindirimi en genel etkileri methemoglobinemi olmak üzere pek çok türde ciddi zehirlenmelere neden olur. NO_2^- ve peroksinitrit *in vitro* koşullarda da toksiktirler. Her iki türün dopamini proteinlere kovalen olarak bağlanan quinon formuna oksitlediği gösterildi. NO_2^- ve NO_3^- önemli antimikrobik ajanlardır. İnsanlar tarafından tüketilen et ve balıklarda tatlandırıcı, koruyucu ve renklendirici ajanlar olup bazı aminler ile düşük pH'de karsinojenik nitrozoaminler oluşturmak için tepkimeye girebilirler.⁴ Vücuttaki NO_3^- derişimi, günlük alınan diyet, tükürük oluşumu, bakterilerce bağırsaklardaki NO_3^- sentezi, denitrifiye karaciğer enzimleri ve atmosferik nitrojen oksit gazlarından etkilenmektedir.⁵

NO_2^- diğer taraftan *in vivo* da NO_3^- 'e indirgenebilir. 8-15 g NO_3^- alımı karın ağrısı, gaitada ve idrarda kan, güçsüzlüğe ve inmeye neden olabilir. Daha küçük dozlarda alımı hazımsızlığa, mental depresyona ve baş ağrısına neden olabilir. NO_3^- 'in ve NO_2^- 'in

yiyecekler ve içeceklerdeki potansiyel kaynakları topraktaki organik maddeler, endüstriyel tarımda kullanılan nitrojenli gübreler, herbisitler, çiftlik hayvanları, insan dışkısı, kimyasal endüstrilerdeki organik ve yerel atıklardır.⁶

NO_2^- tüketildiğinde, midenin asidik koşulları altında (pH 1-2), nitroz asid'e ve diğer reaktif nitrojen türlerine (RNS) çevrilir. Asidik nitritten sağlanan RNS nitrozatif strese neden olabilir, bu stresde aromatik bileşiklerin örneğin tirozinin N-nitrozasyonuna, DNA bazlarının deaminasyonuna, ve aminlerin N-nitrozasyonuna yol açabilir.⁷ Sağlıklı kişilerin serumunda NO_2^- ve NO_3^- 'in normal konsantrasyonları sırası ile 0,06-0,60 ve 0,5-2,8 mg/L arasındadır. Her iki konsantrasyonun belirtilenden yüksek olduğu durumlarda nitrat ve NO_3^- enflamatuvar işaretler olarak kullanılabilir ve ciddi rahatsızlıklardan, HIV enfeksiyonu, multiple skleröz, alzheimer, astım ve *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu gastrit hakkında bilgi sağlanabilir.⁸

Çeşitli peroksidaz enzimleri ve miyoglobin, NO_2^- 'nin NO_3^- 'e oksidasyonunu katalizlerler.⁹ Bu oksidasyon tepkimesi NO_2^- 'nin reaktif formlarının oluşumu üzerinden gerçekleşmektedir. Bu çalışmada H_2O_2 varlığında hemoglobin tarafından nitritin reaktif nitrojen oksit türlerine aktivasyonu, oluşan reaktif türlerle tirozin amino asidinin nitrasyonu, nitrasyonun koşulları kolorimetrik yöntemlerle incelendi. Ayrıca hemoglobin- H_2O_2 bağımlı nitrit oksidasyonuna ve tirozin nitrasyonuna glutatyon, tiyosinat ve askorbik asit gibi bileşiklerin olası inhibitör etkileri araştırıldı. Hb'nin oksijenasyonu ve deoksijenasyonu sırasında methemoglobin oluşabilmektedir. Oksihemoglobinin NO ile tepkimesi de methemoglobin oluşumuna neden olmaktadır. Diğer taraftan NO_2^- 'de NO'nun oksidasyon ürünlerinden biridir. Methemoglobin, NO_2^- ve H_2O_2 'nin hücresel koşullarda bulunmaları nedeniyle, bu türler arasındaki tepkime ile oluşan reaktif türler ve

etkilerinin araştırılması, NO₂'den kaynaklandığı bildirilen toksik etkilerin

mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

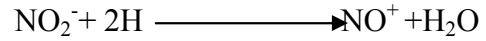
MATERYAL VE METOT

Kimyasallar ve Cihazlar: Sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄.H₂O) Baker and Adamson products N.J., ABD'den; Potasyum tiyosiyanat (KSCN), Ortofosforik asit (H₃PO₄) Fisher Scientific Company N.J., A.B.D'den; disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), sodyum hidroksit (NaOH) Merck Darmstat Almanya'dan; sodyum asetat (CH₃.COONa.3H₂O), L- askorbik asit BDH İngiltere'den; L-tirozin, glutatyon (indirgenmiş formu), hemoglobin (insan hemoglobini), hidrojen peroksit (H₂O₂), sulfanilik asit, NEDD (N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür) Sigma Chemical Company A.B.D den temin edildi. Absorbsiyon ölçümleri için Shimadzu UV 120-02 model spektrofotometre (Japonya) kullanıldı. Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında 2004 yılında gerçekleştirildi.

Nitritin farklı koşullarda nitrate oksidasyonu, ortamda kalan NO₂- derişimi tayin edilerek izlendi. Bu amaçla nitrozatif yöntem olarak bilinen sulfanilamid/Naftiletildiamin dihidroklorür (SULF/NEDD) karışımı reaktif olarak kullanıldı. Nitrozatif yöntem Griess yöntemi olarak da bilinmektedir. Griess yönteminin reaktif olan Griess reaktifini hazırlamak için 2 gr sulfanilamid, 100 mL %5 lik H₃PO₄ içinde ve 200 mg N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür 100 mL saf su içinde çözülerek buzdolabında saklandı. Kullanılacağı zaman iki çözeltiden eşit hacimler alınarak karıştırıldı ve Griess reaktifini hazırlandı.

Griess yöntemi ile NO₂⁻ tayini, asidik ortamda NO₂⁻'den oluşan nitrozolayıcı reaktif türün, renkli azo boyası oluşumuna neden olması prensibine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir.¹⁰ Nötral pH'da nitrozasyona neden olan (NO⁺ verici) başlıca grup

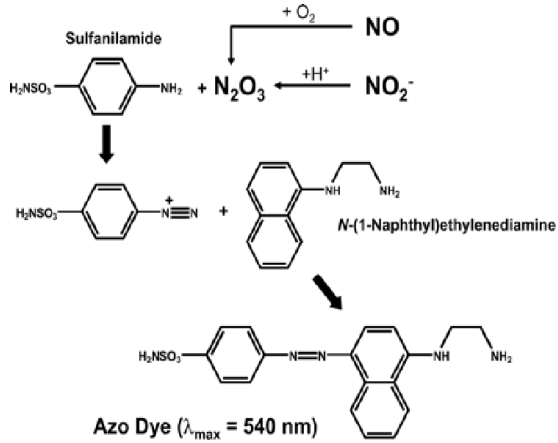
N₂O₃'tür. Asidik koşullarda ise NO⁺ ara ürünü aşağıdaki tepkime ile nitritten üretilir.



Griess tepkimesinde, nitrozolayıcı ajan sulfanilik asitle tepkimeye girerek diazonyum iyonu oluşturur. Diazonyum iyonu da ortamdaki NEDD ile tepkimeye girerek 540 nm civarında yoğun absorpsiyonu olan turuncu renginde bir kompleks oluşturur.¹¹ Oluşan kromofor bileşiğin 540 nm'deki molar absorbtivitesi 38.000 M⁻¹cm⁻¹ dir.¹² Griess reaktifi nötral koşullarda nitrik oksitin oksidasyonu ile oluşan reaktif türlerin (N₂O₃ gibi) tayininde kullanılabilir. Ancak nötral pH'da azo kompleksinin molar absorbtivitesi asidik pH'daki molar absorbtivitesinin yarısı kadardır. Griess reaktifinin NO₂⁻ tayininde kullanılması için ortamın mutlaka asitleştirilmesi gerekir. NO₂⁻'ile kullanıldığı gibi, NO₃⁻ tayini için de Griess reaktifini kullanılır (Şekil 1). Ancak bu işlem için, kimyasal ya da enzimatik yöntemlerle NO₃⁻'ün NO₂⁻'ye daha önce indirgenmesi gerekir.

Bu çalışmada NO₂⁻'nin NO₃⁻'e oksidasyonu, tepkime ortamında kalan NO₂⁻ tayin edilerek izlendi. Tepkime ortamında kalan NO₂⁻ derişimini tayin etmek için, belirli inkübasyon süresi sonunda ortama Griess reaktifi eklendi ve 20 dakika sonra oluşan rengin absorpsiyonu 540 nm'de ölçüldü. Aksi belirtilmedikçe NO₂⁻ içeren tepkime ortamının hacmi 0,5 mL idi. Tepkime her zaman 0,5 mL Griess reaktifinin eklenmesi ile sonlandırıldı. Absorbans ölçümleri kolorimetrik olarak Shimadzu spektrofotometre kullanılarak yapıldı.

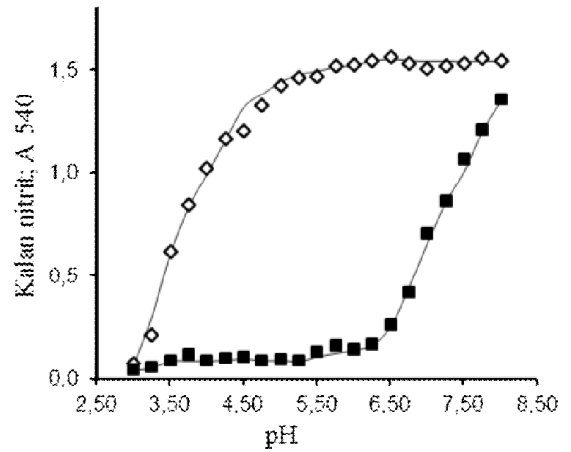
Bütün deneylerde ticari olarak elde edilen hemoglobinin rengine kaynaklanan absorbans değeri, son absorbans değerinden çıkarılarak gerçek absorbans değeri bulundu.



Şekil 1. Griess tepkimesi ile nitrit tayininin mekanizması. Reaktif nitrojen oksit (NO_x , örneğin N_2O_3) türleri ile nitrozasyona uğrayan sülfanilamid, NEDD ile tepkimeye girerek kromofor bileşiği oluşturur.¹¹

BULGULAR VE TARTIŞMA

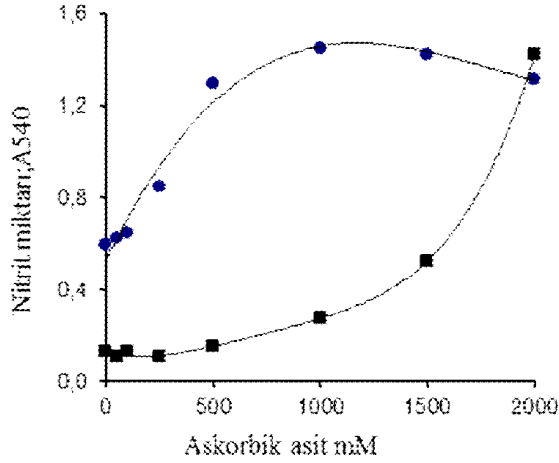
Peroksidaz enzimleri ve miyoglobine benzer şekilde, H_2O_2 varlığında hemoglobinin de nitritin nitrata oksidasyonunu katalizlediği gözlemlendi. Deney ortamındaki nitrit derişiminin hemoproteinler varlığında azalmasının nedeninin, nitritin neticede nitrata oksidasyonundan kaynaklandığı daha önce gösterilmiş olduğundan.⁹; ortamdan kaybolan nitritin nitrata çevrildiğini göstermek için ayrıca ortamda kalan nitrat tayini yapılmadı. Hemoglobin bulunmayan ortamda, nitrit ile H_2O_2 arasındaki tepkime ile nitritin oksidasyonunun pH 5 civarında başladığı görüldü. Deney koşullarında pH 3’de nitritin tamamı oksitlenmektedir. pH düştükçe hemoglobin tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonu hızlanmakta ve pH 6,25’de nitritin tamamı oksitlenmektedir (Şekil 2). Bu bulgular, H_2O_2 bulunan ortamda nitritin nitrata oksidasyonunun etkin bir şekilde katalizlendiğini göstermektedir.



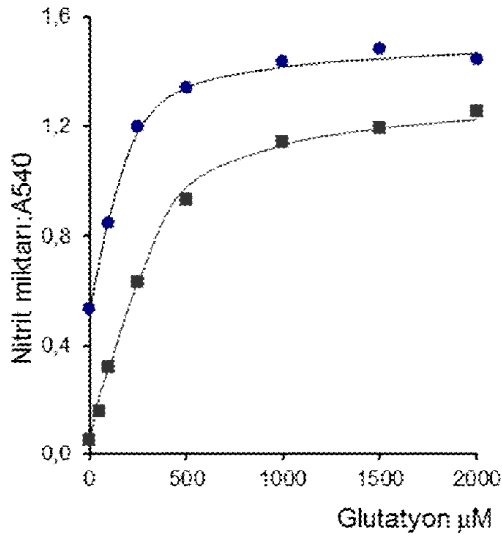
Şekil 2. Nitritin nitrata oksidasyonuna pH’nin etkisi. (-□-): Hemoglobin yokluğunda; (-■-): 3,1 μM Hemoglobin varlığında. Deney ortamı 80 μM Nitrit ve 2 mM H_2O_2 içermektedir.

Hemoglobin katalizör olarak etkin derişimi 3,1 μM olarak belirlendi ve diğer çalışmalarda bu derişim kullanıldı. Nitritin nitrata oksidasyonu sabit hemoglobin, nitrit ve H_2O_2 derişimleri kullanılarak (sırası ile 3,1 μM , 80 μM ve 2 mM) farklı iki pH’da ve 3 farklı inhibitörün varlığında araştırıldı. Her üç farklı inhibitörün 0-2 mM arasındaki derişimleri kullanıldı (Şekil 3, 4, 5). Etkileri test edilen her üç bileşik de derişimlerine bağlı olarak hemoglobin tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonunu inhibe ettiler. Etkileri araştırılan bu bileşiklerden glutatyon ve askorbik asit, reaktif oksidanlar

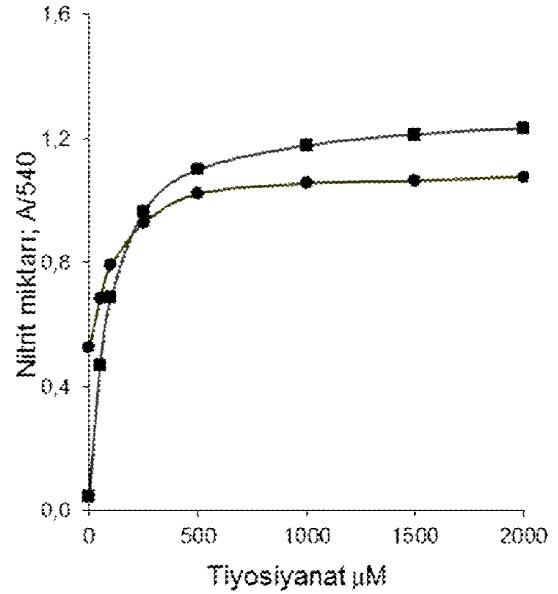
ile tepkimeye giren antioksidan bileşikler olarak bilinirler. Bu bileşiklerin, hemoproteinlerin H_2O_2 ile tepkimesi sonucu oluşan reaktif ferrik oksitleri veya nitritin oksidasyonu sırasında oluşan ara ürünleri ile tepkimeye girerek nitritin nitrata oksidasyonunu inhibe ettikleri sonucuna varıldı.



Şekil 3. Nitritin nitrata oksidasyonuna askorbik asit derişiminin etkisi. (-●-): pH 7,0, (-■-): pH 6,25. Hemoglobin: 3,1 μ M, Nitrit: 80 μ M, H_2O_2 : 2 mM.



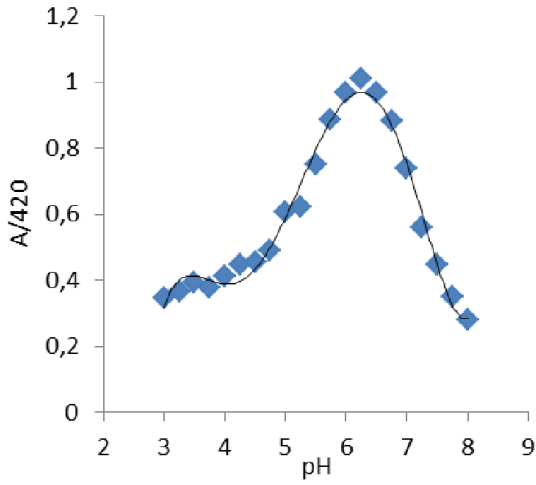
Şekil 4. Hemoglobin tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonuna glutatyon derişiminin etkisi. (-●-): pH 7,0, (-■-): pH 6,25. Deney ortamı 3,1 μ M hemoglobin, 80 μ M nitrit ve 2 mM H_2O_2 içermektedir.



Şekil 5. Hemoglobin tarafından katalizlenen nitrit oksidasyonuna tiyosiyanat derişiminin etkisi. (-●-): pH 7,0, (-■-): pH 6,25. Hemoglobin: 3,1 μ M, Nitrit: 80 μ M, H_2O_2 : 2 mM.

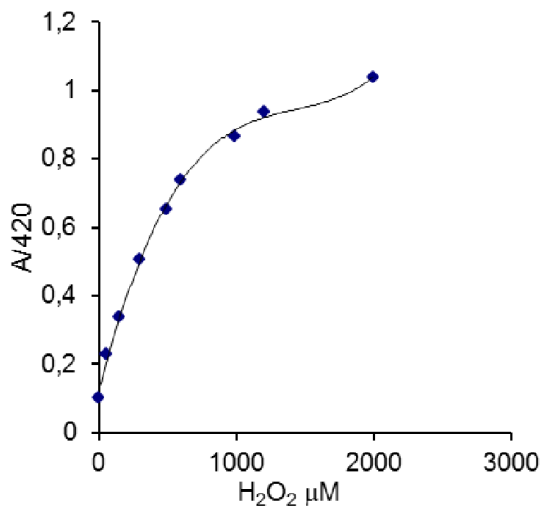
Peroksidazların ve miyoglobinin nitrit ile H_2O_2 varlığında tirozin amino asidinin nitrasyonuna neden olduğu gösterilmiştir.¹³ Bu çalışmada da nitrit ve H_2O_2 içeren ortamda hemoglobinin tirozin nitrasyonuna neden olduğu gözlemlendi ve nitrasyon koşulları araştırıldı. Tirozin amino asidinin nitrasyonu pH 3-8 arasındaki değişik pH'larda 50 mM asetat tamponu (pH 3,0, 3,25, 3,50, 3,75, 4,0, 4,25, 4,50, 4,75, 5,0, 5,25, 5,50) ve fosfat tamponu (pH 5,0, 5,25, 5,50, 5,75, 6,0, 6,25, 6,50, 6,75, 7,0, 7,25, 7,50, 7,75, 8,0) kullanılarak araştırıldı. Bütün pH'lardaki tepkime ortamı 3,1 μ M hemoglobin, 500 μ M nitrit ve 1 mM H_2O_2 içermektedir. Tirozin nitrasyonu ayrıca hemoglobin içermeyen ortamda da çalışıldı. Tepkime ortamının hacmi 900 μ L idi ve tepkimeler 100 μ L 1 N NaOH ilavesi ile sonlandırıldı. Ortama eklenen NaOH hem nitritin oksidasyonunu durdurmakta, hem de alkali koşullarda nitrotirozinin kolorimetrik tayinine olanak sağlamaktadır. Alkali ortamda yoğun sarı bir renge sahip olan nitrotirozinin absorpsiyonu 430 nm'de ölçüldü. pH'nin hemoglobin ve nitrit bağımlı tirozin nitrasyonuna etkisi (Şekil 6) verilmiştir. En etkili nitrasyon pH 6 civarında gözlemlendi. Bu nedenle tirozin

nitrazyonu ile ilgili diğer çalışmalar pH 6'da yapıldı.



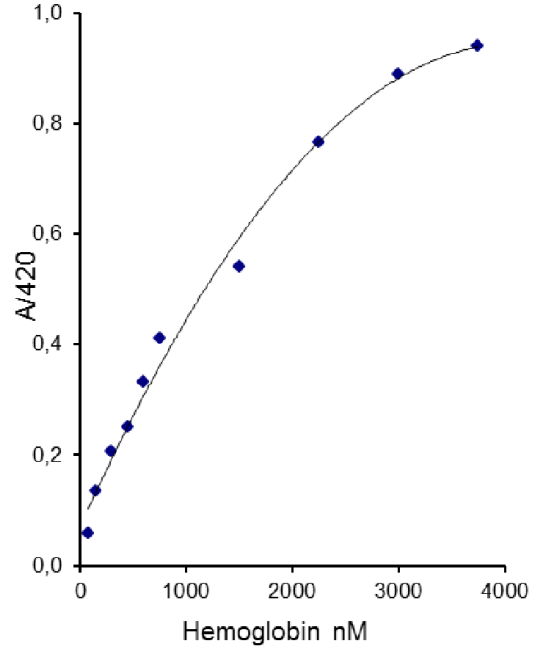
Şekil 6. Tirozin nitrazyonuna pH'nin etkisi. Hemogloblin: 3,1 μ M, H₂O₂: 1 mM, Nitrit: 500 μ M, Tirozin: 1 mM.

Tirozin nitrazyonunun hidrojen peroksit derişimine bağıli ilerleyişini görmek ve tepkime için gerekli hidrojen peroksit derişimini belirlemek için, 3,1 μ M hemogloblin, 500 μ M nitrit ve 1 mM tirozin içeren ortama 0-2 mM H₂O₂ eklenerek çalışıldı (Şekil 7). Tepkime ortamında H₂O₂ yok iken tirozin nitrazyonu gözlenmedi. Optimal nitrazyon hidrojen peroksit derişimi 2 mM iken gözlendi.



Şekil 7. Hemogloblin tarafından katalizlenen tirozin nitrazyonunun hidrojen peroksit derişimine bağımlılığı pH 6,0. Hemogloblin: 3,1 μ M, Nitrit: 500 μ M, Tirozin: 1 mM.

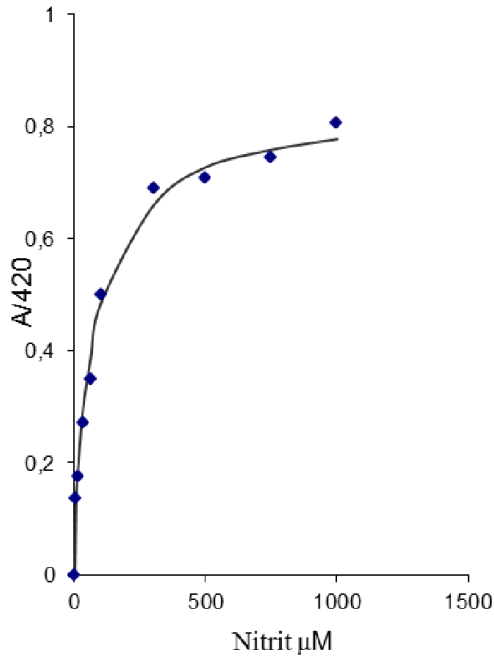
Hemogloblin derişiminin nitrotirozin oluşumuna etkisini gözlemek için pH 6,0'da 2 mM H₂O₂ 1 mM nitrit, 1 mM tirozin ve 50 mM fosfat tamponu içeren tepkime ortamına belirtilen değerler arasında hemogloblin (75 nM-3,750 μ M) derişimlerinden eklenerek tepkimeler başlatıldı. Hemogloblin derişimi artışının tirozin nitrazyonunu artırdığı, diğer bileşikler sabit kalmak üzere bu artışın hemogloblinin artışı ile doğrudan ve güçlü bir ilişkisi olduğu gözlendi. Hemogloblinin de diğer peroksidaz ezimleri ve hemoproteinler gibi tirozin nitrazyonunu katalizlediği gözlendi. Hemogloblin yokluğunda yapılan çalışmalarda nitrazyon kaydedilmedi. Nitrazyon deneyleri için en etkili hemogloblin derişiminin 3,1 μ M olduğu bulundu (Şekil 8).



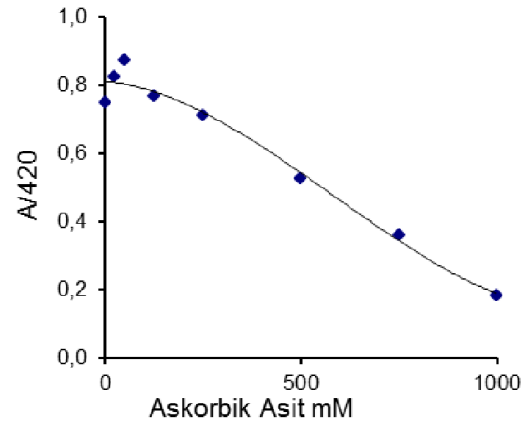
Şekil 8. Tirozin nitrazyonunun hemogloblin bağımlılığı. pH 6,0, H₂O₂: 2 mM, Nitrit: 1 mM, Tirozin: 1 mM.

Tirozin nitrazyonuna nitritin etkisini gözlemek için pH 6,0 da 3,1 μ M hemogloblin, 2 mM H₂O₂, 1 mM tirozin ve 50 mM fosfat tamponu bulunduran tepkime ortamına farklı değerlerde nitrit konsantrasyonları (0-1 mM) eklenerek çalışıldı. Tepkime ortamının hacmi 900 μ L olup tepkimeler 100 μ L NaOH ilavesi ile sonlandırıldı. Ortama nitrit eklenmesiyle tirozin nitrazyonunda nitrit

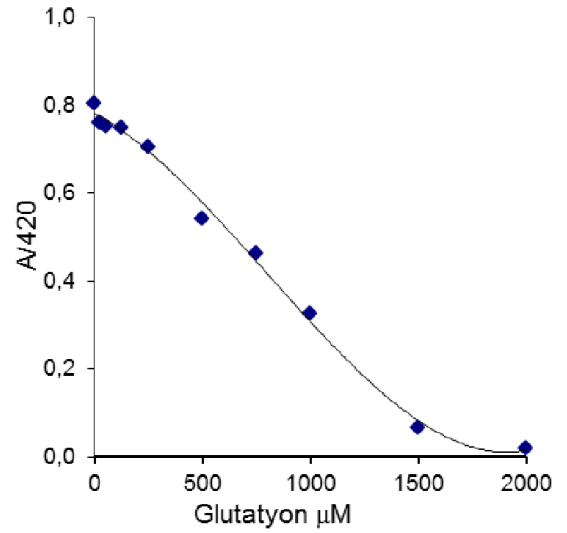
derişimine bağılı bir artış gözlemlendi. Uygun nitrit derişiminin 500 μM olduğuna karar verildi (Şekil 9). Glutasyon, askorbik asit ve tiyosiyanat (SCN) derişimlerinin tirozin nitrasyonuna etkileri çalışıldı. Tirozin nitrasyonu sabit hemoglobin, nitrit, tirozin ve hidrojen peroksit derişimleri kullanılarak (sırası ile 3,1 μM , 500 μM 1 mM ve 1 mM) pH 6,0' da 3 farklı inhibitörün varlığında araştırıldı. Üç farklı inhibitörden askorbik asidin 0-1 mM arasındaki, diğer ikisinin de 0-2 mM arasındaki derişimleri kullanıldı (Şekil 10, 11, 12). Etkileri değerlendirilen her üç bileşik de derişimlerine bağılı olarak hemoglobin tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonunu inhibe etmektedir. Etkileri araştırılan her üç bileşimin de ortamda kıt bulunmalarının peroksidazlarca katalizlenen tirozin nitrasyonuna ortam sağladıkları bilinmektedir. Bu bileşiklerin etkin inhibisyon gösterdikleri derişim, askorbik asidin 0,75 mM, tiyosiyanatın 1 mM ve glutasyonun 1 mM olarak tespit edildi.



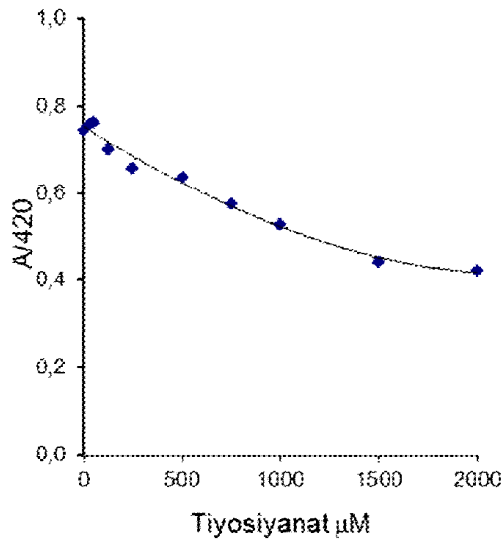
Şekil 9. Hemoglobin tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonunun nitrit derişimine bağımlılığı. pH 6,0, Hemoglobin: 3,1 μM , H_2O_2 : 2 mM, Tirozin: 1 mM.



Şekil 10. Hemoglobin-nitrit bağımlı tirozin nitrasyonuna askorbik asit derişiminin etkisi. pH 6,0, Hemoglobin: 3,1 μM , H_2O_2 : 1 mM, Nitrit: 500 μM , Tirozin: 1 mM.



Şekil 11. Hemoglobin-nitrit-hidrojen peroksit bağımlı tirozin nitrasyonuna glutasyon derişiminin etkisi. pH 6,0, Hemoglobin: 3,1 μM , H_2O_2 : 1 mM, Nitrit: 500 μM , Tirozin: 1 mM.



Şekil 12. Hemoglobin-nitrit-hidrojen peroksit bağımlı tirozin nitrasyonuna Tiyosiyanat derişiminin etkisi. pH 6,0, Hemogloblin: 3,1 µM, H₂O₂:1 mM, Nitrit: 500 µM, Tirozin: 1 mM.

NO₂⁻ ve NO₃⁻ sulu ortamların yaygın kirleticilerini temsil ederler ve doğal su kaynaklarının kalitesinin önemli göstergeleridirler.^{2,3} Nitrat çevreye nitrojenli gübrelerin kullanıldığı topraklardan sızabilir. Su kaynaklarında NO₃⁻ konsantrasyonunun artışı NO₃⁻ ayrıca NO₂⁻'ye indirgenebildiğinden insan sağlığı için potansiyel bir risk oluşturur.¹⁴ NO₂⁻ ve NO₃⁻ et ve balık ürünlerinin saklanmasında koruyucu, tatlandırıcı ve renklendirici olarak kullanılmakla birlikte diyetle alınmaları ciddi zehirlenmelere neden olmakta ve en genel etkileri de methemoglobinemi olarak bilinmektedir.⁴ NO₂⁻ ve NO₃⁻ NO'nun kararlı, inaktif birer son ürünü olarak düşünülürken bazı son çalışmalar NO₂⁻ 'nin tekrar biyoaktif NO'ya indirgenebildiğini göstermektedir. Nitrat tükürükte konsantre olarak bulunur ve bir kısmı bakteriyel NO₃⁻ redüktazlar tarafından NO₂⁻ 'ye indirgenir. Nitratın, NO₂⁻ 'nin sistemik üretimi için sübstrat olduğu gösterilmiştir.¹⁵ Günlük alınan NO₃⁻ bakteriyel flora tarafından NO₂⁻'ye metabolize olmakta ve tükürük NO₂⁻ konsantrasyonunun yükselmesine neden olmaktadır. Midenin asidik koşullarında NO₂⁻ güçlü bir nitratlayıcı ajan olan nitroz asidi üretir. İdrar, tükürük ve plazma NO₃⁻ seviyelerinde artış olurken NO₂⁻'nin sadece tükürükteki konsantrasyonu artmıştır.

Pannala ve ark. yüksek diyetli NO₃⁻ tüketiminin 3-nitrotirozinin plazma konsantrasyonlarında önemli bir kronik değişime neden olmadığını göstermişlerdir.⁷

Bu çalışmamızda öncelikle NO₂⁻ oksidasyonunun belirlenebilmesi için Hb, NO₂⁻ ve H₂O₂ bileşikleri farklı pH değerlerinde ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Peroksidaz enzimleri ve miyoglobine benzer şekilde, H₂O₂ varlığında Hb'nin NO₂⁻ 'nin NO₃⁻'e oksidasyonunu katalizlediği gözlemlendi. NO₂⁻'nin pH bağımlı oksidasyona uğradığı tespit edildi. Hem Hb tarafından katalizlenen NO₂⁻ oksidasyonu, hem de Hb'nin olmadığı NO₂⁻ oksidasyonu göstermektedir ki pH düştükçe NO₂⁻ oksidasyonu hızlanmakta ve deney koşullarında pH 3'de NO₂⁻'nin tamamı oksitlenmektedir. pH 5 ten yukarı pH'lerde oksidasyon azalmakta, Hb'nin katalizlediği tepkime ortamında az bir oksidasyon gözlenmektedir. Bu da Hb'nin H₂O₂ varlığında NO₂⁻'nin NO₃⁻'e oksidasyonunu katalizlediğini göstermektedir. NO₂⁻ oksidasyonu zaman bağımlı bir oksidasyondur. Tepkime başlangıcında hızlı bir oksidasyon gözlenirken oksidasyon hızının belli bir süre sonunda sabitlendiği saptanmıştır.

NO₂⁻'nin oksidasyonu hem pH, hem de H₂O₂ derişimine son derece bağımlıdır. NO₂⁻ oksidasyonu Hb derişimine bağılı olarakta değişmektedir. Hb derişimindeki artışın NO₂⁻ oksidasyonunu artırdığı saptanmıştır.

Bu çalışmada NO₂⁻'nin NO₃⁻'e oksidasyonu sabit Hb, NO₂⁻ ve H₂O₂ derişimleri kullanılarak glutatyon, askorbik asit ve tiosiyanat varlığında araştırıldı. Etkileri araştırılan bu bileşiklerden glutatyon ve askorbik asit, reaktif oksidanlar ile tepkimeye giren antioksidan bileşikler olarak bilinirler. Byun ve ark. fizyolojik derişimlerdeki askorbatın MPO-H₂O₂-NO₂⁻ sistemi tarafından oluşan lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir.¹⁶ Tiyosiyanatın NO₂⁻'nin oksidasyonunu ve proteinlerde tirozin residülerinin nitrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.¹⁷ Bu çalışmamızda yukarıdaki bileşiklerin NO₂⁻ oksidasyonunu inhibe

ettikleri bulundu. Bu bileşiklerin hemoproteinlerin H_2O_2 ile tepkimesi sonucu oluşan reaktif ferrik oksitler veya NO_2^- 'nin oksidasyonu sırasında oluşan ara ürünler ile tepkimeye girerek NO_2^- 'nin NO_2^- 'e oksidasyonunu inhibe ettikleri düşünülmektedir.

NO_2^- *in vivo* koşullarda birikmez ve çeşitli hemoproteinlerin gerektiği bir mekanizma ile NO_3^- 'e metabolize olur.⁹ Feng ve ark. $NaNO_2$ 'nin pişirilmiş sosisler üzerindeki protein oksidasyonu ve nitrozasyon etkilerinin depolama süresi ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.¹⁸ Rocha ve ark. diyetle alınan nitritin *in vivo* olarak midede nitratlayıcı ajanlar ürettiğini ve peptik aktiviteyi belirgin şekilde azalttığını tespit etmişlerdir.¹⁹

Van der vliet ve ark. H_2O_2 varlığında hemoperoksidazların NO_2^- 'in NO 'ye oksidasyonunu katalizleyebildiğini ve bunun da *in vivo* olarak NO_2^- seviyesinin yeterince yüksek olduğu bölgelerde aromatik nitrazyona katkı sağladığını belirtmişlerdir. Peroksidazlardan, horseradiş peroksidaz (HRP), myeloperoksidaz (MPO) ve laktoperoksidaz (LPO)'ın H_2O_2 veya H_2O_2 üreten sistemlerin varlığında fenolik bileşiklerden tirozin'i nitratlama kabiliyetine sahip reaktif nitrojen ara ürünleri üretmek için NO_2^- 'yi oksitleyebildiğini göstermişlerdir.²⁰ Wu ve ark. Eosinofil peroksidaz (EPO) NO_2^- 'yi kolayca reaktif ara ürünler meydana getirmek için kullandığını ve bu ara ürünlerinde serbest ve protein bağlı tirozil residülerini yüksek oranda nitratladığını göstermişlerdir.²¹ Sampson ve ark. hem myeloperoksidaz hem de horseradiş peroksidaz NO_2^- ve H_2O_2 'yi sübstrat olarak kullanarak proteinlerde tirozin nitrazyonunu katalizlediğini rapor etmişlerdir.²² Byun ve ark. insan nötrofillerinin MNMPO- H_2O_2 - NO_2^- sistemini kullanarak reaktif türler ürettiğini ve bu türlerin de 2'-deoksiguanozini nitratlayabildiğini göstermişlerdir.¹⁶ Davis ve ark. hem MPO hem de HRP'nin NO_2^- ve H_2O_2 'yi Sürfaktan Protein A'da tirozin nitrazyonunu katalizlemek için sübstrat olarak kullandığını göstermişlerdir. Hem oksidasyonun hem de

nitrazyonun proteini bozduğunu, lipid agregasyonu ve mannoz bağlama yeteneğini de inhibe ettiklerini göstermişlerdir.²³

Tirozin nitrazyonu tanınan, yaygın görülen, fonksiyonel olarak önemli bir translasyon sonrası modifikasyondur.²⁴ Tirozin nitrazyonu proteinin yapısını ve fonksiyonunu etkileyebilir. ONOO⁻ yanında, diğer reaksiyonlarında örneğin NO_2^- -bağımlı hemo peroksidaz reaksiyonlarında protein tirozin nitrazyonunu *in vivo* da artırdığı bulunmuştur. Hemoperoksidaz enzimlerinin (MPO, EPO, HRP) NO_2^- ve H_2O_2 varlığında kalp homojenatlarında farklı proteinleri nitratlayabildikleri gösterilmiştir. Bu nitrazyon NO_2^- ve tirozinin sırasıyla nitrojen dioksit radikaline ve tirozil radikaline oksidasyonlarıyla meydana gelmektedir. Bu iki radikalın ardışık reaksiyonları nitro tirozine yol açmaktadır. Yukarıda tanımlanan mekanizmalardan farklı mekanizmalar da vardır. Protein nitrazyon mekanizmaları olarak, bu mekanizmalar hemoproteinlerin (miyoglobin ve hemoglobin) psödoperoksidaz aktivitesi temeline dayanmaktadır.²⁵ Kılınç ve ark. diğer bir hemo protein olan miyoglobin'in NO_2^- 'nin oksidasyonunu katalizlediğini ve tirozin nitrazyonunu ilerlettiğini bulmuşlardır. Hem NO_2^- oksidasyonu hem de tirozin nitrazyonunun H_2O_2 bağımlı olup ferril (Fe^{+4}) miyoglobinin oluşumunu gerektirdiğini, bundan başka, NO_2^- oksidasyonu ve tirozin nitrazyonunun optimum pH 6'da pH bağımlılığını gösterdiler.²⁶

Hb'nin NO_2^- ve H_2O_2 ile (muhtemelen diğer oksidanlarla da) etkileşime girebildiği ve bu reaksiyonun proteinin kendisini ve diğer proteinlerin nitrazyonuna yol açtığı çıkan sonuçlardan görünmektedir. Peroksidazlar proteinlerin tirozil gruplarını NO_2^- ve H_2O_2 varlığında nitratlayabilirler. Açıkça, Hb, NO_2^- ile birlikte peroksidazlar gibi davranır. Peroksidazların NO_2^- ile etkileşimi NO_2^- in nitratlayıcı ajan NO_2 ye bileşik I tarafından oksidasyonunu gerektirdiği düşünülmektedir. Tirozin nitrazyonu hemoglobin ve diğer psödoperoksidaz aktivitesine sahip hemo proteinler tarafından olmaktadır. Örneğin

miyoglobın, veya sitokrom c tirozin nitrasyonunun vücuttaki önemli kaynaklarıdır.²⁷ İn vivo koşullarda birkaç ajanın nitrasyonun sorumlu olma olasılığı vardır. Bu ajanlar H₂O₂/peroksidazların varlığında ONOO⁻ ve NO₂⁻ dir. Metmiyoblobin ve methemoglobinin NO₂⁻ ve H₂O₂ varlığında tirozini nitratlayabildiği gösterildi.¹³

Bu çalışmada da NO₂⁻ ve H₂O₂ içeren ortamda Hb'nin tirozin nitrasyonuna neden olduğu gözlemlendi. Tirozin amino asidinin nitrasyonu pH 3-8 arasındaki değişik pH'lerde çalışılmış ve pH'nin Hb ve NO₂⁻ bağımlı tirozin nitrasyonuna etkisi şekil 6'da verilmiştir. En etkili nitrasyon pH 6 civarında gözlemlendi. Daiber ve ark. ONOO⁻'nin fenolü nitratlamasını pH 4 ile 8 arasında en yüksek bulmuşlar ve bu çalışmada gözlemlendiği gibi fenol nitrasyonunun düşük aktivitesinin pH 8'de olduğunu göstermişlerdir.²⁸ Pecci ve ark. nitrotirozin oluşumunun düşük pH'lerde az olduğunu, nötral pH'den yüksek değerlerde ise oluşmadığını göstermişlerdir. Ayrıca nitrotirozin ürününün pH bağımlı meydana gelmesinin, yaklaşık olarak pH 6'da maksimum olduğunu da bulmuşlardır.^{29,30} Bizim çalışmada Hb yokluğunda NO₂⁻'nin NO₃⁻'e oksidasyonu gerçekleşmedi. Tirozin nitrasyonunun olmaması, asidik ortamda NO₂⁻'den oluşan nitrozolayıcı ajan (NO⁺) tirozin nitrasyonuna neden olmadığını göstermektedir.

Tepkime ortamında H₂O₂ yok iken tirozin nitrasyonu gözlenmedi. Sunulan çalışmada olduğu gibi, başka çalışmalarda da NO₂⁻ ya da H₂O₂ ortamda yok iken nitrotirozin oluşumu gözlenmemiştir.¹³ Bian ve ark. sığır serum albümininin nitrasyonunun ve oksidasyonunun H₂O₂ bağımlı gerçekleştiğini göstermişlerdir.³⁰ Bu çalışmada en etkili nitrasyon H₂O₂ derişimi 2 mM iken gözlemlendi. NO₂⁻ ve H₂O₂ içeren ortamda Hb'nin tirozin nitrasyonunu artırdığı, diğer bileşikler sabit

kalmak üzere bu artışın Hb'nin artışı ile doğrudan ve güçlü bir ilişkisi olduğu gözlemlendi. Hb yokluğunda yapılan çalışmalarda ise nitrasyon kaydedilmedi.

Farklı hemoproteinler tarafından üretilen ara ürünlerin kayda değer farklı bir yaşam süresi olsa da, metHb/ H₂O₂ tepkimesi gerçek peroksidazlardaki gibi ara ürünler meydana getirir. Bu çalışmadaki bulgular NO₂⁻'nin kantitatif olarak NO₃⁻'e oksitlendiğini desteklemektedir. Bununla birlikte az miktarda NO₂⁻ hem ile olan reaksiyondan kaçmakta ve nitrotirozin oluşumuna neden olmaktadır.

Ortamda NO₂⁻ eklenmesiyle tirozin nitrasyonunda NO₂⁻ derişimine bağılı bir artış gözlemlendi. Yapılan başka çalışmalarda ise düşük NO₂⁻ derişiminde insan tükürük peroksidazında nitrasyon gözlenmezken NO₂⁻ derişimi 0.2 mM'ın üzerine çıkarıldığında nitrasyon hızında sigmoidal bir artış kaydedilmiştir.¹⁷ Tirozin nitrasyonunun tirozinin derişimine direkt bağılı olduğu, kendi derişimi arttıkça nitrasyonunun da arttığı tespit edildi. Bu artışın bir noktadan sonra sabitlendiği gözlemlendi. Tepkime ortamı için en etkili tirozin derişimi 1 mM olarak belirlendi. Tirozin nitrasyonuna etkileri değerlendirilen glutasyon, askorbik asit ve tiyosiyanatın derişimlerine bağılı olarak Hb tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonunu inhibe ettikleri saptandı.

EPO bağımlı protein tirozil residülerinin nitrasyonunun *in vivo* olarak özellikle eozinofil infiltrasyonunun ve NO⁻ (dolayısıyla NO₂⁻) üretimini yüksek olduğu ve askorbat, glutasyon ve SCN⁻ seviyelerinin sınırlı olduğu bölgelerde meydana gelmesi olasılığı vardır.²¹ Glutasyon ve askorbatın ONOO⁻ ve NO₂⁻ tarafından meydana gelen nitrasyonun inhibitörleri oldukları rapor edilmiştir.¹⁷ Askorbik asit, glutasyon ve tiyosiyanatın sabit derişimlerinde tirozin nitrasyonuna etkileri gözlemlendi.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Hb'nin bir hemoperoksidaz gibi davranarak NO₂'nin NO₃'e oksidasyonunu katalizlediği gözlemlendi. Ayrıca Hb tarafından katalizlenen bu tepkime sırasında oluşan reaktif türlerin tirozin nitrasyonuna neden olduğu bulundu. Hb'nin katalizlediği bu tepkime nedeniyle, NO₂⁻ ve NO₃⁻'ün bildirilen toksik etkilerinde Hb'nin peroksidaz benzeri aktivitesinin de payının olabileceği sonucuna varıldı. Nitrit ve nitrat

bileşiklerinin *in vitro* ortamda Hemoglobin ile girdiği tepkimeler sonucunda meydana gelen nitrasyon bileşiklerine benzer bileşikler *in vivo* ortamda da meydana gelebilir. Bu günlerde işlenmiş etlerin nitrasyona neden olduğu ve kansere yol açtığı bilgisi de eklendiğinde yiyeceklerin ve içme suyunun içeriğine dikkat etmek halk sağlığı açısından yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Connolly, D., Paull B. (2001). "Rapid determination of nitrate and nitrite in drinking water samples using ion-interaction liquid chromatography". *Analytica Chimica Acta* ; 441:53-62.
2. Mikuška, P., Večeřa Z. (2003). "Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water by chemiluminescent flow-injection analysis". *Analytica Chimica Acta* ;495:225-232.
3. Biswas, S., Chowdhury, B., Ray, B. C. (2004). "A novel spectrofluorimetric method for the ultra trace analysis of nitrite and nitrate in aqueous medium and its application to air, water, soil and forensic samples". *Talanta* :64:308-312.
4. Vatassery, G. T., SantaCruz, K. S., DeMaster, E. G., Quach, H. T, Smith, W. E. (2004). "Oxidative stress and inhibition of oxidative phosphorylation induced by peroxynitrite and nitrite in rat brain subcellular fractions". *Neurochemistry International*;45:963-970.
5. Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Rassaf, T., Schindler A., Picker, O., Scheeren, T., Gödecke, A., Schrader, J., Schulz, R., Heusch, G., Schaub, G. A., Bryan, N. S., Feelisch, M., Kelm, M. (2003). "Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals". *Free Radical Biology & Medicine* ;35(7):790-796.
6. Okafor, P. N., Ogonna, U. I. (2003). "Nitrate and nitrite contamination of water sources and fruit juices marketed in South-Eastern Nigeria". *Journal of Food Composition and Analysis* ;16:213-218.
7. Pannala, A. S., Mani, A., Spencer, J. P. E., Skinner, V., Bruckdorfer, K. R., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A. (2003). "The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans". *Free Radical Biology & Medicine* ;34(5):576-584.
8. Pinto P. C. A. G., Lima, J. L. F. C., Saraiva, M. L. M. F. S. (2003). "Sequential injection analysis of nitrites and nitrates in human serum using nitrate reductase". *Clinica Chimica Acta* ;337: 69-76.
9. Van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Shigenaga, M. K, Cross, C. E. (1999). Reactive Nitrogen Species and Tyrosine Nitration in the Respiratory Tract". *Am J Respir Crit Care Med* ;160:1-9.
10. Holm, P. (2000). "Nitric Oxide and Peroxynitrite Production by NO-donors and Inflammatory Cells". *Printed dissertation Acta Universitatis Tamperensis* ;771:951-44-4931-2.
11. Jane, D. R., Llobera, M., Tejero Lo'pez, M. D. (2002). "Anticoagulants and Other Preanalytical Factors Interfere in Plasma Nitrate/Nitrite Quantification by the Griess Method". *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* ;6(2):178-185.
12. Ridnour, L. A., Sim, J. E., Hayward, M. A., Wink, D. A., Martin, S. M., Buettner, G. R., Spitz D. R. (2000). "A Spectrophotometric Method for the Direct Detection and Quantitation of Nitric Oxide, Nitrite, and Nitrate in Cell Culture Media". *Analytical Biochemistry* ;281:223-229.
13. Herold, S. (2004). "Nitrotyrosine, Dityrosine, and Nitrotryptophan Formation From Metmyoglobin, Hydrogen Peroxide, and Nitrite". *Free Radical Biology & Medicine* ;36(5):565 - 579.
14. Burakham, R., Oshima, M., Grudpan, K., Motomizu, S. (2004). "Simple flow-injection system for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples". *Talanta* .
15. Lundberg, J. O., Giovanni M. (2004). "Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide". *Free Radical Biology & Medicine* ;37(3): 395-400.
16. Byun, J., Henderson, J. P., Mueller, D. M., Heinecke, J. W. (1999). "8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a specific Marker of oxidation by reactive nitrogen species, is generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system of activated human phagocytes". *Biochemistry* ;38:2590-2600.
17. Takahama, U., Hirota, S., Nishioka, T., Oniki, T. (2003). "Human salivary peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite and nitration of salivary components 4-hydroxyphenylacetic acid and proteins". *Archives of Oral Biology* ;48:679-690.
18. Feng, X., Li, C., Jia, X., Guo, Y., Lei, N., Hackman, M. R., Chen, L., Zhou, G. (2016). "Influence of sodium nitrite on protein oxidation and nitrosation of sausages subjected to processing and storage". *Meat Science* ;116:260-267.
19. Rocha, S. B., Gago, B., Barbosa, M. R., Lundberg, O. J., Mann, E. G., Radi, R., Laranjinha, J. (2013). "Pepsin is nitrated in the rat stomach, acquiring antiulcerogenic activity: A novel interaction between dietary nitrate and gut proteins". *Free Radical Biology and Medicine* ;58:26-34.
20. Van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Halliwell, B., Cross, C. E. (1997). "Formation of Reactive Nitrogen Species during Peroxidase-catalyzed Oxidation of Nitrite". *Journal of Biological Chemistry* ;272(12):7617-7625.
21. Wu, W., Chen, Y., Hazen, S. L. (1999). "Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosine residues". *The Journal of Biological Chemistry* ;274(36):25933-25944.
22. Sampson, J. B., Ye, Y., Rosen, H., Beckman, J. S. (1998). "Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyzed tyrosine in proteins from nitrite and hydrogen peroxidase". *Archives of Biochemistry and Biophysics* ;356(2):207-213.
23. Davis, I. C., Zhu, S., Sampson, J. B., Crow, J. P., Matalon S. (2002). Inhibition of Human Surfactant Protein A function by oxidation intermediates of nitrite". *Free Radical Biology & Medicine* ;33(12):1703-1713.
24. Schopfer, F. J., Baker, P. R. S., Freeman, B. A. (2013). "NO-dependent nitration: cell signaling event or an oxidative inflammatory response. *Trends in Biochemical Sciences* ;28:12.
25. Turko I. V., Murad, F. "Protein Nitration in Cardiovascular Diseases". (2002). *Pharmacol Rev* ;54(4):619-634.

26. Kılınç, K., Kılınç, A., Wolf, R. E., Grisham, M. B. (2001). "Myoglobin-Catalyzed Tyrosine Nitration: No Need for Peroxynitrite". *Biochemical and Biophysical Research Communications* ;285:273-276.
27. Grzelak, A., Balcerczyk, A., Mateja, A., Bartosz, G. (2001). Hemoglobin can nitrate itself and other proteins". *Biochimica et Biophysica Acta* ;1528:97-100.
28. Daiber, A., Mehl, M., Ulrich, V. (1998). "New aspects in the reaction mechanism of phenol with peroxynitrite: The role of phenoxy radicals". *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*; 2(4) 259-269.
29. Pecci, L., Montefoschi, G., Antonucci, A., Costa M., Fontana, M., Cavalliano, D. (2001). "Formation of nitrotyrosine by methylene blue photosensitized oxidation of tyrosine in the presence of nitrite". *Biochemical and Biophysical Research Communications*;289:305-309.
30. Bian, K., Gao, Z., Weisbrodt, N., Murad F. (2003). "The nature of heme/iron-induced protein tyrosine nitration". *PNAS* ;100(10):5712-5717.