

NO-Dismutase-Aktivität siebenfach koordinierter Mangan(II)-Komplexe von Pentaazamakrocyclen**

Miloš R. Filipović, Katharina Duerr, Miloš Mojović, Vladica Simeunović, Robert Zimmermann, Vesna Niketić* und Ivana Ivanović-Burmazović*

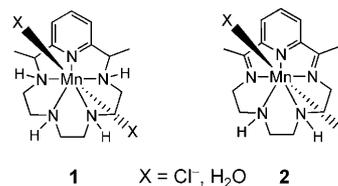
Siebenfach koordinierte Mn^{II} -Komplexe von Pentaazamakrocyclen sind die stärksten synthetischen Mimetika der natürlichen Superoxiddismutase (SOD). Sie katalysieren die Dismutierung von Hyperoxid ($O_2^{\cdot-}$) zu O_2 und H_2O_2 mit einer Effizienz, die die der mitochondrialen MnSOD übertreffen kann.^[1] Mehrere Studien belegten die Fähigkeit dieser SOD-Mimetika, Zellen und Gewebe vor oxidativer Schädigung durch Hyperoxid (und/oder Peroxynitrit, das Produkt aus der Reaktion von Hyperoxid mit Stickstoffmonoxid) zu schützen, z. B. bei Entzündungsprozessen und Reperfusionsschaden.^[2a-c] Diese Verbindungsklasse befindet sich in den USA in klinischen Studien der Phase II.^[2d] Es wurde betont, dass der hauptsächlichste Vorteil der Mn^{II} -Pentaazamakrocyclen gegenüber anderen SOD-Mimetika in der hohen Selektivität für $O_2^{\cdot-}$ und der fehlenden Reaktivität mit NO besteht.^[1,2d-g] NO ist ein Schlüsselmolekül in biologischen Prozessen.^[3] Jedoch gibt es bis jetzt noch keine direkten Studien über die Reaktion von NO mit dieser Komplexklasse zur Untermauerung der obigen Aussage.

Viele Metallkomplexe, darunter auch Manganverbindungen,^[4a-d] reagieren bereitwillig mit NO, entweder zu Metallnitrosylen oder durch NO-Disproportionierung zu N_2O und Metall-Nitrit-Komplexen.^[4a,b] In Metallnitrosylen kann

koordiniertes NO in einem seiner drei formalen Redoxzustände NO^+ , NO und NO^- [4a,c,d] existieren. Einige der NO^+ - und NO^- -Komplexe sind für ihre Reaktionen mit bestimmten Nucleophilen bzw. Elektrophilen bekannt.^[4d] Wir zeigten kürzlich, dass natürliche MnSOD-Enzyme mit NO nach einem definierten katalytischen NO-Disproportionierungsmechanismus (Dismutierung) reagieren, der zu beiden reaktiven Spezies NO^+ und NO^- führt.^[5-7]

All dies führte uns dazu, die Reaktion dieser Komplexe mit NO erneut zu untersuchen. Unsere Studie hatte zum Ziel, erstens die Reaktivität der Komplexe gegenüber NO zu ergründen, zweitens die mechanistischen Details der Reaktion aufzuklären und drittens die Bedeutung der Komplexreaktion mit NO in biologischer Umgebung zu demonstrieren.

In der vorliegenden Studie verwendeten wir $[Mn^{II}(\text{pyane})Cl_2]$ (**1**)^[8] als allgemeinen Vertreter dieser Klasse von SOD-Mimetika^[9] sowie sein SOD-inaktives Imin-Analogon



$[Mn^{II}(\text{pydiene})Cl_2]$ (**2**), um klären zu können, ob der Unterschied an Reaktivität gegenüber $O_2^{\cdot-}$ Auswirkungen auf Reaktion mit NO hat. Wir präsentieren hier Belege, dass Mn^{II} -Pentaazamakrocyclen mit NO reagieren und die NO-Dismutierung anregen.^[7] Wir schlagen einen Mechanismus vor, der mit den Beobachtungen in Einklang ist. Des Weiteren wird die Beeinflussung der NO-Reaktionen durch die Mn^{II} -Pentaazamakrocyclen in biologischen Ex-vivo-Modellen gezeigt.

Zuerst untersuchten wir die Reaktion von **1** und **2** mit einem großen NO-Überschuss, wobei der NO-Verbrauch durch die untersuchten Komplexe in anaeroben wässrigen Lösungen gemessen wurde.^[10] Da die Mangan-Nitrosyl-Komplexe lichtempfindlich sein könnten,^[11a] wurden alle Experimente unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Zugabe einer mit Ar gespülten Lösung von **1** oder **2** zu einer anaeroben wässrigen NO-Lösung führte zum raschen Verschwinden des NO (Abbildung 1 sowie SI1 in den Hintergrundinformationen). Der Effekt war in Gegenwart von reduziertem Glutathion (GSH) (Abbildung 1 und SI1) deutlich größer: In Gegenwart von GSH wurde die mehr als zehnfache Menge an NO im Vergleich zur Menge an **1** oder **2** ver-

[*] Dipl.-Chem. K. Duerr, Prof. Dr. I. Ivanović-Burmazović

Department Chemie und Pharmazie
Universität Erlangen-Nürnberg
Egerlandstraße 1, 91058 Erlangen (Deutschland)
Fax: (+49) 9131-85-27387
E-Mail: ivana.ivanovic@chemie.uni-erlangen.deDr. M. R. Filipović, Prof. Dr. V. Niketić
Department Chemie, Universität Belgrad (Serbien)Dr. M. R. Filipović
ICTM-Center für Chemie, Universität Belgrad (Serbien)Dr. M. Mojović
Department für Physikalische Chemie
Universität Belgrad (Serbien)V. Simeunović, PD Dr. R. Zimmermann
Transfusionsmedizinische und Hämostaseologische Abteilung
in der Chirurgischen Klinik, Universitätsklinikum Erlangen
(Deutschland)

[**] Die Autoren danken für die finanzielle Unterstützung aus dem Serbischen Forschungsfonds (Förderung 142017G) und der DFG im Rahmen des SFB 583 sowie für ein Promotionsstipendium der serbischen Regierung (M.F.). Dank gilt außerdem Alisa Gruden-Movsesijan und Žanka Bojić-Trbojević (INEP, Belgrad) für ihre Hilfe bei den Zellkulturen sowie Milka Jadranin und Ljubodrag Vujišić (Zentrum für Chemie, ICTM, Belgrad) für die Aufnahme von MS- bzw. ATR-FTIR-Spektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801325> zu finden.

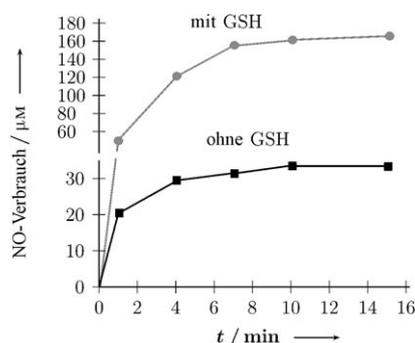


Abbildung 1. Anaerober NO-Abbau (250 µM), angeregt durch **1** bei pH 7.4 und 23°C ohne und mit GSH (250 µM), gemessen mit NO-Elektrode.

braucht, was auf einen Katalysezyklus hinweist. In einer Kontrollreaktion von GSH mit NO (ohne Komplexe) wurde kein NO-Verbrauch beobachtet, was eine Reaktion des GSH mit NO^[12] als Grund für den NO-Verbrauch ausschließt. Wir überprüften, ob **1** oder **2** die NO-Dismutierung anregen,^[5,6] indem wir in der Reaktionslösung den Gehalt an S-Nitrosoglutathion (GSNO) und Hydroxylamin, den Reaktionsprodukten von GSH mit NO⁺- bzw. HNO/NO⁻-Spezies, bestimmten^[13,14] (Reaktionsbedingungen siehe Hintergrundinformationen). Wir bestimmten 80 µM an S-Nitrosoglutathion (GSNO) und 65 µM an Hydroxylamin in Gegenwart von **1** (10 µM) sowie 55 µM an GSNO und 45 µM an Hydroxylamin in Gegenwart von **2** (10 µM). Dies entspricht den Mengen des während der Reaktion mit **1** oder **2** verbrauchten NO (Abbildung 1 und SI1).

Die geringere Reaktivität von NO gegenüber **1** und **2** bei Abwesenheit von GSH (Abbildung 1 und SI1) verdient nähere Erklärung. Wir beobachteten, dass **1** seine SOD-Aktivität nach anaerober Behandlung mit NO ohne GSH verliert, was auf eine Strukturänderung des Komplexes hinweist, die dazu führt, dass der Komplex als Dismutierungskatalysator gegenüber sowohl O₂⁻ als auch NO inaktiv wird. Zur Aufklärung der Strukturänderung von **1** wurde NO in die anaerobe Lösung ([**1**] = 10 mM) in THF eingeleitet, und die Reaktionsprodukte wurden massenspektrometrisch analysiert. Das ESI-Massenspektrum (Positivionendetektion) des mit NO behandelten Komplexes **1** (Abbildung SI2 in den Hintergrundinformationen) zeigt einen großen Molekülionenpeak bei *m/z* 139.6, der aus der Kombination $M^{3+} = \{\mathbf{1}-3\text{H}+3\text{NO}\}^{3+}$ resultiert, sowie einen kleinen Peak bei *m/z* 365.2, der dem modifizierten Liganden ohne Mangan, $M^+ = \{(\text{pyane})-3\text{H}+3\text{NO}\}^+$, entspricht. Daher interpretieren wir das Produkt als dreifach (wahrscheinlich N-) nitrosyliertes Derivat von **1**. Zum Vergleich dazu zeigt das ESI-Massenspektrum (Positivionendetektion) von **1** einen Molekülionenpeak bei *m/z* 110.6, was $M^{3+} = \{\mathbf{1}\}^{3+}$ entspricht. Die anaerobe Behandlung von **2** (0.5 mg in 1 mL of THF) mit NO ergab unlösliche Reaktionsprodukte, die nicht weiter analysiert wurden.

Die Ergebnisse belegen klar, dass GSH, das effektiv die bei der anaeroben Behandlung von **1** und **2** mit einem großen Überschuss an NO entstehenden reaktiven NO-Spezies beseitigt, die Komplexe vor Strukturmodifikationen schützt, die

zu ihrer Desaktivierung führen würden. Dadurch wird die Erhöhung des NO-Umsatzes in Gegenwart von GSH verursacht. Zu beachten ist dabei, dass der SOD-aktive Komplex **1** etwas effizienter in der NO-Dismutierung als der SOD-inaktive Komplex **2** ist, verursacht durch seine größere Stabilität in Lösung.^[8]

O₂ reagiert bereitwillig in Wasser mit NO zu NO₂⁻.^[15] Wir prüften daher, ob **1** und **2** mit O₂ um NO unter aeroben Bedingungen konkurrieren können. Abbildung 2a belegt, dass

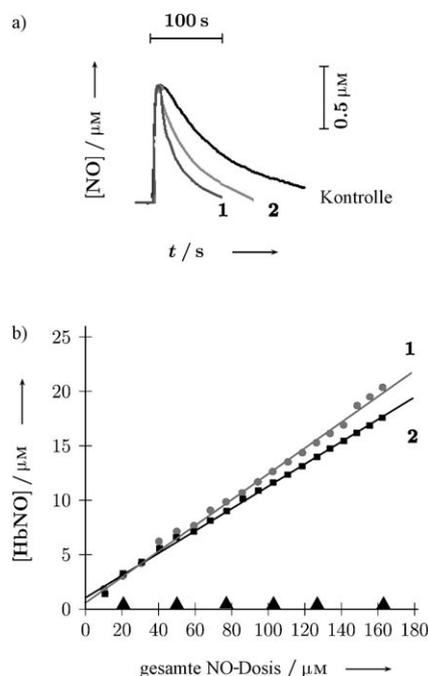


Abbildung 2. Aerobe Reaktion von **1** und **2** mit NO. a) NO-Abbau (1 µM) unter aeroben Bedingungen, verursacht durch die Reaktion mit O₂ (Kontrollreaktion) sowie nach Zugabe von **1** und **2** (je 15 µM). Die Reaktionen wurden an einer NO-Elektrode verfolgt (pH 7.4, 23°C). b) Reduktive Nitrosylierung von MetHb (50 µM) zu HbNO. Die aeroben Lösungen von **1** (●) und **2** (■) (je 15 µM, pH 7.4, 23°C) sowie die Kontrollreaktion (ohne Komplexe; ▲) wurden um MetHb ergänzt, und aufeinanderfolgende Zugaben (je 10 µL) an NO-Lösung wurden vorgenommen, bis eine Konzentration von [NO] = 10 µM erreicht war.

beide Komplexe unter aeroben Bedingungen die Geschwindigkeit des NO-Abbaus erhöhen. Die Auftragungen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten als Funktion der Komplexkonzentrationen ist linear, wobei die Steigungen den Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die aerobe Reaktion von NO mit **1** (891 M⁻¹ s⁻¹) und **2** (466 M⁻¹ s⁻¹) entsprechen (23°C; Bedingungen pseudo-erster Ordnung, Komplex im Überschuss). Der Achsenabschnitt entspricht der Geschwindigkeit des ausschließlich von O₂ verursachten NO-Abbaus (Abbildung SI3 in den Hintergrundinformationen).

Da Stickstoffoxide, die bei der Reaktion von NO mit O₂^[15] gebildet werden, eine Quelle für NO⁺-Spezies sind,^[13] untersuchten wir nur die Umsetzung von NO zu HNO/NO⁺-Spezies durch aerobe Reaktion von **1** und **2** mit NO. Sowohl die reduktive Nitrosylierung von MetHb (Methämoglobin) zu

mit in Zellkulturen aktivierter Makrophagen produziertem NO^[22] reagieren und ob sie die NO-inhibierte Thrombozytenaggregation schwächen können.^[23] Abbildung 5a zeigt, dass in Gegenwart von **1** und **2** die NO-Konzentration in den

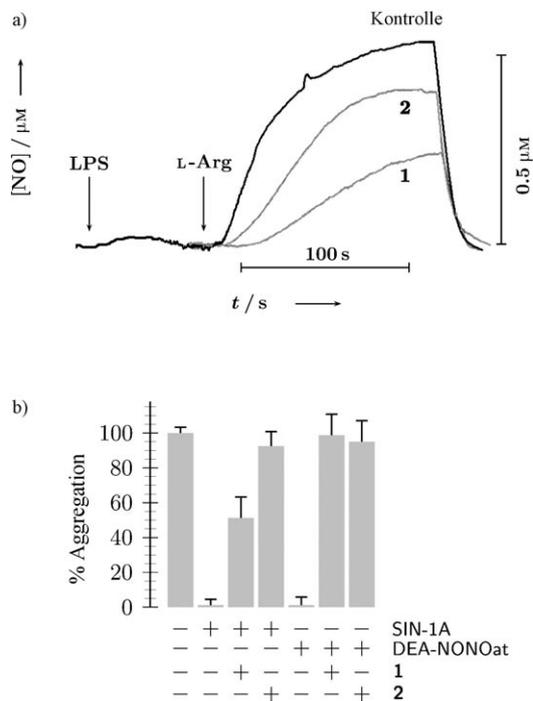


Abbildung 5. Der Effekt von **1** und **2** auf a) die NO-Produktion in aktivierten Makrophagen und b) die NO-vermittelte Inhibition der Thrombozytenaggregation. a) Murine Makrophagen (3×10^6 Zellen) wurden in Respirationspuffer mit **1** oder **2** (je $100 \mu\text{M}$) für 2 h bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde der Puffer abgesaugt, und die Zellen wurden im Puffer unter Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS) ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) und L-Arginin ($50 \mu\text{M}$) resuspendiert. Die NO-Produktion wurde an einer NO-Elektrode 10 min lang gemessen. Anschließend wurde Hämoglobin-Lösung ($20 \mu\text{M}$) zur Entfernung des restlichen NO zugegeben. b) Thrombozytenreiches Plasma (PRP) ($500 \mu\text{L}$, 2.5×10^8 Zellen L^{-1}) wurde bei 37°C mit DEA-NONOat (NO-Donor) oder SIN-1 (NO- und $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Donor) (je $10 \mu\text{M}$) vor der Aktivierung mit Kollagen vorinkubiert. PRP wurde mit $10 \mu\text{M}$ **1** oder **2** vor Zugabe der NO-Donoren und des Kollagens vorinkubiert.

aktivierten Makrophagen signifikant niedriger als im Kontrollversuch ist. Dies deutet an, dass beide Komplexe mit in den aktivierten Zellen generiertem NO reagieren. Anders als bei den obigen Ergebnissen, die belegen, dass **1** reaktiver als **2** gegenüber NO ist, erkennt man in Abbildung 5a, dass der SOD-inaktive Komplex **2** effizienter als **1** im Verbrauch des in den aktivierten Makrophagen produzierten NO ist. Die Makrophagen erzeugen auch eine große Menge an $\text{O}_2^{\cdot-}$, das sich schnell mit NO zu Peroxynitrit kombiniert.^[22] Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Mn^{II}-Komplexe von Pentaazamakrocyclen mit NO in biologischer Umgebung reagieren könnten, sogar in Gegenwart von $\text{O}_2^{\cdot-}$. Unter diesen Bedingungen zeigen SOD-aktive Komplexe, die sowohl mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ als auch mit NO reagieren, niedrigere Reaktivität gegenüber NO als SOD-inaktive Komplexe, die ausschließlich mit NO reagieren. Abbildung 5b belegt, dass sowohl **1** als auch **2** die NO-

inhibierte Thrombozytenaggregation als Reaktion auf Kollagen schwächen. In Gegenwart von SIN-1A, einem NO- und $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Donor, ist der SOD-inaktive Komplex **2** wieder effizienter in der Verhinderung NO-vermittelter Effekte als der SOD-aktive Komplex **1**.

Zusammenfassend belegen unsere Ergebnisse, dass sowohl **1** als auch **2** die NO-Disproportionierung über den katalytischen Dismutierungsmechanismus anregen. Der Mechanismus umfasst die Bildung labiler Metall-Nitrosyl-Addukte, in denen an das Metallzentrum gebundenes NO den Charakter und die Reaktivität von NO⁻- und NO⁺-Spezies zeigt, was sich aus dem Mn^{II}/Mn^{III}-Redoxzyklus ergibt [Gl. (1) und (2)]. Dieses unseres Wissens neue Reaktionsverhalten von Metallkomplexen mit NO scheint dem in früheren Studien beschriebenen Verhalten der natürlichen MnSOD^[5,6] zu ähneln. Das Konzept der Selektivität der Mn^{II}-Pentaazamakrocyclen gegenüber $\text{O}_2^{\cdot-}$ und die fehlende Reaktivität gegenüber NO^[2] wird durch diese chemische und Ex-vivo-Studie in Frage gestellt. Die Ergebnisse regen vielmehr an, die zellschützenden Wirkungen der Mn^{II}-Pentaazamakrocyclen gegen oxidativen Stress^[2] besser über deren Fähigkeit zu erklären, sowohl $\text{O}_2^{\cdot-}$ als auch NO abzubauen und damit die Bildung des Zellgifts Peroxynitrit zu vermindern. Wir sind der Auffassung, dass die Hemmung der Hypotonie, die mit der Interleukin-Therapie durch Mn^{II}-Pentaazamakrocyclen^[24] in Verbindung gebracht wird, durch die Fähigkeit der Komplexe, den Überschuss an NO zu entfernen, verursacht wird. Wir erwarten, dass die biomedizinischen Folgerungen der vorliegenden Studie die weitere Suche nach wirklich selektiven SOD-Mimetika anregen wird.

Experimentelles

Siehe die Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 19. März 2008,
veränderte Fassung am 3. Juni 2008

Stichwörter: Makrocyclische Liganden · Mangan · Nitroxylradikal · SOD-Mimetika · Stickstoffmonoxid

- [1] D. P. Riley, O. F. Schall, *Adv. Inorg. Chem.* **2006**, *59*, 233–263.
 [2] a) D. Salvemini, Z. Q. Wang, J. L. Zweier, A. Samouilov, H. Macarthur, T. P. Misko, M. G. Currie, S. Cuzzocrea, J. A. Sikorski, D. P. Riley, *Science* **1999**, *286*, 304–306; b) E. Masini, E. S. Cuzzocrea, E. Mazzon, C. Marzocca, P. F. Mannaioni, D. Salvemini, *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *136*, 905–917; c) C. Di Filippo, S. Cuzzocrea, R. Marfella, V. Fabbri, G. Scollo, L. Berrino, D. Giugliano, F. Rossi, M. D'Amico, *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *497*, 65–74; d) D. Salvemini, T. M. Doyle, S. Cuzzocrea, *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 965–970; e) S. Cuzzocrea, D. P. Riley, A. P. Caputi, D. Salvemini, *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 135–159; f) C. Muscoli, S. Cuzzocrea, D. P. Riley, J. L. Zweier, C. Thiemeermann, Z. Q. Wang, D. Salvemini, *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 445–460; g) D. Salvemini, E. Mazzon, L. Dugo, D. P. Riley, I. Serraino, A. P. Caputi, S. Cuzzocrea, *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 19–29.
 [3] a) S. Moncada, R. M. Palmer, E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109–142; b) B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, **2007**, S. 53–66; c) D. Salvemini, T. M. Doyle, S. Cuz-

- zocrea, *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 965–970; d) V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield, A. M. Giuffrida Stella, *Nat. Rev. Neurosc.* **2007**, *8*, 766–775.
- [4] a) P. C. Ford, I. M. Lorkovic, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 993–1017; b) G. G. Martirosyan, A. S. Azizyan, T. S. Kurtikyan, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4079–4087; c) M. Wolak, R. van Eldik, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *230*, 263–282; d) F. Roncaroli, M. Videla, L. D. Slep, J. A. Olabe, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1903–1930; e) I. Ivanović-Burmazović, R. van Eldik, *Dalton Trans.* **2008**, 5259–5275.
- [5] V. Niketić, S. Stojanović, A. Nikolić, M. Spasić, A. M. Michelson, *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 992–996.
- [6] M. R. Filipović, D. Stanić, S. Raičević, M. Spasić, V. Niketić, *Free Radical Res.* **2006**, *41*, 62–72.
- [7] Der Begriff NO-Dismutierung für die Umsetzung von NO zu NO⁺- und NO⁻-Spezies wurde vorgeschlagen (S. Stojanović, D. Stanić, M. Nikolić, M. Spasić, *Nitric Oxide* **2004**, *11*, 256–262), um eine Unterscheidung zu dem oben genannten Prozess der NO-Disproportionierung durch Übergangsmetallkomplexe vornehmen zu können.
- [8] In wässriger Lösung liegen alle Mn^{II}-Komplexe dieser Klasse als Diaquo-Verbindungen vor (Eigenschaften in Lösung sowie Stabilität von **1** und **2** siehe: A. Dees, A. Zahl, R. Puchta, N. J. R. van Eikema Hommes, F. W. Heinemann, I. Ivanovic-Burmazovic, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 2459–2470).
- [9] D. Salvemini, *PCT Int. Appl. WO 98/58636*, **1998**.
- [10] Optische Spektroskopie konnte in unserer Studie nicht angewendet werden, da im UV/Vis-Spektrum der Lösungen von **1** und **2** nach Zugabe von NO keine Änderungen beobachtet werden konnten.
- [11] a) K. Ghosh, A. A. Eroy-Reveles, B. Avila, T. R. Holman, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 2988–2997; b) K. J. Franz, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9034–9040.
- [12] N. Hogg, R. J. Singh, B. Kalyanaraman, *FEBS Lett.* **1996**, *382*, 223–228.
- [13] J. Stamler, M. Feelisch in *Methods in Nitric Oxide Research* (Hrsg.: M. Feelisch, J. S. Stamler), Wiley, Chichester, **1996**, S. 521–540.
- [14] a) D. A. Wink, M. Feelisch in *Methods in Nitric Oxide Research* (Hrsg.: M. Feelisch, J. S. Stamler), Wiley, Chichester, **1996**, S. 403–412.
- [15] R. S. Lewis, W. M. Deen, *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 568–574.
- [16] G.-F. Liu, M. Filipović, F. W. Heinemann, I. Ivanović-Burmazović, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 8825–8835.
- [17] Wegen der niedrigen Löslichkeit von **2** in THF konnte diese Methode nicht für die Aufklärung der Reaktion von **2** mit NO angewendet werden.
- [18] Mn^{III} ist in siebenfach koordinierter Geometrie nicht sehr stabil, und in Lösung existiert ein Gleichgewicht zwischen sechs- und siebenfach koordinierten Spezies (siehe auch Lit. [1]).
- [19] M. D. Bartberger, W. Liu, E. Ford, K. M. Miranda, C. Switzer, J. M. Fukuto, P. J. Farmer, D. A. Wink, K. N. Houk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10958–10963.
- [20] A. Wanat, T. Schnepfensieper, G. Stochel, R. van Eldik, E. Bill, K. Wieghardt, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 4–10.
- [21] a) J. S. Stamler, D. J. Singel, J. Loscalzo, *Science* **1992**, *258*, 1898–1902; b) K. M. Miranda, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 433–455; c) A. Maroz, G. F. Kelso, R. A. J. Smith, D. C. Ware, R. F. Anderson, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 4929–4935.
- [22] S. Arbault, H. Ghandour, Y. Tong, K. Coffi, C. Bouton, J. C. Drapier, C. Amatore, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 653–661.
- [23] U. Forstermann, K. Ishii in *Methods in Nitric Oxide Research* (Hrsg.: M. Feelisch, J. S. Stamler), Wiley, Chichester, **1996**, S. 555–566.
- [24] W. E. Samlowski, R. Petersen, S. Cuzzocrea, H. MacArthur, D. Burton, J. R. McGregor, D. Salvemini, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 750–755.