

ПРИРОДА

№ 7, 2005 г.

Недоспасов А.А., Беда Н.В.

Биогенные оксиды азота

© “Природа”

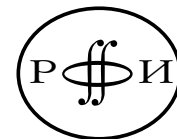
Использование и распространение этого материала
в коммерческих целях
возможно лишь с разрешения редакции



Сетевая образовательная библиотека “VIVOS VOCO!”
(грант РФФИ 03-07-90415)

vivovoco.nns.ru
vivovoco.rsl.ru
www.ibmh.msk.su/vivovoco

Биогенные оксиды азота



А.А.Недоспасов, Н.В.Беда

Окислы азота, в классическом понимании, — термодинамически неустойчивые вещества, состоящие из азота и кислорода. Биохимики и физиологи часто используют более широкое понимание этого термина: наряду с истинными (в химическом смысле) оксидами, к ним относят гидратированные формы, в том числе азотную (HNO_3) и азотистую (HNO_2) кислоты, и соответствующие ионы (нитрат, нитрит), а также пероксиды и другие соединения со связями NO-O . С учетом изомерии общее число всех этих веществ составляет несколько десятков, что достаточно для образования практически бесконечного количества комплексов с ионами металлов и всевозможными метаболитами. Поскольку реальные процессы *in vivo* протекают и регулируются именно через эти комплексы, биохимия оксидов азота воистину неисчерпаема.

Все оксиды азота, за исключением N_2O , ядовиты — именно их присутствие в выхлопных газах контролирует автоинспекция; именно их примесями в табачном дыме объясняли повышенную частоту рака легких среди курильщиков, т.е. с детства оксиды азота ассоциируются у нас с неприятностью, опасно-



Андрей Артурович Недоспасов, доктор химических наук, заведующий группой энзиматического анализа Института молекулярной генетики РАН. Занимается биохимией оксидов азота.

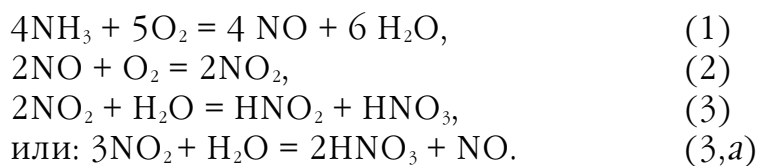


Наталья Владимировна Беда, младший научный сотрудник той же группы. Область научных интересов — аналитическая биохимия.

стью, ущербом для здоровья. Естественно, все они были всесторонне изучены химиками, нашли важные применения в химической промышленности и прикладных дисциплинах, их повсеместно изучали в курсах общей и неорганической химии, т.е. они были широко известны уже в начале XX в. не только из повседневного опыта (порох, взрывчатые вещества, лекарства, удобрения, красители и др.), но и из художественной литературы (например, «Гиперболоид инженера Гарина»). Эта известность была в значительной степени кажущейся, а в истории открытия и исследования биогенных оксидов азота она часто играла роль ингибитора.

© Недоспасов А.А., Беда Н.В., 2005

Напомним известные из школьного курса химии уравнения реакций, описывающих получение азотной кислоты:



Казалось, в нашем организме таких реакций быть не может. К середине XX в. оксиды азота воспринимались как вещества, несовместимые с какими-либо нормальными физиологическими процессами у высших животных. Наличие естественных источников оксидов азота в организме человека представлялось настолько противоречащим здравому смыслу и всей сумме химических знаний, что всерьез не рассматривалось десятки лет.

Открытие синтеза NO в клетках млекопитающих и его роли в расширении кровеносных сосудов стало одним из наиболее неожиданных и парадоксальных открытий естествознания и было отмечено в 1998 г. Нобелевской премией. Один из парадоксов состоит в том, что *in vivo* оксиды азота ранее многократно наблюдали, но не замечали, не верили собственным глазам и чужим экспериментам или не понимали, что они означают. Теперь трудно понять, как в течение десятилетий можно было «не видеть» давно знакомых химикам веществ, играющих ключевые роли в регуляции кровообращения, отвечающих за формирование памяти и участвующих в передаче внутри- и межклеточной информации, дифференцировке тканей и иммунных реакциях, веществ, непосредственно связанных с наиболее опасными болезнями, включая инфаркты и инсульты, рак и диабет, инфекционные заболевания и септический шок.

Предыстория и предпосылки

Биосинтез NO был открыт в 1987 г. благодаря активации им гуанилатциклазы (ведущая роль этого фермента в расширении кровеносных сосудов была известна и ранее), которая осуществляется при взаимодействии NO с атомом железа гема с образованием связи Fe-N.

Путь к этому открытию был долог и тернист. Первой заметной вехой была работа П.Митчелла и соавторов 1916 г.: любознательные исследователи пытались выяснить, откуда берется нитрат, выводимый с мочой человека и животных. В те годы удобных методов анализа нитрата не существовало — его определяли взвешиванием в виде KNO_3 (калийной селитры, использовавшейся для получения пороха). Современному химику-аналитику остается только восхищаться мастерством, трудолюбием и терпением исследователей, которые ежедневно в течение нескольких месяцев количественно (!) кристаллизовали нитрат из мочи лабораторных животных и собственной,

а для сравнения — из образцов еды и напитков, эквивалентных съеденным/выпитым за сутки. Диета экспериментаторов не отличалась однообразием или ограниченностью источников продуктов — каждый день анализ нитрата в пище проводили заново. Вывод не вызывал сомнений: человек выделяет нитрата больше, чем потребляет с пищей. Иными словами, какие-то соединения азота окисляются в организме в нитрат. Увы, авторы слишком опередили время — это замечательное открытие оставалось фактически невостребованным более 60 лет.

У млекопитающих NO образуется при окислении аргинина — природной аминокислоты, входящей в состав белков, и расходуется в серии конкурирующих реакций (рис.1). Благодаря циклам, возвращающим продукты окисления обратно в NO, его синтез *in vivo* продолжается даже после полной блокады NO-синтазы (NOS). Интересно, что ингибиторы этих ферментов используются

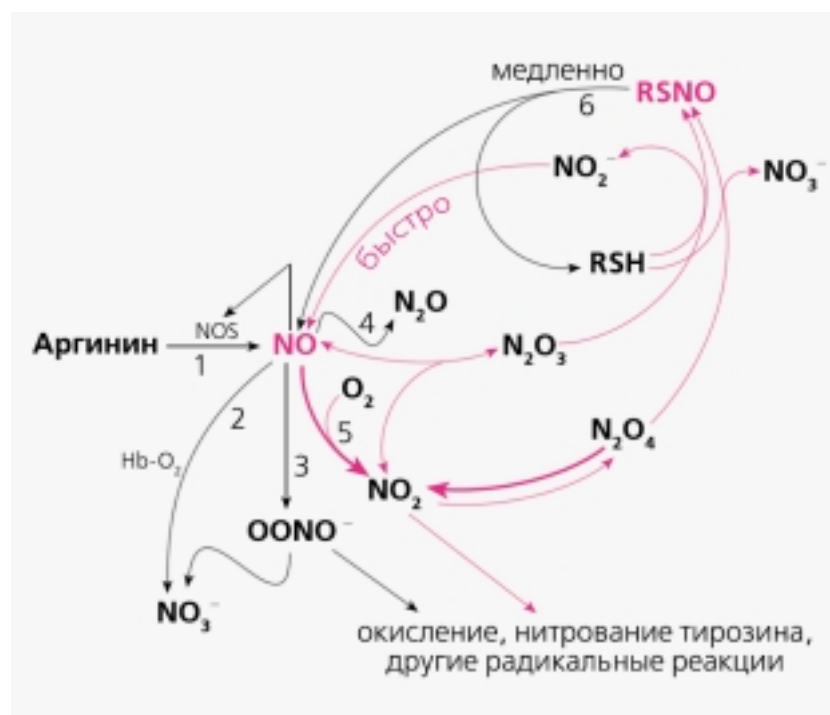


Рис.1. Схема биосинтеза NO и основных метаболических путей оксидов азота. NO, первоначально образующийся из аргинина под действием NOS (1), вступает во множество конкурирующих реакций: комплекс кислорода с гемоглобином (Hb-O₂) и другими гем-содержащими белками окисляет его в нитрат, NO₃⁻ (2); при взаимодействии с супероксидным радикалом он образует пероксинитрит (OONO⁻) (3); небольшие количества NO восстанавливаются до N₂O (4) и даже до аммония. NO окисляется до диоксида NO₂ (5), дающего смесь других оксидов азота (изомеры N₂O₃ и N₂O₄). Все высшие оксиды реакционноспособны; показано нитрозирование тиолов (RSH) с образованием тионитритов (RSNO) и ионов нитрата (NO₃⁻) или нитрита (NO₂⁻). Как и NO, RSNO вызывают расширение сосудов. NO₂ и RSNO могут снова превращаться в NO; восстановление нитрата у млекопитающих малоэффективно. Избыток NO ингибирует NOS.

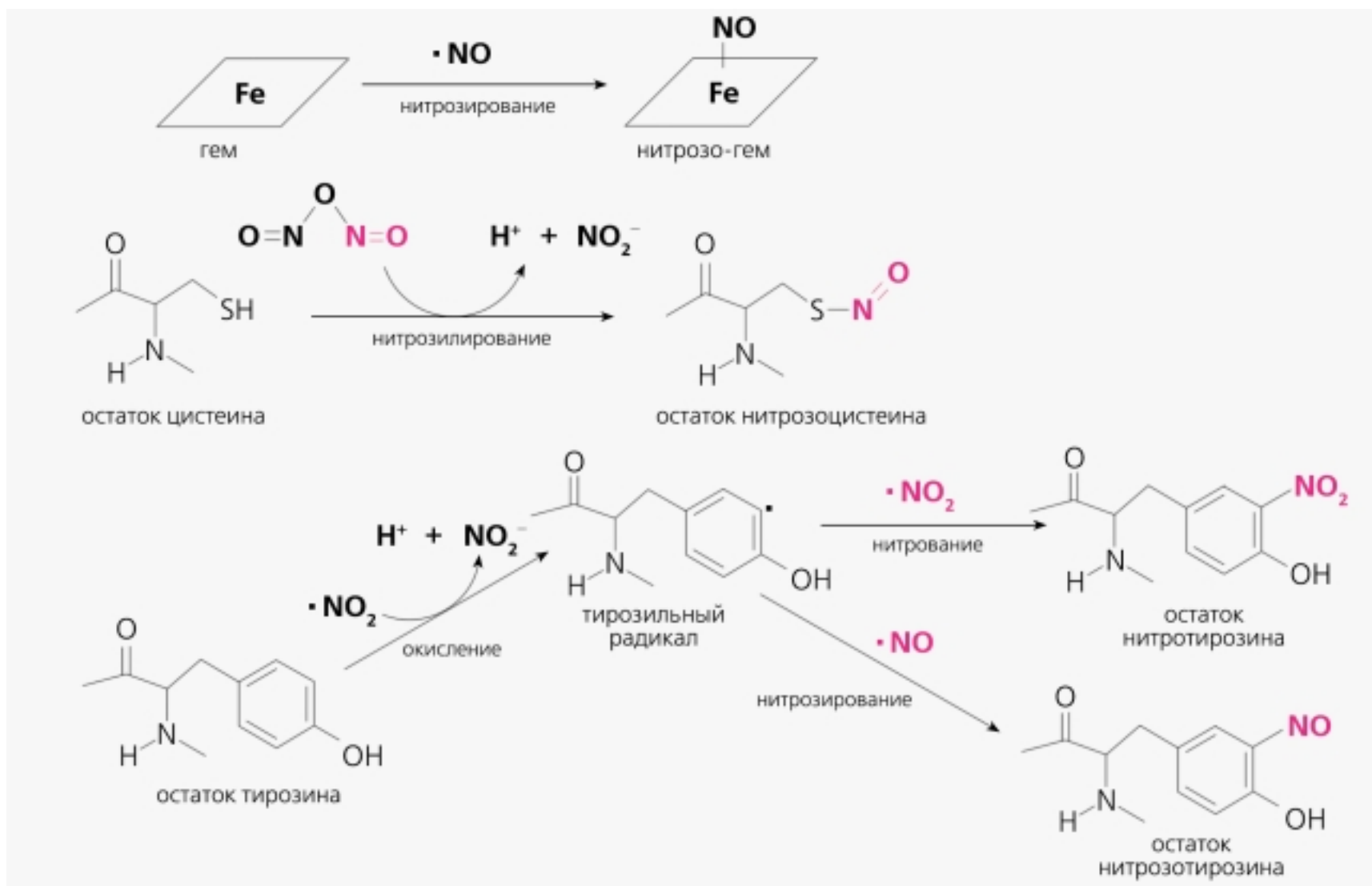


Рис.2. Основные типы химических реакций с участием биогенных оксидов азота: нитрозирование, нитрозилирование, нитрование, окисление. (В биохимической литературе термины нитрозирование и нитрозилирование часто используют как синонимы; в русскоязычной химической — нитрозилирование, обычно — электрофильная реакция, а по официальной номенклатуре IUPAC — радикальная.)

в медицине для защиты от перепроизводства NO, обычного при септическом шоке («заражение крови») и некоторых инфекциях.

Среднее время жизни молекулы NO в организме человека — менее пяти секунд, а для тионитритов (нитрозотиолов, RSNO — см. рис.1), в зависимости от радикала R, составляет десятки минут и даже часы. По этой причине основная масса оксидов азота, вовлеченных в круговорот, приходится не на NO, а на продукты его окисления, которые и образуют депо оксидов азота. У человека и многих млекопитающих восстановление нитрата в нитрит в обычных условиях малоэффективно — основная часть образовавшегося нитрата выводится с мочой.

Таким образом, баланс между реакциями окисления NO регулирует количество обращающихся в цикле оксидов азота, а следовательно, и все зависящие от них физиологические процессы. Ясно, что изучение механизмов сохранения или изменения этого баланса и активности NO-синтаз (двух путей поддержания пула оксидов азота) — фундаментальная проблема биохимии, имеющая важнейшие практические приложения.

В организме наиболее многочисленны реакции оксидов азота, обеспечивающие их участие

в регуляции активности белков, а через них и генов. Это реакции нитрования, нитрозилирования (введение остатка нитрозила под действием NO^+ — электрофильная реакция), нитрозирование (введение радикала $\cdot\text{NO}$ — свободно-радикальный механизм) с образованием связей C–N, N–N, S–N, O–N (рис.2). Среди них лучше всего изучено нитрозилирование SH-групп остатков цистеина, т.е. превращение их в нитрозотиолы RSNO (R — остаток цистеина белковой молекулы).

Быстро обнаружилось, что в молекулу белка вводится сразу несколько NO-групп, а избирательность этой модификации никакими разумными схемами объяснить не удалось. Пока в молекуле белка два-три свободных остатка цистеина, можно рассматривать гипотезы случайного выбора модифицирующего сайта — по закону лотереи какая-то часть молекул модифицируется правильно. Но если остатков цистеина более 80, а при активации белка нитрозилируются определенные 20, ни для какой лотереи места не остается — даже единственного выигрыша пришлось бы ждать вечно. А при активации кальциевого канала реализуется именно этот случай [1].

S-нитрозирование и другие NO-зависимые модификации белков имеют первостепенное значе-

ние для всего комплекса наук о живом. Между тем, основной постулат ранних работ о биохимическом нитрозировании оказался ошибочным. Детальные исследования показали, что при физиологических концентрациях NO практически не реагирует с тиолами (RSH), при высоких образует N₂O, но не RSNO [2]. Таким образом, ни механизмов нитрозирования, ни механизмов избирательности, ни источников энергии для ее поддержания, ни даже самого нитрозирующего агента *in vivo* найдено не было.

Мицеллярное окислительное нитрозирование

После открытия биосинтеза NO в клетках млекопитающих считалось, что главный путь его распада *in vivo* — окисление в нитрат под действием комплексов гемоглобина и миоглобина с кислородом. Понадобилось пять лет всемирного увлечения биохимией оксида азота, чтобы назвать NO «Молекулой года» (1992), и еще год, чтобы усомниться в правомочности логического вывода из общеизвестного факта — казалось само собой разумеющимся, что при окислении NO *in vivo* нитрат образуется и без гемоглобина (реакции (3), (3,а)). В 1993—1994 гг. в ведущих биохимических и общенаучных журналах появилась серия статей, показывающих, что в модельных экспериментах с физиологическими концентрациями NO и кислорода в воде образуется нитрит и лишь следы нитрата. Факт казался парадоксальным, поскольку в общеизвестных из школьного курса химии реакциях (3, 3,а) получается нитрат (азотная кислота). В действительности реакция (3) невозможна. Молекула NO₂ с нечетным числом электронов (23e⁻) не может прореагировать с молекулой воды (четное число — 10e⁻). Сначала она взаимодействует с другой нечетной молекулой, в данном случае — со второй молекулой NO₂. Обычно в организме концентрация NO такова, что получающегося при его окислении NO₂, столь мало, что встреча этих двух молекул — весьма редкое событие.

Осознав, что синтезируемый из аргинина NO может окисляться в нитрит и должен участвовать в нитрозировании, биохимики столкнулись с необходимостью поиска основного нитрозирующего интермедиата в организме. Исследовав кинетику реакции в кислородсодержащих растворах NO и перебрав все известные оксиды азота, группа американских ученых пришла к выводу: ни один из них на эту роль не подходит. Предположили наличие неизвестного оксида (-ов), который назвали NO_x [3, 4]. Работы имели большой резонанс, однако вскоре в них обнаружился ряд неточностей, существование неизвестного оксида стало восприниматься скептически (как увидим, преждевременно), а символ NO_x остался для обо-

значения нитрозирующего интермедиата при действии NO в аэробных условиях.

Чуть более года потребовалось для следующего логического шага: раз при окислении NO кислородом в водных растворах образуется только нитрит, значит, нитрозирующий агент — N₂O₃, который получается по обратимой реакции (4) и тут же гидролизуется (5):



Однако изучение кинетики окисления NO показало: при его физиологических концентрациях (<10⁻⁶ M) реакция (2) слишком медленна, чтобы заметно влиять на нитрозирование. Сложилась парадоксальная ситуация: N₂O₃ — общепризнанный нитрозирующий агент *in vivo*, но образоваться с необходимой скоростью он не может.

Ситуация прояснилась с открытием роли мицеллярного катализа при окислении NO [5—7]. Растворимость NO и O₂ в воде ниже, чем в большинстве менее полярных растворителей, в том числе в липидах, и коэффициенты распределения Q (отношение равновесных концентраций растворенного вещества в гетерогенной смеси двух ограничено смешивающихся жидкостей) в гетерогенных смесях таких веществ с водой (Q_{NO}, Q_{O₂}) много больше 1. Соответственно, мембраны клеток, гидрофобные глобулы белков, РНК, липопро-теины и другие гидрофобные фазы действуют как губки, вытягивая реагенты из водных фаз и концентрируя их в малом объеме липидных (рис.3).

Реакция окисления NO (2) — довольно редкий пример реакций третьего порядка (скорость таких реакций зависит от куба концентраций реагентов). В этом случае мицеллярный катализ особенно эффективен: хотя в водных фазах концентрации реагентов и скорость окисления падают, гидрофобные фазы с лихвой компенсируют эти потери, и в целом скорость реакции возрастает. Наибольшее ускорение (в десятки и сотни раз!) достигается при относительно малых долях гидрофобной фазы (рис.3, справа); дальнейшее увеличение доли липида замедляет процесс [5]. Соответственно, в гетерогенной среде скорость окисления NO может более чем на два порядка превышать скорость реакции в воде при том же суммарном содержании NO и кислорода. Парадокс с поиском пути образования N₂O₃, необходимого для нитрозирования, казалось, был разрешен.

Экспериментальная проверка не заставила себя ждать, как и полагали авторы: в гетерогенных модельных системах, включая липосомы*, окисление NO было пропорционально доле добавленной гидрофобной фазы [6]. Однако быстро выяснилось, что все не так хорошо: в одной и той же модели вы-

* Искусственные образования, моделирующие клетку: вроде мыльного пузыря, но и снаружи, и внутри — вода, а роль клеточной мембраны играет тончайший слой мылоподобных молекул.

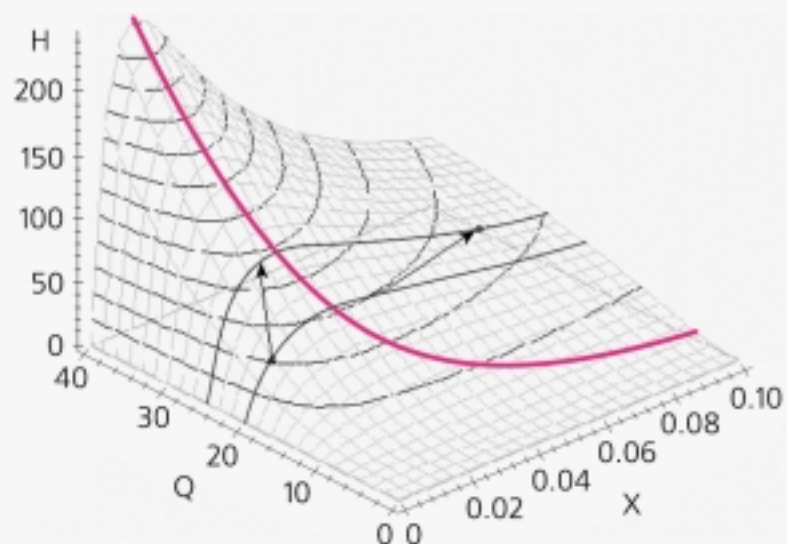
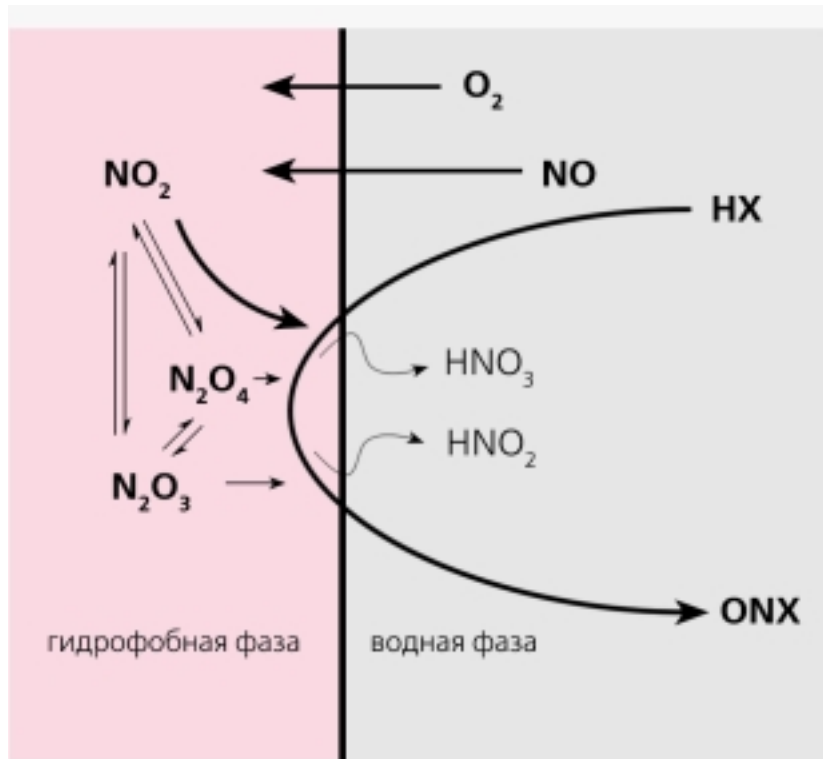


Рис.3. Схема мицеллярного катализа в окислении NO. Реакция окисления NO с образованием NO₂ преимущественно протекает в липидах, мембранах и гидрофобных компартментах биомолекул (слева). Трехмерная диаграмма зависимости увеличения кажущейся константы скорости реакции окисления NO (H) в гетерогенной двухфазной системе от объемной доли гидрофобной фазы (X) и коэффициентов распределения реагентов между фазами (Q). Принято, что $Q_{NO} = Q_{O_2} = Q$. Темные прерывистые кривые — сечения поверхности при постоянных значениях H; две сплошные — при постоянном сечении Q (Q = 20, Q = 25); красная — вершина гребня положения максимумов функции $H_{(X)}$ при разных значениях Q. Стрелками показаны два варианта изменений ускорения окисления NO (функция H) при одновременном увеличении значения Q с 20 до 25 и возрастании x вдвое. В первом случае (левая стрелка) скорость окисления NO возрастает, во втором (правая стрелка) — падает (по: Beda, Suntsova, 1999).

воды различались. В теоретической работе московских авторов зависимость скорости реакции имела максимум при относительно низких долях гидрофобной фазы, а у американских коллег та же зависимость была монотонной (больше доля гидрофобной фазы — больше скорость окисления).

Новый парадокс разрешился год спустя: максимум на кривой «нашелся» при большей доле гидрофобной фазы, в первой работе экспериментально не исследованной [7]. Подстановка экспериментальных результатов американских коллег в «правильное» уравнение российских исследователей показала, что исправление математических ошибок не устраняет расхождения теории и эксперимента — результаты опытов нельзя удовлетворительно описать в двухфазных моделях (водная и гидрофобная фазы). Был сделан вывод: все реальные системы *in vivo* применительно к метаболизму NO должны рассматриваться как многофазные. В целом стало ясно, что при изучении метаболизма NO и нитрозирования нужно учитывать опыт коллоидной химии и химической кинетики в гетерогенных средах.

Резкая зависимость скорости окисления NO от доли гидрофобной фазы означает, что связанные с NO обменные процессы могут эффективно регулироваться содержанием воды в тканях: при обез-

воживании «автоматически» увеличивается доля липидов, а скорость окисления NO сначала растет, затем падает (рис.3, движение вдоль сплошной линии, например при Q = 20). Если зависимость с максимумом оказывается встроенной в регуляторный механизм по принципу обратной связи, возможны ситуации, названные нами NO-катастрофами: при достижении максимума эта обратная связь меняет знак [5]! Например: в жару или в бане из-за обильного потоотделения (испарение пота с поверхности кожи — механизм защиты от перегрева) и обезвоживания скорость окисления NO, а значит, и общее количество оксидов азота в цикле первоначально растут. Эффект известен и ожидаем: расширение сосудов, улучшение кровоснабжения, покраснение кожи... Что случится при «передозировке»? Дальнейшее обезвоживание (пересечение гребня на рис.3) ведет к уменьшению скорости окисления NO и общего пула оксидов азота в цикле, сужению сосудов (бледности), ухудшению кровоснабжения. Вспомним драматические картины марафонского забега в жару на Олимпиаде в Афинах. Одна из основных фавориток была на голову выше соперниц в буквальном смысле, больше теряла воды с потом, раньше достигла максимума... Здесь результатом NO-катастрофы была потеря «только» олимпийской медали.

Оказалось, учет мицеллярного катализа не только не конец, а скорее начало: некоторые проблемы остались, среди них — происхождение нитротирозина в составе белков в отсутствие пероксинитрита,* роль температуры в реакциях нитрозирования и механизмы обеспечения избирательности и регулирования. Проведенный нами анализ привел к совершенно неожиданному выводу: аргументация, использованная при номинации N_2O_3 на роль основного нитрозирующего агента, основывалась на экспериментах, выполненных в гомогенных водных растворах, и недоказательна для гетерогенных систем.

N_2O_3 — вещество нестабильное: во-первых, из-за легкости нитрозилирования при его участии



когда он выступает как ангидрид кислоты (5); во-вторых, из-за легкости распада по обратимой реакции (4), быстро идущей уже ниже $0^\circ C$. При окислении NO в водных растворах стационарная концентрация N_2O_3 очень мала, но поскольку ни NO , ни NO_2 сами с водой не реагируют, даже этой малой концентрации достаточно, чтобы в конце концов весь NO превратился в нитрит (4), (5). В гетерогенной среде NO окисляется (2) в основном в гидрофобной фазе, и именно в ней образуется NO_2 . Но что дальше: будет ли он реагировать далее с NO с образованием N_2O_3 , если да, то с чем будет реагировать N_2O_3 (воды в гидрофобной фазе нет!), и, наконец, найдет ли NO_2 в гетерогенной среде подходящего партнера для реакции, помимо NO ?

В гидрофобных малополярных растворителях (и в обычных липидах) устойчивость N_2O_3 на порядок ниже: при той же температуре равновесие реакции (4) смещено в сторону $NO + NO_2$ в гораздо большей степени, чем в полярных, в том числе и в воде (рис.4). Даже если бы константы скорости нитрозилирования под действием N_2O_3 в гидрофобных и водных фазах были бы сравнимы, в липидах эта реакция была бы намного медленнее из-за более низкой стационарной концентрации N_2O_3 . Это означает, что в гетерогенных средах NO окисляется быстрее (2), но образующийся в гидрофобных фазах NO_2 может расходоваться по реакциям (4) и (5) менее эффективно, т.е. его стационарные концентрации будут расти.

Какие есть выходы для NO_2 ? Уйти в водную фазу и найти там NO для образования N_2O_3 ? Теперь это сложно: во-первых, в водной фазе уменьшилась концентрация NO (он теперь в основном в гидрофобной фазе); во-вторых, коэффициент распределения для NO_2 тоже больше 1; в третьих, до водной фазы надо еще добраться — в процесс включается диффузия, эффективность которой падает с ростом расстояния. Это означает, что

* Изомер нитрата со связью $O-O$; токсин, вырабатываемый макрофагами и другими подобными им клетками-убийцами патогенов и раковых клеток.

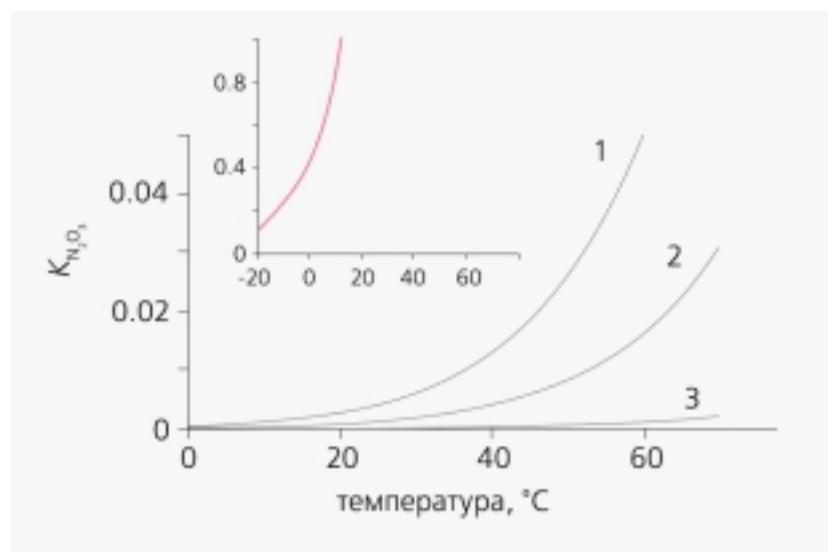


Рис.4. Графики зависимости константы равновесия реакции диссоциации (мера нестабильности) N_2O_3 от растворителя и температуры. 1 — алкан (неполярный растворитель), 2 — CCl_4 , 3 — CH_3CN (полярный растворитель). На вставке для сравнения показана зависимость для газовой фазы. Сдвиг равновесия в сторону диссоциации $N_2O_3 \leftrightarrow NO + NO_2$ в липидах и других гидрофобных фазах предопределяет увеличение радикальных реакций в гетерогенных средах *in vivo*.

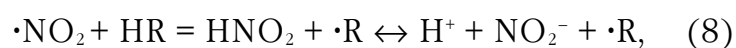
в случае крупных объектов, вроде холестеринной бляшки на стенке сосуда, она неэффективна (рис.5).

Другой выход — образование димера



и его последующий гидролиз до нитрита и нитрата (сравни уравнение (3)).

Есть и третий путь: реагировать по радикальному механизму с очень широким классом соединений (включая белки и нуклеиновые кислоты), которые он способен окислить (часто — просто оторвать протон)



образуя нитрит и новый радикал $\cdot R$.

Радикальные пути всегда чреваты неприятностями. NO_2 при этом восстанавливается в нитрит, но из молекул липидов, белков, нуклеиновых кислот и других метаболитов образуются свободные радикалы. Какова их дальнейшая судьба? В лучшем случае они прореагируют с NO , образуя нитрозопроизводное:



или будут восстановлены тиолами (RSH), аскорбатом (витамин С), токоферолом (витамин Е) и другими восстановителями, призванными бороться со свободными радикалами в организме, в худшем — с молекулой NO_2 :



В обоих случаях ((9), (10)) взаимодействуют две

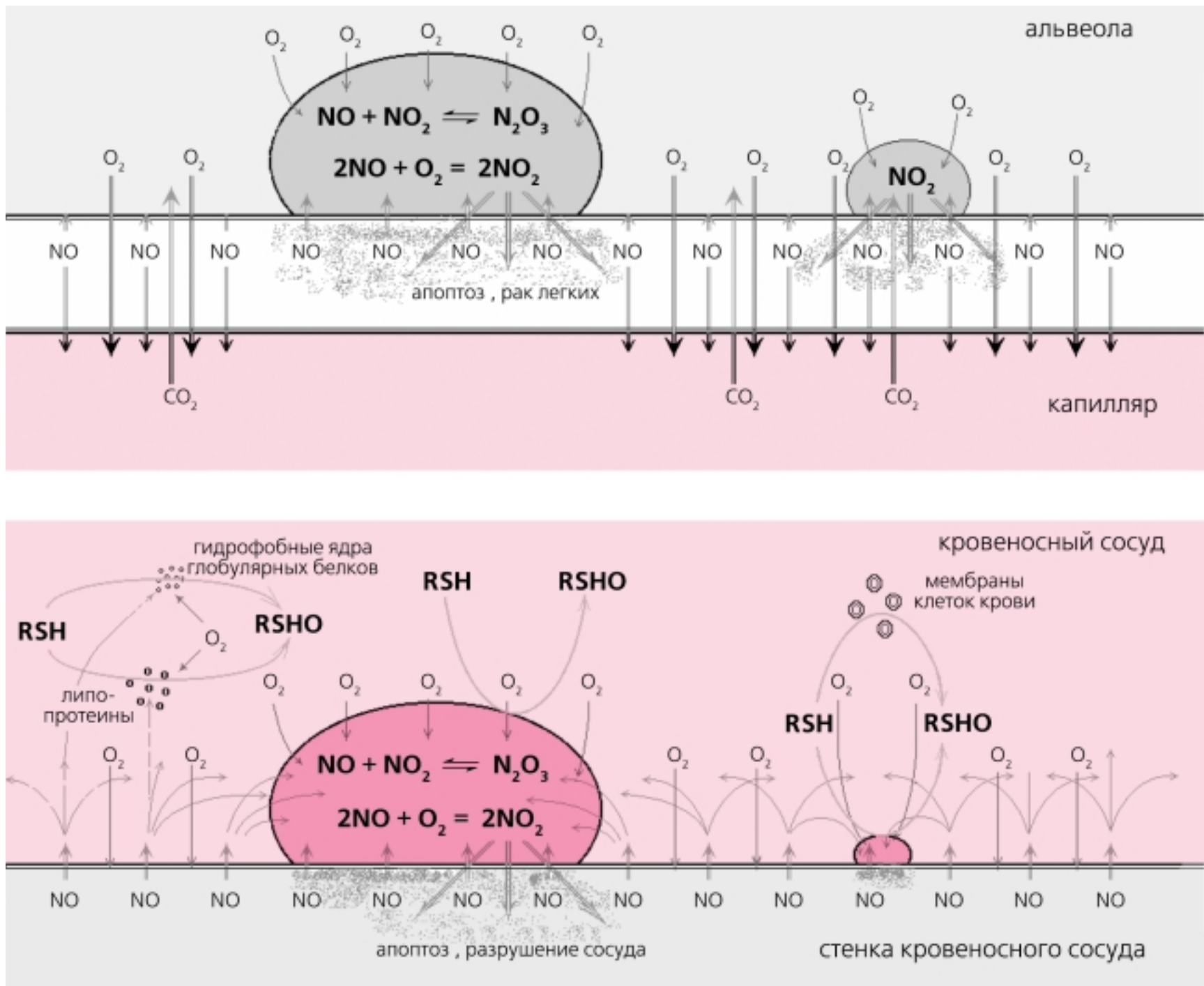


Рис.5. Схема мицеллярного окислительного нитрозирования (МОН). Реакционноспособный свободный радикал $\cdot\text{NO}_2$ и образующиеся из него высшие оксиды N_2O_3 и N_2O_4 вступают в серию конкурирующих реакций. Равновесие между оксидами азота в гидрофобной фазе смещено в сторону NO_2 . Стационарные концентрации поддерживаются реакциями в гидрофобной фазе и транспортом оксидов азота или продуктов в водные фазы. Катализ нитрозирования под действием N_2O_3 и N_2O_4 снижает концентрации всех высших оксидов, в том числе NO_2 , и тем самым уменьшает нитрование и другие радикальные реакции. МОН-зависимые механизмы действия двух наиболее грозных убийц сходны — рака легких (вверху) и инфарктов (внизу): капля смолы в легких курильщика и холестериновая бляшка на стенке кровеносного сосуда локализируются рядом с NO -продуцирующими клетками, обе — искусственные гидрофобные фазы. Из-за высокой растворимости в гидрофобных фазах концентрация NO в бляшке (капле смолы) выше, чем в окружающей водной фазе. Равновесие NO_x в гидрофобных фазах изменено в сравнении с водной фазой: стационарные концентрации NO_2 в гидрофобной фазе много выше, чем в водной. Критическое увеличение концентраций NO_x приводит к смене механизма распада NO_x с электрофильного (под действием NO^+) на радикальный (под действием NO_2), что вызывает нитрование и окисление биополимеров и метаболитов, апоптоз (программируемую гибель клеток) и/или злокачественное перерождение клеток и другие неприятности.

нечетные молекулы (свободные радикалы) с образованием четной — реакции протекают исключительно эффективно и обычно контролируются диффузией.

Нитрозирование белков в результате мицеллярного окисления позволяет объяснить и селек-

тивность, и эффективность. В случае глобулярных белков в качестве гидрофобной фазы может выступать гидрофобное ядро самой молекулы белка («белки нитрозируются изнутри»), селективность задается избирательной сольватацией оксидов азота и продуктов их превращений и ре-

гулируется структурой самого белка. Энергию для нитрозирования дает реакция окисления NO (2). Значит, ни специальных ферментов, ни дополнительных источников энергии (в том числе АТФ) для нитрозирования не требуется. Для нуклеиновых кислот «лучший случай» (9) ведет к нитрозированию оснований, некоплементарному спариванию, т.е. к мутагенезу. К счастью, в ходе эволюции для защиты от таких событий выработались эффективные защитные и репарирующие механизмы.

По второму сценарию — нитрозированию по реакции (10) — образуются нитропроизводные и белков, и нуклеиновых кислот. А это уже ЧП: не случайно уровень нитротирозина в составе белков и в моче — важные диагностические тесты при всякого рода воспалениях и многих патологиях. Нитрование нуклеиновых кислот также не сулит добра: участки нитрозирования и нитрования различны, а системы, защищающие от нитрозирования, могут быть неэффективны против нитрования. Недавно японскими исследователями показано накопление нитрогуанина в ДНК при атипичной вирусной пневмонии [8]. Более того, в опытах на мышах блокада биосинтеза NO эффективно снижала нитрование и тирозина в белках, и гуанина в ДНК, и смертность.

Помимо нитрования, имеются еще более «неприятные» сценарии: свободные радикалы реагируют с обычными метаболитами, образуя новые радикалы, часто более активные и опасные, причем реакционный центр не гибнет, а передается (цепная реакция). Сюда относится перекисное окисление липидов (четная молекула — молекула кислорода O₂). Крупная молекула, став радикалом, может прореагировать «сама с собой» и образовать внутримолекулярную сшивку (для белков наиболее известны сшивки между двумя остатками тирозина; для ДНК — межцепочечные сшивки, препятствующие нормальному расхождению хромосом при делении клеток), или «порваться» на два фрагмента, один из которых останется радикалом. Здесь мы встречаемся еще с одним парадоксом: свободный радикал NO используется в организме для уничтожения свободных радика-

лов и обрыва радикальных цепных реакций, в том числе образовавшихся в результате превращений того же NO.

В связи с возможными летальными последствиями накопления NO₂, нитрования по реакции (10) и других радикальных реакций, зададимся вопросом: почему бы в ходе эволюции не появиться основанному на NO₂ механизму защиты от патогенов? Небольшое увеличение температуры ведет к активации NO-синтаз и значительному росту концентрации NO₂ — сначала из-за диссоциации N₂O₃ (обращение реакции (4)), далее — из-за снижения концентрации N₂O₃ и уменьшения оттока по реакциям нитрозирования (6). При заболевании благодаря повышению температуры существенно увеличивается нитрование — его-то мы и определяем по наличию нитрованных белков, нитрогуанина или по возрастанию концентрации нитрата в моче. Человек с давних времен использует местное или общее нагревание как метод лечения (NO-зависимые процессы в народной медицине — увлекательная тема, требующая отдельной публикации).

Выше мы говорили о неизвестном оксиде азота (NO_x), которому сначала приписывалась ведущая роль в биологическом нитрозировании и который впоследствии большинство биохимиков признало несуществующим. Когда биохимики его окончательно «похоронили», китайские химики открыли неизвестный ранее изомер N₂O₃ (цис-, транс). Впрочем, изомерия высших оксидов азота химикам была известна и ранее: и в N₂O₃, и в N₂O₄ атомы азота в молекулах могут быть связаны и непосредственно, и через атом кислорода. Таким образом, к началу XXI в. стало ясно, что для описания нитрозирования *in vivo* необходим учет изомерии и сольватации высших оксидов азота — фундаментальных областей физической неорганической химии, до сих пор казавшихся бесконечно удаленными от физиологических процессов в организме млекопитающих. А наличие мицеллярного катализа заставляет пересмотреть основные представления о метаболизме оксидов азота и возможных путях влияния на этот метаболизм в норме и при всевозможных патологиях. ■

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Проекты 02-04-49530 и 03-04-06492.

Литература

1. Беда Н.В., Пименова (Сунцова) Т.П., Недоспасов А.А. // Проблемы и перспективы солярной генетики / Ред. Свердлов Е.Д. М., 2004. Т.2. С.237—301.
2. DeMaster E.G., Qast B.J., Redfern B., Nagasawa H.T. // *Biochemistry*. 1995. V.34. P.11494—11499.
3. Wink D.A., Darbyshire J.F., Nims R.W., Saavedra J.E., Ford P.C. // *Chem. Res. Toxicol.* 1993. V.6. P.23—27.
4. Wink D.A. et al. // *Chem. Res. Toxicol.* 1994. V.7. P.519—525.
5. Gordin V.A., Nedospasov A.A. // *FEBS Lett.* 1998. V.424. P.239—242.
6. Liu X., Miller M.J.S., Joshi M.S., Thomas D.D., Lancaster J.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V.95. P.2175—2179.
7. Beda N.V., Suntsova T.P. // *FEBS Lett.* 1999. V.453. P.229—235.
8. Akaike T. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V.100. P.685—690.