

О Г Л Я Д И

УДК 517.121/7.: 615.9

РОЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ФОРМАЛЬДЕГИДА И ОКСИДА АЗОТА В МЕХАНИЗМЕ ИХ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ. 2. ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ОКСИДА АЗОТА

Н. П. ДМИТРЕНКО¹, А. ХОЛИАН²

¹Институт экологии и токсикологии им. Л. И. Медведя, Киев, Украина;

²Center for Environmental Health Sciences, The University of Montana, USA;

e-mail: dmitr@medved.kiev.ua; mpdmitr@yandex.ru

Токсичні властивості NO в організмі реалізуються за його гіперпродукції та пригнічення антиоксидантної системи захисту внаслідок складних хімічних перетворень, основними компонентами яких є перехідні метали, кисень, супероксид й інші радикали. При цьому виявляються задіяні прямо (через утворення нітрозильних комплексів із гемовим і негемовим залізом) та опосередковано (через активні форми азоту) шляхи токсичної дії NO, що через реакції S- і N-нітрозування, нітрування, окислення, дезамінування й інші порушують функціонування різних біомолекул і субклітинних компонентів, спричинюють метаболічний дисбаланс і загибель клітин за типом апоптозу чи некрозу. На прикладі тимоцитів розглянуто можливий механізм загибелі клітин за дії NO, відповідно до якого одним з його раних етапів є зниження клітинного фонду АТР, посилення катаболізму аденіннуклеотидів та трансформація ксантиноксидоредуктази з D-форми (ксантиндегідрогеназої) в O-форму (ксантиноксидазу), що каталізує утворення цитотоксичних молекул супероксиду і гідропероксиду. Цей цитотоксичний механізм, що включає в себе трансформацію ксантиноксидазної системи, ймовірно є універсальним і істотно не залежить від пускового фактора.

К л ю ч о в і с л о в а: оксид азоту, динітрозильний комплекс негемового заліза (DNIC), пероксинітрит, реактивні форми оксидів азоту (RNOS), N- і S-нітрозування, апоптоз, некроз, цитотоксична дія.

Как межклеточный и внутриклеточный мессенджер NO участвует в регуляции разнообразных метаболических реакций, обеспечивающих жизнеспособность и функциональную активность клеток и всего организма в целом, но при определенных условиях он способствует формированию патологических процессов. Такое “двуликое” действие NO определяется химическими свойствами молекулы и реализуется тем или иным способом в зависимости от его концентрации, времени воздействия и условий обмена в различных типах клеток и тканях организма. NO представляет собой нейтральный радикал с неспаренным электроном на 2p-π орбитали. Он имеет наиболее высокий по сравнению с другими молекулами организма коэффициент диффузии (даже больше, чем у O₂ и CO) и беспрепятственно проникает через клеточные мембраны [1].

Несмотря на радикальные свойства NO слабо реагирует непосредственно с тиолами и ами-

нами, но легко вступает в реакции с железом, O₂ и особенно с супероксидом (O₂⁻). Эта реактогенность ограничивает время его жизни (~ 10 с) и радиус действия в тканях, не превышающий согласно расчетам 500 мкм. Тем не менее такой протяженности распространения достаточно, чтобы NO мог принимать самостоятельное участие в коммуникации как внутриклеточной, так и между соседними клетками [1,2]. Более поздние данные показали, что биологическое время полужизни NO в паренхимных (экстравакулярных) тканях изменяется в пределах 0,09 – 2 с, в зависимости от концентрации O₂. NO влияет на уровень O₂ в тканях через угнетение клеточного дыхания и тем самым контролирует время собственной полужизни [3].

Условно характер влияния NO на различные биохимические и физиологические процессы разделяют на прямое и непрямое. Прямое влияние осуществляется при непосредственном взаимодействии NO с биомолекулами. Основной ми-

шению при этом служит гемовое железо гемоглобина, миоглобина, гуанилатциклазы, цитохрома P-450, NO-синтаз (NOS) и других гемсодержащих белков. NO взаимодействует также с негемовым железом, входящим в состав железосерных белков и нуклеиновых кислот, и свободным железом (Fe^{3+}). Оксид азота ингибирует опосредуемые Fe^{3+} оксидативные реакции и тем самым проявляет антиоксидантное действие. Кроме того, NO тормозит процессы ПОЛ, препятствуя, очевидно, их распространению. Мишенями прямого действия NO являются Cu и Zn, входящие в состав ферментов, и высокоэнергетические свободные радикалы (радикалы с углеродным центром, липидные, диоксида азота). Прямые эффекты NO доминируют в организме при физиологических условиях, когда эта молекула синтезируется, преимущественно конститутивными формами NOS в низких количествах. При этом концентрация NO в тканях составляет 0,1–1 мкМ, в то время как O_2^- в силу высокой супероксиддисмутазной активности – меньше на три порядка. Благодаря прямому действию NO осуществляются главным образом его регуляторные и сигнальные функции.

Непрямое действие оксида азота опосредуется через его реактивные формы (RNOS), являющиеся продуктом реакции NO с O_2 , O_2^- или H_2O_2 . В образовании RNOS могут принимать участие также и переходные металлы. Непрямое влияние NO проявляется при увеличении его синтеза, связанного с индукцией NOS II, которая наблюдается при воспалительных процессах различной этиологии (при активировании фагоцитарных клеток концентрация NO возле них может достигать 10 мкМ), и сочетается с усилением образования реактивных форм кислорода (ROS) [4]. Непрямое действие NO реализуется через S-, N- и O-нитрозирование, при котором катион нитрозония (NO^+) присоединяется к аминам, тиолам или гидроксильным группам ароматических соединений, через нитрование, осуществляемое путем присоединения нитро группы (NO_2) к биомолекулам (наиболее чувствительны к нитрованию ароматические кольца, в частности тирозина), а также через окисление или гидроксилирование биомолекул. Вследствие указанных реакций происходят посттрансляционные модификации белков, которые играют существенную роль в патогенезе острых и хронических заболеваний. Соотношение между перечисленными типами модификаций биосубстратов и их выраженность зависят от условий метаболизма, прежде всего окислительно-восстановительного потенциала, pH и баланса между образованием NO и ROS в клеточных компартментах. Эти ус-

ловия обозначаются как состояние нитрозативного и оксидативного стресса. Основными реактивными формами оксида азота, которые при их избыточном синтезе *in vivo* приводят организм в состояние нитрозативного и оксидативного стресса, являются соответственно диазоттриоксид (N_2O_3) и пероксинитрит ($ONOO^-$). Но между указанными состояниями нет четких границ, так как N_2O_3 , легко вступая в реакции S- и N-нитрозирования, способен при определенных условиях участвовать в окислительных реакциях, а $ONOO^-$ как сильный окислитель может осуществлять нитрование и нитрозирование биомолекул. Прямое и непрямое действие NO в клеточных компартментах происходит одновременно, но выражено неодинаково из-за различий в синтезе NO и O_2^- , а также потому, что O_2^- в силу наличия заряда плохо диффундирует сквозь мембраны [5–9].

Взаимодействие NO с железом. Способность NO непосредственно взаимодействовать с железом обуславливает его многие физиологические и токсические эффекты. NO обратимо связывается с гемовым железом гуанилатциклазы, циклооксигеназы, каталазы, липоксигеназы, NOS-аз, цитохрома P-450 и пероксидазы, цитохромов электрон-транспортной цепи митохондрий, а также с гемовым железом оксигемоглобина [10]. В этом ряду ферментов исключительно важная роль принадлежит гуанилатциклазе. Вследствие связывания NO с Fe^{2+} (ферро-ионом) порфиринового кольца гуанилатциклазы активность фермента увеличивается в сотни раз [11]. Синтезирующийся при этом cGMP через соответствующие протеинкиназные реакции участвует в регуляции тонуса сосудов; реакциях иммунитета; нейромедиации; угнетении агрегации тромбоцитов и опосредовании их взаимодействия с эндотелиальными клетками; контроле функции различных типов мышц, поджелудочной железы, остеокластов; в развитии болевого эффекта, эрекции и др. Показана возможность вовлечения cGMP-зависимого пути в цитопротекторное действие NO. Но при септических состояниях, травмах, ожогах и кровопотерях именно с индуцированной высокими концентрациями NO гуанилатциклазой и фосфорилированием сократительных белков в гладкомышечных волокнах стенок сосудов связывают развитие вазоплегии, гипотензии и шока. Все другие гемсодержащие ферменты, в отличие от гуанилатциклазы, при взаимодействии с NO ингибируются независимо от валентности гемового железа в их активном центре. Так, например, каталаза, содержащая в геме Fe^{3+} (ферри-ион), также ингибируется NO [12]. Угнетение активности гемовых ферментов может привести к снижению дыхательной функ-

ции митохондрий, биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных субстратов (стероидов, ненасыщенных жирных кислот, в частности арахидоновой кислоты и простагландинов), а также синтеза NO [13]. Показано, что гиперпродукция NO в гепатоцитах приводит к снижению содержания каталазы и цитохрома P-450 вследствие обратимой диссоциации гема от апофермента [14]. Кроме того, оксид азота угнетает активность феррохелатазы, участвующей в синтезе гема, очевидно через разрушение ее негемового железосерного центра. Эти данные, возможно, объясняют причину повышения чувствительности к лекарствам у больных с септическими и воспалительными состояниями. В реакции с оксигемоглобином NO окисляется в нитрат и образует метгемоглобин, что нарушает кислородтранспортную функцию крови и приводит к гемической гипоксии.

NO в условиях гиперпродукции может непосредственно связываться в тканях организма с негемовым железом и парными тиоловыми группами низкомолекулярных лигандов, пептидов и белков, образуя динитрозильный комплекс негемового железа (DNIC). Он является парамагнитным и в замороженном состоянии на спектре ЭПР дает сигнал с характерной триплетной структурой ($g_{cp} = 2,03$), величина которого прямо зависит от уровня NO в тканях [15]. С искусственным низкомолекулярным лигандом — диэтилдитиокарбаматом (DETC) — может образовываться моонитрозильный комплекс железа. В. Я. Варичем с коллегами впервые было доказано образование NO *in vivo* [1, 6] при введении его в организм.

Эндогенное образование DNIC становится возможным из-за присутствия в цитозоле клеток так называемого свободного фонда железа (СФЖ). Это железо, очевидно, из-за высоких концентраций аскорбиновой кислоты, глутатиона и других восстановителей, находится в виде ферро-иона слабо связанного с различными низкомолекулярными органическими хелаторами (цитратом, изоцитратом, пируватом, фосфатом, АТФ, АДФ), а также SH-группами белков, липидами мембран и свободным гемом. Известны и другие названия СФЖ: внутриклеточный фонд транзитного железа, редокс-активное, обмениваемое или метаболически и каталитически активное железо, которые хорошо отражают его состояние и функцию. СФЖ восполняется за счет эндоцита Fe³⁺-трансферрина (Fe³⁺-Tf) в эндосомы клеток. Доставка Fe³⁺-Tf из внеклеточной среды к эндосомам осуществляется с помощью трансферринового рецептора. В эндосомах с помощью протонной помпы (тип V АТФ-азы) поддержива-

ется кислая среда, в которой происходит высвобождение железа и апотрансферрина. Далее две молекулы железа переносятся из эндосом в цитозоль транспортером двухвалентных металлов — DMT1, а апотрансферринрецепторный комплекс возвращается обратно на клеточную поверхность. Из цитозоля железо транспортируется в митохондрии для синтеза гема, включается в соответствующие негемовые ферменты, например рибонуклеотидредуктазу, необходимую для синтеза DNA, а также, после окисления в ферри-ион, включается в ферритин для внутриклеточного сохранения в безопасном виде. Значительное количество хелатированного и редоксактивного железа определяется в лизосомах, где происходит разрушение металлопротеинов. СФЖ обнаруживают и в ядрах, где его концентрация составляет 0,2–3,0% от его клеточного фонда и поддерживается на нетоксичном уровне (3–10 мкМ) с помощью специальных механизмов. При оксидативном стрессе фонд свободного железа значительно возрастает вследствие высвобождения его в виде Fe³⁺ из белков (железосерных кластеров ферментов, трансферрина, ферритина, гемовых белков) в результате окисления O₂⁻ [17]. Токсичные свойства свободного железа связаны с его способностью катализировать реакцию Хабера–Вейса (Fe³⁺ + O₂⁻ → Fe²⁺ + O₂, Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + HO· + HO·; ее суммарный вид: O₂⁻ + H₂O₂ → O₂ + HO· + HO·), в результате которой образуется гидроксильный радикал, способный окислять белки, разрушать липиды клеточных мембран и ДНК [18, 19]. Имеются доказательства [20] того, что NO, ингибируя эту реакцию, проявляет антиоксидантные свойства.

Регуляция СФЖ осуществляется на посттрансляционном уровне с помощью железорегулирующих белков (IRP1 и IRP2), которые взаимодействуя с определенными участками мРНК контролируют синтез Tf-рецептора 1 и ферритина. Кроме того, IRP1 и IRP2 через соответствующие мРНК влияют на синтез некоторых ферментов, содержащих негемовое железо. Интересно, что IRP1 является апоферментом цитоплазматической аконитазы. Увеличение поступления железа в клетки способствует присоединению к апоферменту железосерного кластера ([4Fe-4S]), вследствие чего апофермент приобретает свойства аконитазы и превращает цитрат в изоцитрат. Присоединение [4Fe-4S]-кластера к апоферменту обратимо и может регулироваться посредством его фосфорилирования [21–26].

Свободное железо при усилении эндогенного синтеза и поступления из экзогенных источников NO легко образует DNIC с цистеином и

глутатионом [27,28]. Эти низкомолекулярные DNIC (нмDNIC) являются более стабильными образованиями, чем NO. Если время существования оксида азота в биологической среде исчисляется секундами, главным образом из-за его быстрого взаимодействия с супероксидом, то нмDNIC устойчивы в течение минут [29]. Поэтому они могут перемещаться между внутриклеточными компартментами и клетками, осуществляя паракринную функцию как доноры NO и не только. По сравнению с NO и низкомолекулярными S-нитрозотиолами они являются более сильными нитрозирующими агентами и эффективнее взаимодействуют с белками. Мишенями атаки нмDNIC могут быть свободные SH-группы белков, гистидин, аспарат и глутамин. При этом в белках могут образовываться DNIC, S-нитрозотиолы и N-нитрозотиолы. Одной из мишеней воздействия нмDNIC является обширная группа белков, содержащих негемовое железо в виде железосерных кластеров. К ним относятся митохондриальные белки электрон-транспортной цепи (комплекс I – NADH-убихинон оксидоредуктаза и комплекс II – сукцинат-убихинон оксидоредуктаза) и цис-аконитаза, а также ферменты ксантиноксидаза и альдегидоксидаза, глутаматсинтаза, дигидрооротатдегидрогеназа и др. [30, 31].

Недавно было показано, что при взаимодействии нмDNIC с адренодоксином (белком монооксигеназной системы), в структуру которого входит бинуклеарный железосерный (Fe_2S_2) центр (ISC), происходит деградация этого центра и образование динитрозильного комплекса железа, связанного с SH-группами этого белка. При этом из железосерного центра высвобождается Fe^{2+} , что, в свою очередь, способствует образованию нмDNIC и дальнейшей деградации адренодоксина. Формирование DNIC в адренодоксине с одновременным разрушением этого центра происходит также при воздействии на белок NO в присутствии Fe^{2+} , но сам оксид азота не эффективен. Возможно, что данный механизм распространяется и на другие интегрированные в структуры или находящиеся в цитозоле белки, содержащие железосерные кластеры [18]. Следует отметить, что на железосерные кластеры некоторых ферментов NO может действовать непосредственно и даже более эффективно, чем нмDNIC. Предполагаемая физиологическая роль связанных с белками динитрозильных комплексов негемового железа состоит в том, что они создают в организме запас оксида азота, который используется для S-нитрозирирования через промежуточное образование нмDNIC. В отличие от нмDNIC белковые динитрозильные комплексы

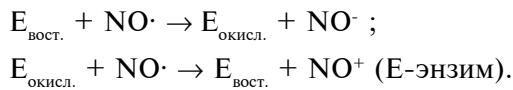
железа стабильны в течение нескольких часов [32]. На примере глутатионредуктазы показано, что S-нитрозирирование является только промежуточным этапом взаимодействия фермента с нмDNIC, заканчивающимся N-нитрозирированием гистидинового остатка и ингибированием ферментативной активности [33].

В организме образование динитрозильных комплексов железа способствует депонированию, транспортировке на значительные расстояния и транзитрозирированию NO, что снижает возможность его локального токсического воздействия на функцию и жизнеспособность клеток. При этом DNIC конкурентно препятствуют реакции NO с ROS, в результате которой образуются весьма токсичные RNOS. Но интоксикация, возникающая при чрезмерном синтезе оксида азота или воздействии на организм его экзогенных доноров, во многом определяется высоким сродством NO к свободному и связанному с белками негемовому железу. Она сопровождается ингибированием ферментов электрон-транспортной цепи митохондрий [31], глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы [34,35], рибонуклеотидредуктазы [36], ксантиноксидазы [37] и других металлоэнзимов. Низкомолекулярные DNIC вызывают необратимую активацию неселективных катионных каналов в клеточной мембране, усиливают высвобождение норадреналина из стенки артерии и участвуют в механизме вазодилатации, что также во многом определяет токсичность NO [29,38,39].

Формы оксидов азота. В организме NO может преобразовываться в другие формы оксидов азота, определяющие особенности его биологического действия [40]. В зависимости от локального восстановительного потенциала в клетках и тканях NO существует в трех взаимосвязанных редокс-формах: оксид азотного радикала ($NO\cdot$), нитрозониевого катиона (NO^+) и нитроксильного аниона (NO^-). Эти формы обладают различной реактивностью и существенно разнообразят регуляторные и токсичные свойства NO [2].

NO^+ образуется из $NO\cdot$ в результате окисления O_2 и Fe^{3+} и является настолько мощным нитрозирующим агентом, что его содержание *in vivo* определить не представляется возможным. Основной формой, равнозначной NO^+ , и его фактическим носителем в организме являются S- и N-нитрозосоединения. При этом мишенями действия NO^+ являются нуклеофильные группы активных тиолов, аминов, карбоксиллов, гидроксильных и ароматических колец. Особенно легко подвергаются нитрозирированию сульфгидрильные центры протеинов. Этот процесс образования S-нитрозосоединений обратим и является важ-

ным звеном механизма регуляции сигнальной трансдукции [41–43]. Содержание в клетках и тканях S-нитрозосоединений обычно рассматривается как биомаркер интенсивности синтеза NO^+ . Источниками NO^+ в организме служит N_2O_3 , который разрушается с высвобождением NO^+ и нитрита [40], реакции окисления NO^\cdot с помощью Fe^{3+} -содержащих металлопротеинов (в частности каталазы) и образования динитрозильных комплексов железа или пероксинитрита. Показано [44], что в результате реакции NO^\cdot с супероксиддисмутазами (SOD), содержащими Mn или Fe, но не Cu-Zn-SOD, образуются оба иона оксида азота согласно следующей схеме реакций:



Анион нитроксила (NO^-) или его кислота HNO является восстановленной и более стабильной формой NO^\cdot . Анион нитроксила может образовываться в процессе окисления L-аргинина NO -синтазой в условиях дефицита тетрагидробиоптерина, при деградации ONOO^- и S-нитрозотиолов [43,45–47]. Последние вступают в реакцию с другими тиолами, которые не подвергались нитрозированию, с образованием соответствующих дисульфидов и NO^- . Взаимодействие NO^+ с оставшимися S-нитрозотиолами и тиолами может приводить к образованию NO^\cdot , сульфинамина и гидроксилamina [48]. NO^- может восстанавливаться в NO^\cdot с помощью цитохрома c, убихинона и, как упоминалось выше, Mn или Fe супероксиддисмутаза. Предполагают [49], что эти формы фермента участвуют в пролонгации вазорелаксирующего действия NO^\cdot через восстановление его в более стабильный NO^- .

Являясь сильным восстановителем NO^- , а также его протонированная форма HNO могут инициировать реакции окисления. NO^- имеет высокую и избирательную реактогенность по отношению к аминам и тиолам, но не взаимодействует с кислородсодержащими электрофилами. Он образует комплекс с Fe(III)-гемом и реагирует с цистеином легче, чем NO^\cdot . Прооксидантное действие NO^- значительно усиливается при ацидозе – состоянии, характерном при таких болезнях, как сепсис, артриты, ишемии и рак [50]. Цитотоксическое действие NO^- сильнее, чем NO и RNOS; оно соразмерно с алкилгидропероксидами. Используя соль Ангели (СА) – $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ – в качестве донора NO^- , было показано, что этот анион обладает характерным биологическим действием. Так, данная соль, в отличие от доноров NO , оказывает позитивное инотропное и лузитропное действие на миокард увеличивает в нем синтез пептида, контролиру-

ющего функцию кальцитонинового гена (CGRP); усиливает миграцию нейтрофилов. Эти эффекты не связаны с образованием пероксинитрита и изменением внутриклеточного содержания cGMP [51]. Вместе с тем СА в соответствующих концентрациях непосредственно окисляет восстановленный глутатион (GSH), снижая его внутриклеточное содержание.

На экспериментальной модели инфаркта показано, что введение животным СА значительно интенсифицирует развитие патологического процесса в отличие от доноров NO , оказывающих протекторное действие. СА через угнетение функции нейронных каналов оказывает нейротоксическое действие [45,52,53]. Отождествление биологического действия СА с NO при трактовке полученных результатов, на наш взгляд, не совсем оправдано, так как СА спонтанно расщепляется с образованием не только HNO , но и аниона нитрита (NO_2^-), действие которого не учитывалось. В организме теплокровных обмен NO неразрывно связан с обменом анионов нитрита и нитрата. Согласно некоторым данным [54,55], они образуются в процессе NO -синтазных реакций и взаимопревращений RNOS.

Вместе с тем в организме теплокровных существует мощная нитрат(нитрит)-редуцирующая система, способная восстанавливать нитраты и нитриты в NO , что указывает на наличие в нем цикла оксида азота [56]. Показано [57,58], что ксантиноксидоредуктаза, которая имеет структурное сходство с бактериальными нитрат/нитрит-редуктазами, способна восстанавливать нитраты и нитриты в NO . Нами в опытах *in vitro* установлено, что тимоциты крыс имеют нитратредуктазную активность, которая активируется гипоксантином, угнетается аллопуринолом и, следовательно, присуща ксантиноксидазе. В процессе гибели тимоцитов нитратредуктазная активность ксантиноксидазы существенно возрастает. Ее наличие в тимоцитах, очевидно, обуславливает цитотоксическое действие нитрата путем восстановления его в нитрит. Влияние же нитрита на клетки в значительной мере является самостоятельным и не зависит от дальнейшего, как принято считать, восстановления в NO . Это подтверждается синергическим характером комбинированного действия на тимоциты нитропруссид натрия, (донора NO) и нитрита натрия. Используя тимоциты, которым была введена ловушка для NO – комплекс диэтилдитиокарбамата с Fe^{2+} , нам удалось получить и прямые доказательства самостоятельного цитотоксического влияния нитрита, несколько уступающего NO , но на порядок превышающего действие нитрата. Так, нитропруссид натрия не проявлял, а нитрит натрия почти

полностью сохранял цитотоксическое действие на тимоциты, содержащие указанную ловушку для NO [59].

Форма, в которой NO высвобождается из клеток и осуществляет физиологические функции, активно дискутируется. Например, на роль эндотелийрелаксирующего фактора (EDRF) “выдвигаются” помимо NO его редокс-формы (NO^+ и NO^-), низкомолекулярные динитрозильные комплексы негемового железа и S-нитрозосоединения. В процессе NO-синтазных реакций в небольших количествах образуются нитрит, нитрат, гидроксиламин и N_2O , которые также могут расширить биологическое действие NO [60,61]. Выявление в процессе образования NO-синтазной реакции гидроксиламина и N_2O трактуется [60] как аргумент в пользу того, что ее первичным продуктом является анион нитроксила, восстановление которого в NO происходит при участии супероксиддисмутазы (SOD): $\text{Cu(II)SOD} + \text{NO}^- \rightleftharpoons \text{Cu(I)SOD} + \text{NO}^\cdot$. Показано, что редуктазный и оксигеназный домены NOS нейронов могут образовывать супероксид, и этот процесс регулируется субстратами и ингибиторами, а также кальмодулином [60]. Поэтому нельзя исключить возможность образования при NO-синтазных реакциях и пероксинитрита. Но более поздние исследования, проведенные на очищенной из нервной ткани NOS в присутствии ловушки NO (Fe^{2+} -N-метил-D-глутаминдителикарбамата), показали, что в процессе NO-синтазной реакции образуется NO, а не NO^- , причем без участия супероксиддисмутазы [61].

Пероксинитрит (ONOO^-) и радикал диоксида азота ($\cdot\text{NO}_2$). Наиболее токсичным соединением среди реактивных форм оксидов азота является пероксинитрит (ПН). К счастью, природа позаботилась о том, чтобы его разрушительное действие сводилось к минимуму, и чтобы в физиологических условиях проявлялось его регуляторное и цитопротекторное действие. ПН неизбежно образуется в клетках и тканях всюду, где одновременно встречаются NO и супероксид (O_2^-), что обусловлено очень высокой скоростью их взаимодействия: около $2 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [62]. Высокое сродство NO к O_2^- ограничивает его прямое действие и определяет разнообразные токсические проявления, опосредованные образованием RNOS. Особенно благоприятные условия для синтеза ПН создаются в клеточных компартментах с высокой активностью NOS и таких ферментов, ответственных за образование O_2^- , как ксантиноксидаза, NAD(P)H-оксидоредуктаза, циклооксигеназа, липоксигеназа и цитохром P-450, а также в процессе функционирования электрон-транспортной цепи митохондрий и ауто-

окисления некоторых метаболитов. Мощным источником O_2^- являются активированные макрофаги и нейтрофилы.

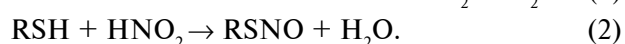
К основным составляющим системы антиоксидантной защиты относятся SOD, в частности ее митохондриальная и цитоплазматическая изоформы (Mn-SOD и Cu-Zn-SOD), каталаза, глутатион и мочева кислота. В норме в клетках и тканях организма концентрации SOD на два порядка превышают концентрации NO. Это создает препятствие для образования ПН, несмотря на то, что возможность контакта O_2^- с ферментом меньше, чем с NO из-за ограниченности его диффузии между клеточными компартментами, а указанная скорость синтеза ПН значительно выше, чем скорость устранения O_2^- в супероксиддисмутазной реакции ($2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$). Интересно, что SOD в присутствии высоких концентраций H_2O_2 и NO может образовывать ПН. Последний также способен ингибировать Cu-Zn-SOD и Mn-SOD через нитрование ее 34-го тирозинового остатка [63,64]. При физиологических условиях антиоксидантная система справляется с устранением подавляющего количества синтезируемого O_2^- . Только небольшая часть NO расходуется на синтез RNOS, а остальная локально, в пределах диффузии, вступает в прямое взаимодействие с теми или иными биологическими мишенями [7,65,66]. ПН может восстанавливаться в NO с помощью нитритредуктаз (митохондриальной и локализуемой в эндоплазматическом ретикулуме изоформ). В этом процессе участвуют NADH или NADPH и флавопротеины. В результате нитритредуктазных реакций не только снижается концентрация токсичного RNOS, но и удлиняется так называемое время жизни NO [67].

ПН является довольно стабильным соединением (его кристаллы могут храниться годами без существенного разложения), способен диффундировать на значительные расстояния в клетках и преодолевать клеточные мембраны. Однако, имея pK_a 6,6–6,9, ПН в водной среде при закислении протонируется и быстро разрушается ($k = 0,17 \text{ c}$ и $1,1 \text{ c}$ при pH 7,4 и 5,4; 25°C) с образованием около 70% аниона нитрата и 30% радикалов (гидроксильного и диоксида азота), которые во многом и обуславливают его окислительные и нитрующие свойства: $\text{O}_2^- + \cdot\text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HOONO} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+ + \text{OH}^\cdot + \cdot\text{NO}_2$ [68]. Поэтому токсические эффекты ПН особенно выражены в организме в условиях ацидоза, в ишемических тканях, а также фагосомах активированных фагоцитарных клеток. Токсическое действие ПН зависит от концентрации. При низких концентрациях проявляется его регуляторные и протекторные свойства в отноше-

нии функции ферментных систем и выживаемости клеток, а также установлено его участие в процессах сигнальной трансдукции. Поэтому образование ПН может отчасти нейтрализовать прямое токсическое действие $\cdot\text{NO}$ или O_2^- [17,69].

Окислительные и нитрирующие свойства ПН в организме распространяются на многие биомолекулы, включая различные низкомолекулярные метаболиты, белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Основными мишенями его действия являются тиолы, CO_2 и металлопротеины.

В реакции ПН с тиолами при физиологическом значении pH в клетках и тканях образуется около 1–2% S-нитрозотиолов (RSNO). Их выход увеличивается в присутствии аскорбиновой кислоты. В основе реакции лежит прямой нуклеофильный нитрозирующий механизм с высвобождением HOO^- : $\text{RS}^- + \text{ONOON}^- \rightarrow \text{RSNO} + \text{HOO}^-$. В клетках возможно также локальное образование RSNO в местах с кислым pH и высокими концентрациями тиолов, в частности глутатиона и цистеина. В этих условиях реакция протонированного ПН с тиолами приводит к их окислению в дисульфиды и образованию азотистой кислоты, которая нитрозирует часть тиолов:



С образованием S-нитрозотиолов в значительной мере связывают регуляторное и цитопротекторное действие низких концентраций ПН азота [70, 71].

Двуокись углерода успешно конкурирует за ПН с тиолами и металлопротеинами при физиологических условиях, когда его протонирование и разрушение происходит очень медленно. Это обусловлено высокой концентрацией CO_2 в тканях и константой скорости ее реакции с ПН ($k \sim 5,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$), существенно не зависящей от pH. Вследствие взаимодействия CO_2 и ПН образуется нитрозопероксикарбонатный анион (ONOOCO^-) [72], который в отношении ряда белков является более мощным нитрирующим агентом, чем ПН, но будучи короткоживущим интермедиатом быстро распадается с образованием 65% аниона нитрата, а также 35% весьма реактивных радикалов диоксида азота ($\cdot\text{NO}_2$) и карбонатного аниона ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) [73–75]. $\cdot\text{NO}_2$ может также образовываться в реакции NO с молекулярным кислородом при их высоких концентрациях в гидрофобном окружении (в мембранах и белках), способствующем высокой растворимости исходных реагентов. Но эта реакция аутоокисления NO, очевидно, вносит небольшой вклад в синтез $\cdot\text{NO}_2$, поскольку в дальнейшем

приводит к образованию N_2O_3 — молекулы наиболее ответственной за процессы образования S- и N-нитрозосоединений [76,77]. In vivo, видимо, более выражен путь образования $\cdot\text{NO}_2$ из нитрит-аниона вследствие одноэлектронного окисления с участием железа, находящегося в тех или иных комплексах в виде оксоформы (Fe^{4+}). Образование $\cdot\text{NO}_2$ происходит при воспалительных процессах с участием лейкоцитарных гемпероксидаз (миэлопероксидазы, эозинофильной пероксидазы), а также H_2O_2 и $\cdot\text{OH}$. Источником нитрита в организме помимо алиментарного фактора может быть NO, который окисляется оксидом метгемоглобином и ПН [17,78–80].

Являясь окисленными радикалами, $\cdot\text{NO}_2$ и $\text{CO}_3^{\cdot-}$ не образуют супероксидный анион в реакции с кислородом. Отсутствие заряда позволяет $\cdot\text{NO}_2$ вступать в реакции пероксидации и нитрирования липидов, а также окисления аминокислот, преимущественно цистеина, триптофана и особенно тирозина в гидрофобном окружении клеточных мембран и белковых доменов. Наличие заряда в $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ограничивает его действие в водной среде, где этот анионный радикал легко окисляет глутатион, аминокислотные остатки белков и гуаниновое основание нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Одновременное образование $\cdot\text{NO}_2$ и $\text{CO}_3^{\cdot-}$ создает условие для их комбинированного, воздействия на мишени через нитрирование и окисление, вследствие которого возможно синергическое усиление их повреждающего действия [73,82,83].

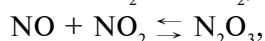
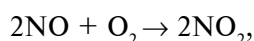
Важным звеном в реализации токсического действия ПН в организме является нитрирование тирозина (свободного и в составе белков) с образованием 3-нитротирозина. Существует высокая корреляция между интенсивностью образования ПН и 3-нитротирозина. С учетом того, что ПН in vivo не обнаруживается, уровень 3-нитротирозина, определяемый с помощью аналитических и иммунохимических методов в клетках и тканях организма, рассматривают как биомаркер, отражающий интенсивность образования ПН. Но это не совсем корректно, поскольку образование свободного и связанного с белками нитротирозина скорее всего отражает действие и других RNOS [82]. Возрастание уровня 3-нитротирозина наблюдается при хронических воспалениях, атеросклерозе, нейродегенеративных процессах, сердечно-сосудистых и острых легочных поражениях, цитотоксическом действии ксенобиотиков [83–85].

Вызванное ПН нитрирование тирозина с участием гемпероксидаз происходит благодаря образованию радикалов $\cdot\text{NO}_2$ и тирозина. Образование радикалов тирозина ускоряется $\text{CO}_3^{\cdot-}$ и

металлами, находящимися в комплексах в виде оксоформы, и в меньшей мере $\bullet\text{OH}$. Нитрирование тирозина помимо этого свободнорадикального пути может осуществляться посредством электрофильного механизма с участием переходных металлов [17]. Характерным примером может служить цитоплазматическая Cu- и Zn-зависимая супероксиддисмутаза (SOD1). Интересно, что у 25% больных, страдающих семейным боковым амиотрофическим склерозом (СБАС), обнаруживается мутация гена SOD1, кодирующего Cu- и Zn-SOD, с возникновением которой связывают развитие указанной патологии. Отсутствие корреляции между дисмутазной активностью и частотой возникновения или тяжестью болезни, установленной в экспериментах на трансгенных мышцах и при использовании трансдукции мутантных генов SOD1 в клетки, указывает на то, что мутированная форма SOD1 приобретает новые, не выраженные в норме функции. Обнаруженное повышенное содержание нитротирозина в белках двигательных нейронов больных СБАС дает основание предположить, что в связи с мутацией в активном центре SOD1 Cu^{2+} восстанавливается в Cu^+ . В связи с этим фермент приобретает способность реагировать с ONOO^- , вследствие чего образуются ионы нитрония (NO_2^+), которые через нитрирование белков инициируют нейродегенеративные процессы.

Согласно другой гипотезе восстановление Cu^{2+} в Cu^+ в мутантной SOD1, обусловленное снижением сродства к Zn^{2+} , позволяет ферменту осуществлять обратный катализ, в котором из кислорода синтезируется $\text{O}_2^{\cdot-}$. В реакции с NO последний образует ПН, индуцирующий нитрирование тирозина. Однако все больше экспериментальных доказательств получает гипотеза, по которой мутированная SOD проявляет пероксидазные свойства и катализирует превращение H_2O_2 в $\bullet\text{OH}$, повреждающий нейроны у больных СБАС [86–90]. ПН через нитрирование способен снижать активность Cu-, Zn- и Mn-SOD. Мишенью нитрирования Mn-SOD служит тирозинный остаток 34 [91,92].

N_2O_3 , процессы N- и S-нитрозирирования. N_2O_3 образуется в организме в результате аутооксидации NO в присутствии молекулярного кислорода ($k \approx 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$):



Благодаря своей гидрофобности NO и O_2 могут накапливаться в липидном слое мембран или внутри белков в очень высоких концентрациях, способных ускорить эту реакцию в тысячи

раз. N_2O_3 являясь источником катиона нитрозония (как показано выше), обладает сильной способностью к нитрозирированию. Подчас используется термин “нитрозирирование” в более широком значении, чем “нитрозирирование”: для обозначения различных типов взаимодействия NO с переходными металлами, кислородом и радикалами.

Взаимодействуя с первичными и вторичными алифатическими и ароматическими аминами N_2O_3 легко образует N-нитрозоамины. Они представляют канцерогенную и мутагенную опасность, так как в результате биотрансформации цитохромом P-450 деметилируются с образованием иона диазония и формальдегида, которые могут алкилировать ДНК, взаимодействуя с азотом, гидроксильными или карбонильными группами оснований и фосфатными группами. Кроме того, эти интермедиаты N-нитрозоаминов могут осуществлять нитрозативное дезаминирование пуринов и пиримидинов. Алкилирование и дезаминирование ДНК вызывает в ней одно- и двуцепочечные разрывы, что приводит к возникновению переходных и перекрестных мутаций. Ситуация осложняется еще и тем, что функция некоторых белков, осуществляющих репарацию дезоксирибонуклеиновой кислоты, например O^6 -метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы, угнетается N_2O_3 [7,93,94]. N-нитрозоамины также подвергаются денитрозирированию цитохромом P-450. Нами в опытах *in vitro* на перитонеальных макрофагах, которые включали в себя ловушку NO, показано, что цитотоксическое действие N-нитрозоамина ни в коей мере не связано с его денитрозирированием [95].

N_2O_3 с SH-группами цистеина и цистеиновых остатков образует тионитритные эфиры – S-нитрозотиолы (RSNO), тогда как при взаимодействии тиолов непосредственно с NO происходит их окисление в дисульфидную форму [43]. Помимо цистеина основными представителями низкомолекулярных S-нитрозотиолов (nmRSNO) в организме являются S-нитрозоглутатион (GSNO) и S-нитрозогомоцистеин (HcySNO) [96]. Внутриклеточные концентрации глутатиона (ммольные) намного выше, чем у других низкомолекулярных SH-содержащих лигандов, и поэтому он является преимущественной мишенью для S-нитрозирирования. Значительно большая по сравнению с S-нитрозоцистеином (CysSNO) и HcySNO стабильность GSNO обеспечивает ему основную роль в депонировании NO и его транспортировке к сенсорным мишеням. Направленность физиологических эффектов nmRSNO и NO в отношении тонуса сосудов, нейромедиации, агрегации тромбоцитов, иммуномодуляции

и др. во многом сходна и связана со способностью нмRSNO высвобождать NO. Но биоактивность нмRSNO имеет и существенные особенности, что определяются их стабильностью и другими свойствами, обусловленными функциональной группой -S-N=O. Так, показана возможность участия CysSNO, но не NO, в передаче сигналов между кардиоваскулярными нейронами в ядре отдельного тракта (NTS) через связывание с соответствующими рецепторами [97,98]. GSNO и S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин ингибируют вызванный ростовым фактором синтез ДНК в гладкомышечных волокнах матки через механизмы, которые не связаны с их NO-донорными свойствами. Но антипролиферативное действие этих нмRSNO на гладкомышечные волокна сосудов сопряжено с активацией гуанилатциклазы. Это указывает на зависимость механизмов действия нмRSNO от тканеспецифичных условий [99].

Механизм транспорта нмRSNO в клетки во многом еще не выяснен. Согласно некоторым предположениям в нем участвуют эктоферменты клеточной мембраны, в частности дисульфидизомераза белков и γ -глутамилтранспептидаза. Первая осуществляет денитрозирование нмRSNO, что приводит к накоплению в гидрофобной части мембраны NO и последующему его окислению в N_2O_3 , который затем нитрозирует тиолы, находящиеся в цитозоле возле внутренней поверхности плазматической мембраны [100]. Вторая превращает внеклеточный GSNO в S-нитрозоцистеинилглицин. Высвобождаемый из него NO участвует в нитрозировании внутриклеточных тиолов как указано выше [101]. В работе [102] постулируется участие в транспорте GSNO через клеточную мембрану цистина. Он с помощью аминокислотного транспортера χ_c переносится в клетку, где восстанавливается в цистеин, который, высвободившись из клетки и реагируя с GSNO, образует CysNO. Последний через другую транспортирующую аминокислоты систему (L-AT) проникает в клетку, где участвует в транснаитрозировании глутатиона и других низко- и высокомолекулярных SH-содержащих мишеней. Это первое экспериментальное обоснование механизма переноса S-нитрозосоединений в клетки (а возможно и из них) без сопутствующего высвобождения NO. Способность различных типов клеток транспортировать нмRSNO неодинакова. Те из них, у которых она выражена слабо, могут, очевидно, более успешно противостоять нитрозативному стрессу, обусловленному индукцией NOS II в соответствующих клетках при воспалительных и других процессах.

Декомпозиция нмRSNO in vivo, осуществ-

ляемая различными механизмами при участии свободных тиолов, железа, аскорбиновой кислоты, кислорода и супероксида, приводит к образованию различных метаболитов, включая NO, N_2O , NO_2^- , NH_4^+ , NH_2OH , дисульфиды, сульфинамиды, сульфидные и сульфоновые кислоты. Перенос NO^+ от более стабильных S-нитрозотиолов (GSNO, S-нитрозопротеинов) к менее стабильным (S-нитрозоцистеину, S-нитрозоцистеинилглицину) облегчает дальнейшее высвобождение из них NO [103]. Высвобождение последнего из нмRSNO с образованием соответствующих дисульфидов может существенно ускоряться ионами Cu^+ , присутствие которых обеспечивается восстановлением Cu^{2+} анионами свободных тиолов (RS^-) [103,104]. Достаточно ли для этого имеющейся in vivo концентрации ионов меди, не ясно. Возможно, что взаимодействие нмRSNO в организме с ионами железа приводит к образованию динитрозильных комплексов, которые служат источником NO [105]. Тот факт, что фотохимическое и термическое воздействия на нмRSNO вызывают их расщепление на NO и дисульфиды открывает новые возможности в фото- или термохимиотерапии онкологических заболеваний. С этой целью нмRSNO вводят в организм в составе липосом или нетоксичных гелей, которые обеспечивают их доставку к местам локализации опухолевых клеток. Там под воздействием лазерного облучения или повышенной температуры происходит расщепление нмRSNO с высвобождением цитотоксичных концентраций оксида азота [106,107]. Декомпозиция S-нитрозотиолов ускоряется O_2^- и может закончиться образованием ПН [108].

Реакция S-транснаитрозирования. Перенос NO^+ от S-нитрозотиолов к другим эндогенным тиолам (S-транснаитрозирование) является основным механизмом, который позволяет вовлечь в нитрозирование различные содержащие тиолы молекулы (находящиеся в клетках, на их поверхности и во внеклеточном пространстве), что способствует метаболической коммуникации и разнообразит биологическое действие NO в организме. Реакция S-транснаитрозирования подобно реакциям фосфорилирования или ацетилирования осуществляет обратимую посттрансляционную модификацию белков [109]. При S-транснаитрозировании белков нуклеофильной атаке подвергаются реакционноспособные SH-группы цистеина, которые обеспечивают тесную связь цинка, железа и коферментов с белками; структура и функция ферментов, ионных каналов, G-белков, факторов транскрипции, а также работа механизмов транспорта электронов и формирование сигнальной трансдукции. Из многих реактогенных

SH-групп белков подвергаются S-транснаитрозированию только некоторые, локализирующиеся в участках с определенной первичной структурой вблизи NOS-аз и низкомолекулярных тиолов, при соответствующем редокс-состоянии клеток.

В кровяном русле реакции S-транснаитрозируются участвуют в регуляции тонуса и пролиферации клеток сосудов, скорости агрегации тромбоцитов и лейкоцитарной адгезии, а также в осуществлении паракринной и эндокринной функции NO. Последнюю связывают с образованием S-нитрозоальбумина (AlbSNO) и S-нитрозогемоглобина (HbSNO), которые могут переносить NO током крови на большие расстояния [110,111]. В гидрофобных участках альбумина имеются условия для мицелярного аутоокисления NO в N_2O_3 , который расходуется на S-нитрозирование собственных Cys-34- и Trp-214-остатков и низкомолекулярных тиолов плазмы крови. В образовании AlbSNO через S-транснаитрозирование могут участвовать CuSNO, GSNO, S-нитрозо- α -липовая кислота, HcuSNO и другие нмRSNO [112,113].

Сывороточный альбумин в присутствии низкомолекулярных тиолов значительно увеличивает гипотензивное и ингибирующее агрегацию тромбоцитов действие NO, что обуславливается образованием AlbSNO [114,115]. Оно возможно усиливается под влиянием аскорбата и церулоплазмина [116]. Данные, полученные на тромбоцитах и мегакариоцитах, свидетельствуют в пользу того, что физиологическая активность GSNO и AlbSNO опосредуется реакциями S-транснаитрозиования с тиолами, расположенными на поверхности плазматической мембраны [117].

Известно, что NO может реагировать с β -93-цистеином гемоглобина, образуя HbSNO. Стамлер и сотр. предположили, что HbSNO образуется в условиях высокого парциального давления O_2 в легких, отуда кровотоком доставляется к гипоксичным тканям, где высвобождает NO, способствуя тем самым расширению капилляров, а также доставке эритроцитов и O_2 во все участки ткани. Аргументом в пользу этой гипотезы считалось наличие высокой концентрации HbSNO в эритроцитах артериальной крови (2,5 мкМ) и значительного артериовенозного концентрационного градиента по этому показателю [118,119]. Однако в настоящее время роль S-нитрозиования альбумина и гемоглобина в обеспечении эндокринной функции NO при физиологических условиях подвергается серьезным сомнениям [120–122]. С помощью новых чувствительных методов определения S-нитрозотиолов, учитывающих

их высокую лабильность, показано крайне низкое содержание AlbSNO в плазме крови (около 5 нмоль/л), которое к тому же существенно не изменяется при ингаляционном введении в организм оксида азота. Причина такой низкой концентрации AlbSNO не ясна. Уровни HbSNO в эритроцитах не превышают 40 нмоль/л и имеют сходные величины в крови артерий и вен [122]. Низкое содержание HbSNO в эритроцитах объясняют тем, что возможность контакта гемоглобина с NO, синтезируемого эндотелиальными клетками, уменьшена на три и более порядков вследствие барьера, который создается эритроцитарной мембраной и обтекающим ее потоком плазмы. При проникновении в эритроциты NO может перехватываться гемовым железом и в зависимости от степени оксигенации гемоглобина либо окисляться в нитрат, либо связываться в железо-нитрозильном комплексе. С учетом вышеизложенного можно считать, что NO, синтезируемый эндотелиальной NOS, при физиологических условиях влияет на тонус сосудов главным образом в паракринной манере.

В условиях повышения уровня NO (ингаляции оксидов азота, введения доноров NO, активаторов NO-синтаз, индукции эндогенного синтеза NO при воспалительных и септических процессах и других патологиях) в крови помимо увеличения концентраций AlbSNO и HbSNO возрастает также уровень HbFe-NO, нмRSNO, N-нитрозоаминов, нитротирозина (в белках) и нитрита. При этом участие AlbSNO и HbSNO в осуществлении NO эндокринных функций так и не доказано, однако появились новые факты, указывающие на важность нитрита как формы депонирования и транспортировки NO в крови. Нитрит по сравнению с AlbSNO и HbSNO более стабильный, его концентрации в крови составляют 0,5–1,0 мкмоль/л, а в тканях они на порядок выше. Нитрит в присутствии дезоксигенированных эритроцитов восстанавливается в NO и вызывает релаксацию сосудов. Концентрации нитрита в организме так же, как и нитратредуктазная активность тканей (существенный вклад в нее вносят гемовые белки и ксантиноксидоредуктаза) и эритроцитов, значительно возрастают при гипоксии. В этих условиях роль нитрита в генерации NO, необходимого для улучшения кровоснабжения тканей, представляется исключительно важной [122].

Данные литературы свидетельствуют, что в организме находят все больше мишеней, подвергаемых S-нитрозированию. Среди них следует отметить кальциевые каналы, активаторы плазминогена и транскрипции, различные рецепторы, G-белки (включая H-ras) и ферменты: креа-

тинкиназы, ароматазы, алкилтрансферазы, глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы, протеазы, протеинкиназы, фосфатазы и др. [123–126].

Нитрозативный и оксидативный стресс в организме зачастую обнаруживается одновременно. При этом S-нитрозирование белков сочетается с их S-тиолированием — образованием дисульфидных связей между SH-группами цистеиновых остатков белков и SH-группами CysSH или GSH. В условиях оксидативного стресса основными субстратами S-тиолирования белков служат их окисленные интермедиаты (белок-S· и белок-SOH), а также CysSH и GSH. Истощение клеточного фонда GSH приводит к окислению белков и их необратимому повреждению. GSNO и его окисленные производные при добавлении к клеткам могут S-тиолировать белки и образовывать низкомолекулярные дисульфиды. Наибольшую реактогенность при этом проявляет глутатиондисульфид-S-оксид (GS(O)SG). Под влиянием GSNO некоторые белки в той или иной мере подвергаются как S-нитрозированию, так и S-тиолированию. В стимулированных нейтрофилах и макрофагах наблюдается усиление S-тиолирования актина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. В гепатоцитах, находящихся в культуре с активированными нейтрофилами также усиливалось S-тиолирование, преимущественно за счет карбоангидразы III. В крысиных почках при ишемии и реперфузии с использованием в качестве субстрата цистеинбиотина резко возрастает количество S-тиолированных белков, таких как рецептор LDL, АТФ-синтаза, белок теплового шока, оксикислотная оксидаза, триозофосфатизомераза и др. При воздействии GSNO на цистеиновые протеазы образуются смешанные и межмолекулярные дисульфиды, что приводит к снижению их активности. S-тиолирование белков обратимо под влиянием восстанавливающих агентов. Поэтому можно полагать, что эта реакция подобно S-нитрозированию, может либо разобразить сигнальные и метаболические функции белков, либо нарушать их и тем самым вносить существенный вклад в цитотоксическое действие NO [125–129].

NO и гибель клеток. Оксид азота может как повышать, так и снижать выживаемость клеток при неблагоприятных воздействиях, а также самостоятельно вызывать гибель их по типу апоптоза или некроза в зависимости от условий. Термин “апоптоз” был введен в 1972 г. Дж. Ф. Керром и сотр. для обозначения “программируемой” гибели клеток, которая сопровождается характерными морфологическими изменениями (конденсацией ядра и цитоплазмы, разрушением хроматина, фрагментацией ДНК, образованием апоп-

тозных телец) и связана с развитием организма, а также протекающими в нем физиологическими и некоторыми патологическими процессами [130]. Как альтернативный апоптозу рассматривается другой тип гибели клеток — некроз. С ним связывают беспорядочные необратимые процессы, которые нарушают целостность мембран, приводят к набуханию цитоплазмы и митохондрий, кариорексису и кариолизису, а также утечке клеточного содержимого. Высвобождаемые из клеток лизосомные протеазы “распространяют” некротическую гибель на соседние клетки. Причиной некроза обычно являются мощные, несовместимые с жизнью воздействия физических или химических факторов, например тепла, ионизирующей радиации, детергентов и токсинов, которые повреждают мембранные структуры, ключевые ферменты и нуклеиновые кислоты. При воспалительных реакциях некротическую гибель клеток путем воздействия на клеточную мембрану способны вызвать комплемент, цитолитические антитела, киллерные лимфоциты. В отличие от некроза апоптозные клетки подвергаются фагоцитозу до наступления их лизиса.

Введение понятия апоптоза дало мощный толчок к изучению механизмов гибели клеток и выявлению их общих патофизиологических, биохимических и генетических закономерностей. Сигналами к апоптозу могут быть внешние и внутриклеточные повреждающие факторы, в частности киллерные молекулы (TNF- α , FasL, TRAIL, CD95-L), которые взаимодействуют на плазматической мембране с соответствующими “рецепторами смерти”, входящими в семейство рецепторов опухолевого некротического фактора (TNF-R), ксенобиотики, излучения, ROS, дефицит соединений роста/выживания, гипоксия и другие неблагоприятные условия.

Известны два основных сигнальных пути реализации апоптоза. Оба они приводят к активации каспаз (семейство цистеиновых протеиназ, расщепляющих пептидную связь белка после остатка аспарагиновой кислоты), в частности так называемых “казнящих” форм 3, 6 и 7, с действием которых связано повреждение структуры цитоскелета, развитие межнуклеосомной фрагментации ДНК и характерных для апоптоза морфологических признаков. Активация этих каспаз происходит через протеолиз соответствующих про-каспаз, который обеспечивается инициаторными каспазами 8 и 9. Последние активируются путем олигомеризации и аутопротеолиза.

В некоторых случаях апоптоз запускается связыванием лигандов с упомянутыми рецепторами смерти, что приводит к объединению различных адаптогенных белков, включая Fas-ассо-

цированный смертельный домен и прокаспазу 8, в сигнальный комплекс (DISC). В нем прокаспазы 8 саморасщепляется с образованием активной каспазы 8, способной путем протеолиза формировать активные каспазы 3, 6 и 7. В других случаях этого прямого каспазного каскада недостаточно, чтобы вызвать апоптоз. Для усиления сигнала вовлекаются митохондрии. При этом протеолитически активированные каспазой 8 белки семейства “ВН3-only” инициируют нарушение проницаемости мембран митохондрий и выход из них цитохрома *c* в цитоплазму, где он в присутствии dATP и/или ATP объединяется с активирующим протеазы фактором (Araf-1) в мультимерный комплекс. Последующее присоединение к нему прокаспазы-9 создает условие для ее аутопротеолиза с образованием каспазы 9, которая активирует прокаспазы 3 и 7. В регуляции проницаемости митохондриальных мембран участвуют белки семейства Bcl-2 и белок p53, супрессирующий рост опухоли. Помимо усиления и опосредования указанных внешних проапоптогенных сигналов митохондрии играют ведущую роль в реализации апоптоза, вызванного повреждением ДНК, окислительным стрессом, голоданием, воздействием ксенобиотиков и другими факторами. Гибельными для клеток последствиями повреждения митохондрий являются также выход из них индуцирующего апоптоз фактора (AIF) и эндонуклеазы G, прекращение синтеза ATP, окисление глутатиона и усиление генерации ROS.

В сигнальных процессах апоптоза участвует также эндоплазматический ретикулум. Нарушение внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} или биосинтеза белка в нем приводит к экспрессии каспазы 12 на его мембранной поверхности и транслокации к ней прокаспазы 7, что обеспечивает ее протеолитическую активацию. Указанные сигнальные пути апоптоза между собой тесно взаимодействуют [131–134].

Практически все типы клеток, пребывающие в состоянии покоя или пролиферации, при воздействии пусковых повреждающих факторов невысокой надпороговой интенсивности способны гибнуть по тем или иным сценариям апоптоза, за этапами развития которого можно проследить во времени. Гибель клеток по типу некроза вызывается повреждающими факторами максимальной интенсивности либо осмотическим шоком и детергентами. Этот процесс происходит настолько быстро, что появление характерных морфологических изменений можно отнести уже к посмертным. Нами показано, что латентный период, предшествующий их наступлению в тимocyтах крысы, после добавления к ним различ-

ных ксенобиотиков с увеличением дозы укорачивается и практически сходит на нет [135]. Трудно не согласиться с мнением исследователей [136] о том, что фактически к апоптозу относятся все этапы, сопровождающие гибель клеток, а к некрозу только те структурно-биохимические изменения, которые происходят уже после смерти клеток. Следовательно термин “апоптоз” можно рассматривать как синоним всевозможных сценариев клеточной гибели. Поэтому без термина “апоптоз”, не имеющего альтернативы, можно и обойтись.

NO может как усиливать жизнеспособность клеток, так и оказывать на них цитотоксическое действие. NO повышает выживаемость В-лимфоцитов, натуральных киллеров, эозинофилов, гепатоцитов, эмбриональных двигательных нейронов и некоторых клеточных линий, пребывающих в условиях, которые способствуют их гибели. NO препятствует гибели гепатоцитов у крыс при эндотоксемии, регенерации печени и введении TNF вместе с D-gal, если антиоксидантная защита гепатоцитов сохранена. Цитотоксическое действие NO даже при его относительно низких концентрациях показано на макрофагах, тимocyтах, фибробластах, кардиомиocyтах, хондриocyтах, нейронах, опухолевых, гладкомышечных, островковых панкреатических и эндотелиальных клетках [137]. NO защищает астроциты, но синергически усиливает гибель нейронных клеток при токсическом воздействии стауроспорина [138]. Доноры NO в таких же концентрациях вызывают гибель макрофагов и способствуют выживаемости гепатоцитов, что связывают с более высоким содержанием в последних негемового железа [137]. Таким образом, направленность действия NO связана с “судьбой” его химических превращений в различных типах клеток, которая определяется особенностями их обмена, в частности железа, O_2 , CO_2 и редокс-состояния в норме и при патологии.

Механизмы цитопротекторного действия NO. Эти механизмы включают в себя ингибирование активности каспаз через S-нитрозирование цистеиновых остатков их каталитических центров. Эффективность S-нитрозирования при нормоксических условиях определяется внутриклеточным уровнем негемового железа (Fe^{2+}), которое взаимодействуя с NO образует DNIC, где NO находится в окисленном состоянии (NO^+) и может осуществлять реакции S-нитрозирования. Существует альтернативное мнение, согласно которому NO ограничивает активность каспаз не посредством их S-нитрозирования, а влияя на те или иные этапы их процессинга. Антиапоптозному действию NO способствует также и то, что

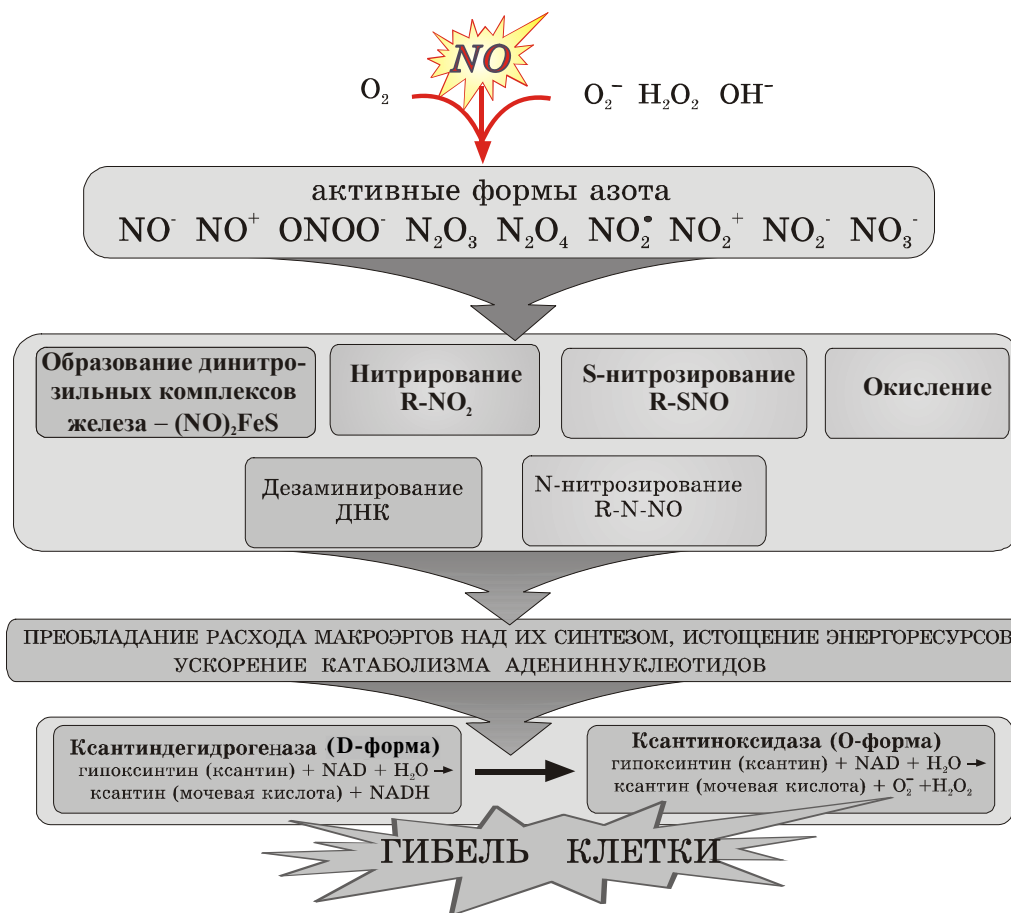
он увеличивает внутриклеточный фонд негемового железа вследствие активации гемоксигеназ, разрушающих гем. Для некоторых клеток (гепатоцитов, спленоцитов) показано, что NO может усиливать их резистентность к воздействию повреждающих сигналов через усиление синтеза cGMP, что приводит к активации соответствующих протеинкиназ и фосфорилированию участвующих в апоптозе белков семейства Bcl-2, BAD, каспазы-9 и др, а также к снижению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . NO стимулирует экспрессию белка теплового шока (Hsp 70) и других цитопротекторных белков, таких как циклооксигеназа-2, металлотioneины и трансклутаминаза, которая осуществляет Ca^{2+} -зависимую посттрансляционную модификацию ряда ферментов и физиологически активных пептидов [41,123,137,139–142]. NO угнетает экспрессию недавно открытого гена *SRG3*, активно участвующего в индуцируемом глюкокортикоидами апоптозе тимоцитов, препятствующего тем самым его развитию [143].

Данные последних лет, полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, указывают на участие в цитопротекторных механизмах ПН, который в наномолярных и низких микромолярных концентрациях способствует выживаемости миокардиоцитов при ишемии–реперфузии и нейронов, подвергаемых апоптозу. При высоких внутриклеточных концентрациях восстановленного глутатиона (GH) цитотоксическое действие ПН трансформируется в защитное, связанное с образованием G-NO. Интересно, что ПН сильно активирует глюкозо-6-фосфат дегидрогеназную активность и тем самым ускоряет глюконеогенез, что приводит к накоплению NADPH и, следовательно, регенерации в клетках глутатиона – основного защитного барьера на пути цитотоксического действия NO [66,144,145].

Цитотоксическое действие NO. Это действие направлено преимущественно на митохондрии, что наблюдается при воспалительных и нейродегенеративных процессах, ишемии и других патологиях. Митохондрии, очевидно, не имеют собственной NOS [146] и поэтому являются мишенью для NO, которая поступает из цитозоля. При высоких концентрациях NO ингибирует поглощение кислорода и окислительное фосфорилирование, нарушает потенциал и проницаемость мембран, усиливает выход из митохондрий Ca^{2+} и проапоптотических белков (индуцируемого апоптоза фактора и цитохрома *c*). При этом также стабилизируется (возможно за счет S-нитрозирирования) транскрипционный фактор-1 (HIF-1), индуцируемый при гипоксии. Он связывается с ДНК и обеспечивает экспрессию ряда генов, про-

дукты которых переключают ткани на анаэробный путь обмена, в частности усиливают гликолиз и ангиогенез. HIF-1 состоит из субъединиц α и β , первая из которых при нормоксических условиях разрушается пролингидроксилазами с использованием в качестве субстрата O_2 . Токсическое действие NO на митохондрии усугубляется образованием ПН. Митохондриальному дыханию сопутствует образование O_2^- . Поскольку последний не проникает через мембраны митохондрий, в них содержатся Mn-SOD для его обезвреживания. Оксид азота, действуя на убихинон дыхательной цепи, усиливает синтез O_2^- и, следовательно, ПН. ПН в митохондриях окисляет цистеиновые и метиониновые остатки белков, ингибирует комплексы I и II, аконитазу, АТФ-азу, Mn-SOD, креатинкиназу и глутатионпероксидазу, снижает уровень G-SH [147–150]. Высвобождающиеся под влиянием NO из митохондрий Ca^{2+} и проапоптотические белки приводят эндоплазматический ретикулум в так называемое стрессовое состояние. Оно сопровождается выбросом Ca^{2+} и усилением синтеза небольшого транскрипционного белка CHOP, экспрессирующего гены *Chop*, продукты которых участвуют в апоптозе [148,151,152]. Но в ЭР имеется также и механизм компенсаторной защиты клетки от индуцируемого NO повреждения митохондрий. Ca^{2+} , вышедший из поврежденных митохондрий, вызывает в эндоплазматическом ретикулуме разрушение сериновыми протеазами регуляторного стресс-фактора p90 ATF6 с образованием белка p50, который транспортируется в ядро, где усиливает экспрессию белка Grp78, участвующего в регуляции обмена глюкозы и обладающего цитопротекторными свойствами [149].

В некоторых типах клеток, например мышечных макрофагах, вызываемая NO гибель клеток связана с быстрым накоплением белка p53, супрессирующего рост опухоли. Его функция, по-видимому, состоит в том, что он останавливает клеточный цикл, повреждает ДНК и вызывает апоптоз, предохраняя тем самым геном от накопления излишних мутаций в условиях генотоксического стресса. Под влиянием NO усиливается фосфорилирование p53, осуществляемое с помощью митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК), вследствие чего стабильность и транскрипционная функция этого белка существенно возрастает. Отмечается также участие протеинкиназ C в модуляции p53-зависимой гибели клеток, вызванной NO. Однако остается неясным, способствует ли активация протеинкиназ C апоптозу или препятствует его развитию [142]. В условиях нитрозативного стресса выживаемость клеток снижается вследствие угнетения алкилтранс-



Один из механизмов цитотоксического действия NO (условия: гиперпродукция NO и O_2^- ; фонд восстановленных тиолов в клетке истощен, угнетены ферменты антиоксидантной системы, репарирующей ДНК).

феразной реакции и, следовательно, репарации ДНК [124]. Повреждение ДНК активирует поли(ADP-рибоза)синтазу, что, в свою очередь, приводит к усиленному гидролизу АТФ, истощению его в клеточном фонде и гибели клеток [153].

Таким образом, умеренное увеличение уровня NO (до 0,5 мкМ) способствует выживаемости клеток или же оказывает цитопротекторное действие с различными вариантами гибели, которые можно проследить во времени и отнести к апоптозу. Более высокие концентрации NO создают в организме условия нитрозативного и оксидативного стрессов, при которых истощается антиоксидантная защита (снижается уровень GSH, активность соответствующих ферментов) и нарушаются механизмы, репарирующие ДНК. В этих условиях оказываются задействованными все пути реализации цитотоксического действия NO, как прямого, так и опосредованного реактивными интермедиатами, которые изменяют функционирование различных биомолекул и вызывают метаболический дисбаланс. При этом расход мак-

роэргов преобладает над их синтезом, что приводит к снижению клеточного фонда АТФ (рисунок). Относить эти процессы, как принято считать, к необратимым посмертным изменениям метаболизма клетки некротического характера представляется не совсем обоснованным. Например, папаверин при действии на тимоциты в цитотоксичных концентрациях в опытах *in vitro* уже в первые минуты вызывает усиление катаболизма адениннуклеотидов и расщепление большей части клеточного фонда АТФ, однако значительное возрастание одно- и двуцепочечных разрывов ДНК, фрагментация хроматина и увеличение количества погибших клеток начинают происходить позднее (соответственно через 1, 3 и 6 ч). Таким образом, снижение внутриклеточного уровня АТФ является одним из ранних этапов клеточной гибели, который до определенного момента времени можно обратить путем удаления папаверина из культуральной среды [154,155]. Последствием усиления катаболизма адениннуклеотидов является трансформация ксантиндегид-

рогеназы (КФ 1.2.3.2.) из D-формы (ксантиндегидрогеназой) в O-форму (ксантиноксидазную). Эта трансформация наблюдается в процессе индуцируемой папаверином гибели тимоцитов и предшествует фрагментации ДНК. Переход дегидрогеназной активности ксантиноксидазы в оксидазную наблюдается также в тимоцитах крыс, подвергнутых ионизирующему облучению. Очевидно, трансформация этих ферментативных функций играет ключевую роль в генезе клеточной гибели, поскольку в реакции, катализируемой O-формой, в отличие от D-формы, в качестве акцептора электронов используется молекулярный кислород и образуются весьма токсичные молекулы O_2^- и H_2O_2 . Основными жизненно важными мишенями для их воздействия являются митохондрии, ядра и эндоплазматический ретикулум. В содержащей указанные субклеточные компоненты структурной фракции величина соотношения активности ксантиноксидазы (O-формы) к активности ксантиндегидрогеназы (D-формы) после воздействия токсичного фактора возрастает значительно больше, чем в цитозольной. Механизм участия ксантиноксидазной системы в процессе гибели тимоцитов вероятно является универсальным и существенно не зависит от вызывающего его фактора.

ROLE OF INTERACTION OF METABOLISM PATHS OF FORMALDEHYDE AND NITROGEN OXIDE IN THE MECHANISM OF THEIR TOXIC EFFECT. 2. TOXIC EFFECT OF NITROGEN OXIDE

N. P. Dmitrenko¹, A. Holian²

¹L. I. Medved Institute of Ecohygiene and Toxicology, Kyiv, Ukraine;

²Center of Environment Health Sciences, the University of Montana, USA;

e-mail: dmit@medved.kiev.ua; mpdmit@yandex.ru

S u m m a r y

Toxic properties of NO in organism are realized under its hyperproduction and inhibition of the system of anti-oxidant protection as a result of complex chemical transformations, the transient metals, oxygen, superoxide and other radicals being their main participant. Here direct paths (through formation of nitrosil complexes with the gem and nongem iron) of the toxic action of NO and the path mediated by active forms of nitrogen are found, which disturb various biomolecules and subcellular component through the reactions of S- and N-nitrosation, nitration, oxidation, desamination and other reaction, cause metabolic disbalance and death of cells by the

type of apoptosis or necrosis. A possible mechanism of the death of cells caused by NO was considered on the example of thymocytes. According to this mechanism one of early stages of this death is a decrease of the cell fund of AP, intensification of catabolism of adenine nucleotides and transformation of xanthine oxidoreductase from D-form (xanthine dehydrogenase) of O-forms (xantine oxidase) which catalyzes formation of cytotoxic molecules of superoxide and hydroperoxide. This cytotoxic mechanism which includes transformation of xanthine oxidase system, is probably, universal and does not depend essentially on the starting factor.

К е у w o r d s: nitrogen, oxide, dinitrosyl complex of nongem iron (DNIC), peroxinitrite, reactive forms of nitrogen oxide (RNOS), N- and S-nitrosation, apoptosis, necrosis, cytotoxic effect.

1. Lancaster J. R. Jr. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — **91**, N 15. — P. 8137–8141.
2. Stamler J. S., Singel D. J., Loscalzo J. // Science. — 1992. — **258**, N 5090. — P.1898–1902.
3. Thomas D. D., Liu X., Kantrow S. P., Lancaster J. R. Jr. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — **98**, N 1. — P. 355–360.
4. Robinson J. P. Phagocyte Function: a Guide for Research and Clinical Evaluation / Eds. J. P. Robinson, G. F. Babcock. Wiley-Liss. Inc. New York. — 1998. — P. 217–252.
5. Wink D. A., Mitchell J. B. // Free Radic. Biol. Med. — 1998. — **25**, N 4–5. — P. 434–456.
6. Wink D. A., Vodovotz Y., Laval J. et al. // Carcinogenesis. — 1998. — **19**, N 5–7. — P.11–721.
7. Grisham M. B., Jourd'Heuil D., Wink D. A. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 1999. — **276**, N 2. — P. G315–G321.
8. Durzan D. J. // J. Forest Science. — 2002. — **48**, N 7. — P. 281–291.
9. Espey M. G., Miranda K. M., Feelisch M. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2000. — **899**. — P. 209–221.
10. Gow A. J., Stamler J. S. // Nature. — 1998. — **391**, N 6663. — P. 169–73.
11. Ballou D. P., Zhao Y., Brandish P. E., Marletta M. A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — **99**, N 19. — P. 12097–12101.
12. Cooper C. E. // Biochim. Biophys. Acta. — 1999. — **1411**, N 2–3. — P. 290–309.
13. Muller C. M., Scierka A., Stiller R. L. et al. // Anesthesiology. — 1996. — **84**, N 6. — P. 1435–1442.
14. Kim Y.-M., Bergonia H. A., Muller C., Pitt B. R. et al. // J. Biol. Chem. — 1995. — **270**, N 11. — P. 5710–5713.
15. Мордвинцев П. И., Клещев А. Л., Ванин А. Ф. // Биофизика. — 1986. — **31**, вып 5. — С. 877–881.

16. *Варич В. Я., Ванин А. Ф., Овсянникова Л. М.* // Там же. — 1987. — **32**, вып. 6. — С. 1062–1063.
17. *Radi R.* // PNAS. — 2004. — **101**, N 12. — P. 4003–4008.
18. *Voevodskaya N. V., Serezhenkov V. A., Cooper C. E. et al.* // Biochem. J. — 2002. — **368**, N Pt 2. — P. 633–639.
19. *Petrat F., de Groot H., Sustmann R., Rauen I U.* // Biol. Chem. — 2002. — **383**, N 3–4. — P. 489–502.
20. *Miles A. M., Bohle D. S., Glassbrenner P. A. et al.* // J. Biol. Chem. — 1996. — **271**, N 1. — P. 40–47.
21. *Brown N. M., Anderson S. A., Steffen D. W. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — **95**, N 26. — P. 15235–15240.
22. *Konijn A. M., Glickstein H., Vaisman B. et al.* // Blood. — 1999. — **94**, N 6. — P. 2128–2134.
23. *Cabantchik I., Konijn A.* // 6th Internet World Congress for Biomedical Sciences February 14–25, 2000 www.uclm.es/inabis2000/symposia/files/181/figure1.htm — 11k.
24. *Cairo G., Pietrangelo A.* // Biochem. J. — 2000. — **352**, N 1. — P. 241–250.
25. *Watts R. N., Richardson D. R.* // Eur. J. Biochem. — 2002. — **269**, N 14. — P. 3383–3392.
26. *Kruszewski M., Iwanenko T.* // Acta Biochim. Pol. — 2003. — **50**, N 1. — P. 211–215.
27. *Mulsch A., Mordvintcev P. I., Vanin A. F., Busse R.* // FEBS Lett. — 1991. — **294**, N 3. — P. 252–256.
28. *De Maria F., Pedersen J. Z., Caccuri A. M. et al.* // J. Biol. Chem. — 2003. — **278**, N 43. — P. 42283–42293.
29. *Kleschov A. L., Hubert G., Munzel T. et al.* // BMC Pharmacology. — 2002 <http://www.biomedcentral.com/1471-2210/2/3>.
30. *Торчинский Ю. М.* / Сера в белках. — М.: Наука, 1977. — 302 с.
31. *Drapier J-C.* // Methods in Enzymology. — 1997. — **11**. — P. 319–329.
32. *Boese M., Mordvintcev P. I., Vanin A. F. et al.* // J. Biol. Chem. — 1995. — **270**, N 49. — P. 29244–29249.
33. *Boese M., Keese M. A., Becker K. et al.* // Ibid. — 1997. — **272**, N 35. — P. 21767–21773.
34. *Keese M. A., Bose M., Mulsch A. et al.* // Biochem. Pharmacol. — 1997. — **54**, N 12. — P. 1307–1313.
35. *Maria F., Pedersen J. Z., Caccuri A. M. et al.* // J. Biol. Chem. — 2003. — **278**, N 43. — P. 42283–42293.
36. *Guittet O., Ducastel B., Salem J. S. et al.* // Ibid. — 1998. — **273**, N 34. — P. 22136–22144.
37. *Houston M., Chumley P., Radi R. et al.* // Arch. Biochem. Biophys. — 1998. — **355**, N1. — P. 1–8.
38. *Giannone G., Takeda K., Kleschyov A. L.* // J. Physiol. — 2000. — **529**, N 3. — P. 735–745.
39. *Kleschyov A. L., Muller B., Keravis T. et al.* // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2000. — **279**, N 6. — P. H2743–H2751.
40. *Miller M. J. S., Sandoval M. T.* // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 1999. — **276**, N 4. — P. G795–G799.
41. *Melino G., Catani M. V., Corazzari M. et al.* // Cell Mol. Life Sci. — 2000. — **57**. — P. 612–622.
42. *Wendehenne D., Pugin A., Klessig D. F., Durner J.* // TRENDS in Plant Science. — 2001. — **6**, N 4. — P. 177–183.
43. *Katayama Y.* // Dojindo Newsletter. — 1995. — N 1. — P. 1–36.
44. *Nicetic V., Stojanovich S., Spasic B.* // Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta. — 1998. — **34**, N 2. — P. 463–477.
45. *Bartberger M. D., Fukuto J. M., Houk K. N.* // PNAS. — 2001. — **98**, N 5. — P. 2194–2198.
46. *Miranda K. M., Espey M. G., Yamada K. et al.* // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**, N 3. — P. 1720–1727.
47. *Wendehenne D., Pugin A., Klessig D. F., Durner J.* // TRENDS in Plant Science. — 2001. — **6**, N 4. — P. 177–183.
48. *Wong P. S., Hyun J., Fukuto J. M. et al.* // Biochemistry. — 1998. — **37**, N 16. — P. 5362–5367.
49. *Murphy M. E., Sies H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1991. — **88**, N 23. — P. 10860–10864.
50. *Vodovotz Y., Kim P. K. M., Bagci E. Z. et al.* // Current Mol. Medicine. — 2004. — **4**, N 7. — P. 753–762.
51. *Paolucci N., Katori T., Champion H. C. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — **100**, N 9. — P. 5537–5542.
52. *Miranda K. M., Espey M. G., Yamada K. et al.* // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**, N 3. — P. 1720–1727.
53. *Uffelen B. E. V., Van der Zee J., Koster B. M. et al.* // Biochem. J. — 1998. — **330**, N 4. — P. 719–722.
54. *Schmidt H. H. H. W., Hofmann H., Schindler U. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — **93**, N 25. — P. 14492–14497.
55. *Uffelen B. E. V., Van der Zee J., Koster B. M. et al.* // Biochem. J. — 1998. — **330**, N 4. — P. 719–722.
56. *Реутов В. П., Сорокина Е. Г.* // Биохимия. — 1998. — **63**, вып. 7. — С. 1029–1040.
57. *Millar T. M., Stevens C. R., Benjamin N. et al.* // FEBS Lett. — 1998. — **427**, N 2. — P. 225–228.
58. *Zhang Z., Naughton D., Winyard P. G. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1998. — **249**, N 3. — P. 767–772.

59. Дмитренко Н. П., Кушко Т. О., Шандренко С. Г. // Укр. біохім. журн. — 2001. — **73**, N 6. — С. 113–118.
60. Miller R. T., Martasek P., Roman L. J. et al. // Biochemistry. — 1997. — **36**, N 49. — P. 15277–15284.
61. Xia Y., Zweier J. L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — **94**, N 23. — P. 12705–12710.
62. Koppenol W. H. // Quim. Nova. — 1998. — **21**, N 3. — P. 326–331.
63. Chau R. M. W., Lau I. Y. K. D. // <http://www.hku.hk/anatomy/Staff/RMWChau/SOD/Mechanisms%20underlying%20ALS.doc>.
64. Beckman J. // Oxygen'99 Sunrise Free Radical School. — P. 1–13.
65. Estevez A. G., Joaquin J. // Ann. N.-Y. Acad. Sci. — 2002. — **962**. — P. 207–211.
66. Ferdinandy P., Schulz R. // Br. J. Pharmacol. — 2003. — **138**, N 4. — P. 532–543.
67. Nitric oxide <http://www.whatislife.com/reader2/Metabolism/pathway/NOhtml>.
68. Coddington J. W., Hurst J. K., Lyman S. V. // J. Am. Chem. Soc. — 1999. — **121**. — P. 2438–2443.
69. Trujillo M., Radi R. // Arch. Biochem. Biophys. — 2002. — **397**, N 1. — P. 91–98.
70. Van der Vliet A., Hoen P. A. C., Wong P. S.-Y. et al. // J. Biol. Chem. — 1998. — **273**, N 46. — P. 30255–30262.
71. Coupe P. J., Williams D. L. H. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. — 2001. — **2**. — P. 1595–1599.
72. Lyman S. V., Hurst J. K. // J. Am. Chem. Soc. — 1995. — **117**. — P. 8867–8868.
73. Squadrito G. L., Pryor W. A. // Free Radic. Biol. Med. — 1998. — **25**, N 4–5. — P. 392–403.
74. Tien M., Berlett B. S., Levine R. L. et al. // Biochemistry. — 1999. — **96**, N 14. — P. 7809–7814.
75. Augusto O., Bonini M. G., Amanso A. M. et al. // Free Radic. Biol. Med. — 2002. — **32**, N 9. — P. 841–859.
76. Liu X., Miller M. J. S., Joshi M. S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — **95**, N 5. — P. 2175–2179.
77. Nedospasov A., Rafikov R., Beda N., Nudler E. // Ibid. USA. — 2000. — **97**, N 25. — P. 13543–13548.
78. Eiserich J. P., Hristova M., Cross C. E. et al. // Nature. — 1998. — **391**, N 6665. — P. 393–397.
79. Wu W., Chen Y., Hazen S. L. // J. Biol. Chem. — 1999. — **274**, N 36. — P. 25933–2544.
80. Gaut J. P., Byun J., Tran H. D. et al. // J. Clin. Invest. — 2002. — **109**, N 10. — P. 1311–1319.
81. Tien M., Berlett B. S., Levine R. L. et al. // Biochemistry. — 1999. — **96**, N 14. — P. 7809–7814.
82. Halliwell B. // FEBS Lett. — 1997. — **411**, N 2–3. — P. 157–160.
83. Ischiropoulos H. // Arch. Biochem. Biophys. — 1998. — **356**, N 1. — P. 1–11.
84. Turko I. V., Murad F. // Pharmacol. Rev. — 2002. — **54**, N 4. — P. 619–634.
85. Van der Vliet A., Eiserich J. P., Cross C. E. // Respiratory Research. — 2000. — **1**. — P. 67–72.
86. Beckman J. S., Carson M., Smith C. D., Koppenol W. H. // Nature. — 1993. — **364**, N 6438. — P. 584–589.
87. Ghadge G. D., Lee J. P., Bindokas V. P. et al. // J. Neurosci. — 1997. — **17**, N 15. — P. 8756–8766.
88. Estevez A. G., Spear N., Manuel S. M. et al. // Ibid. — 1998. — **18**, N 3. — P. 923–931.
89. Robberecht W. // <http://www.harcourt-international.com/e-books/pdf/273.pdf>.
90. Hayward L. J., Rodriguez J. A., Kim J. W. et al. // J. Biol. Chem. — 2002. — **277**, N 18. — P. 15923–15931.
91. Ischiropoulos H., Zhu L., Chen J. et al. // Arch. Biochem. Biophys. — 1992. — **298**, N 3. — P. 431–437.
92. Fumiyuki Yamakura, Hikari Taka, Tsutomu Fujimura, Kimie Murayama // J. Biol. Chem. — 1998. — **273**, N 23. — P. 14085–14089.
93. Jour'd'heil D., Kang D., Grisham M. B. // Frontiers in Bioscience. — 1997. — **2**. — P. d189–d196.
94. Itoh T., Matsuya Y., Maeta H. et al. // Chem. Pharm. Bull. — 1999. — **47**, N 1. — P. 133–135.
95. Смердова Л. Н., Шандренко С. Г., Дмитренко М. П. // Совр. пробл. токсикологии. — 2002. — № 4.
96. Al-Mustafa A. H. Stability and transnitrosation efficacy of S-nitrosothiols in biological model systems by MS Biological Science. Dusseldorf-2001 // diss.ub.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/file?dissid=289
97. Talman W. T. // Braz. J. Med. Biol. Res. — 1997. — **30**, N 4. — P. 515–520.
98. Ceron P. I. B., Cremonez D. C., Bendhack L. M., Tedesco A. C. // J. Pharm. Exp. Therap. — 2001. — **298**, N 2. — P. 686–694.
99. Cornwell T. L., Ceaser E. K., Li J. et al. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2003. — **284**, N 6. — P. C1516–C1524.
100. Ramachandran N., Root P., Jiang X.-M., Hogg P. J., Mutus B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2001. — **98**, N 17. — P. 9539–9544.
101. Hogg N., Sing R. J., Konorev E. et al. // Biochem. J. — 1997. — **323**, N 2. — P. 477–481.
102. Zhang Y., Hogg N. // Proc. Nat. Acad. Sci. — 2004. — **101**, N 21. — P. 7891–7896.

103. *AL-SA'doni H., Ferro A.* // *Clinical Science.* – 2000. – **98**, N 5. – P. 507–520.
104. *Ng C. W., Najbar-Kaszkiel A.T., Li C. G.* // *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* – 2003. – **30**, N 5–6. – P. 1440–1681.
105. *Vanin A. F., Muller B., Alencar J. L. et al.* // *Current Topics in Biophysics.* – 2002. – **26**, N 1. – P. 101–113.
106. *Rotta J. C. G., Lunardi C. N., Tedesco A. C.* // *Braz. J Med. Biol. Res.* – 2003. – **36**, N 5. – P. 587–594.
107. *Shishido S. M., Seabra A. B., Loh W., de Oliveira M. G.* // *Biom.* – 2003. – **24**, N 20. – P. 3543–3553.
108. *Trujillo M., Alvarez M. N., Peluffo G. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**, N 14. – P. 7828–7834.
109. *Liu Z., Rudd M. A., Freedman J. E., Loscalzo J.* // *J. Pharmacol. Experim. Therap.* – 1998. – **284**, N 2. – P. 526–534.
110. *Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – **89**, N 16. – P. 7674–7677.
111. *Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J. S.* // *Nature.* – 1996. – **380**, N 6571. – P. 221–226.
112. *Jourd'heuil D., Hallen K., Feelisch M., Grisham M. B.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – **28**, N 3. – P. 409–417.
113. *Rafikova O., Rafikov R., Nudler E.* // *PNAS.* – 2002. – **99**, N 9. – P. 5913–5918.
114. *Scharfstein J. S., Keaney J. F. Jr., Slivka A. et al.* // *J. Clin. Invest.* – 1994. – **94**, N 4. – P. 1432–1439.
115. *Crane M. S., Olsson R., Moore K. P. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 49. – P. 46858–46863.
116. *Tsikis D., Frolich J. C.* // *Circ. Res.* – 2002. – **90**, N 3. – P. e39–e39.
117. *Shah C. M., Locke I. C., Chowdrey H. S., Gordge M. P.* // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – **31**, N 6. – P. 1450–1452.
118. *Stamler J. S., Jia L., Eu J. P. et al.* // *Science.* – 1997. – **276**, N 5321. – P. 2034–2037.
119. *McMahon T. J., Moon R. E., Luschinger B. P. et al.* // *Circ. Res.* – 2004. – **94**, N 4. – P. 414–417.
120. *Tsikis D., Frolich J. C.* // *Ibid.* – 2002. – **90**, N 3. – P. e39–39.
121. *Schechter A. N., Gladwin M. T.* // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – **348**, N 15. – P. 1483–1485.
122. *Gladwin M. T., Schechter A. N.* // *Circ. Res.* – 2004. – **94**, N 7. – P. 851–855.
123. *Broillet M. C.* // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1999. – **55**, N 8–9. – P. 1036–1042.
124. *Liu L., Xu-Welliver M., Kanugula S., Pegg A. E.* // *Cancer Research.* – 2002. – **62**, N 11. – P. 3037–3043.
125. *Mallis R. J., Buss J. E., Thomas J. A.* // *Biochem. J.* – 2001. – **355**, N 1. – P. 145–153.
126. *Thomas J. A.* Protein S-thiolation, S-nitrosylation, and irreversible sulfhydryl oxidation: roles in redox regulation / <http://www.bb.iastate.edu/~bb404/proteinoxidation.pdf>.
127. *Xian M., Chen X., Liu Z., Wang K., Wang P. G.* // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**, N 27. – P. 20467–20473.
128. *Huang K. P., Huang F. L.* // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – **64**, N 5–6. – P. 1049–1056.
129. *Eaton P., Jones M. E., McGregor M. et al.* // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – **14**, N 3. – P. S290–S296.
130. *Kerr J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R.* // *Br. J. Cancer.* – 1972. – **26**, N 4. – P. 239–257.
131. *Chang H. Y., Zhenhua D., Yingkai C.* // *Chin. Med. J.* – 2002. – **115**, N 3. – P. 14–17.
132. *Gewies A.* Introduction to Apoptosis (ApoReview) 2003 // www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm-71k.
133. *Stoneman V. E., Bennett R.* // *Clinical Science.* – 2004. – **107**, N 4. – P. 343–354.
134. *Saelens X., Festjens N., Walle V. L. et al.* // *Oncogene.* – 2004. – **23**, N 16. – P. 2861–2874.
135. *Кишко Т. О., Дмитренко Н. П., Лобода Ю. И.* // *Соврем. пробл. токсикол.* – 2000. – N 4. – С. 13–16.
136. *Kanduc D., Mittelman A., Serpico R. et al.* // *Intern. J. Oncol.* – 2002. – **21**, N 1. – P. 165–170.
137. *Vodovotz Y., Kim P. K., Bagci E. Z. et al.* // *Curr. Mol. Med.* – 2004. – **4**, N 7. – P. 753–762.
138. *Almeida A., Almeida J., Bolanos J. P., Moncada S.* // *PNAS.* – 2001. – **98**, N 26. – P. 15294–15299.
139. *Kim Y.-M., Chung H.-T., Simmons R. L., Biliyar T. R.* // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**, N 15. – P. 10954–10961.
140. *Kim P. K. M., Kwon Y-G, Chung H-T., Kim Y-M.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2002. – **962**, N 1. – P. 42–52.
141. *Kim Y.-M., Chung H.-T., Kim S.-S. et al.* // *J. Neurosci.* – 1999. – **19**, N 16. – P. 6740–6747.
142. *Brune B.* // *Cell Death and Different.* – 2003. – **10**, N 8. – P. 864–869.
143. *Jeong S. M., Lee K. Y., Shin D. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 33. – P. 34373–34379.
144. *Garcia-Nogales P., Almeida A., Bolanos J. P.* // *Ibid.* – 2003. – **278**, N 2. – P. 864–874.
145. *Bolanos J. P., Garcia-Nogales P., Almiida A.* // *Cur. Pharmac. Design.* – 2004. – **10**, N 8. – P. 867–877.

146. *Tay Y. M., Lim K. S., Jenner A. et al.* // *Free Radic. Res.* — 2004. — **38**, N 6. — P. 591–599.
147. *Carreras M. C., Scopfer F., Lisdero C. et al.* // *Biol. Res.* — 2000. — **33**, N 2. — P. 177–183.
148. *Gotoh T., Oyadomari S., Mori K., Mori M.* // *J. Biol. Chem.* — 2002. — **277**, N 14. — P. 12343–12350.
149. *Xu W., Charles I. G., Moncada S.* // *Cell Research.* — 2005. — **15**, N 1. — P. 63–65.
150. *Mateo J., Garcia-Lecea M., Cadenas S. et al.* // *Biochem. J.* — 2003. — **376**, N 2. — P. 537–544.
151. *Oyadomari S., Takeda K., Takiguchi M. et al.* // *PNAS.* — 2001. — **98**, N 19. — P. 10845–10850.
152. *Xu W., Liu L., Charles I. G., Moncada S.* // *Nature Cell Biology.* — 2004. — **6**, N 11. — P. 1129–1134.
153. *Szabo C., Zingarelli B., O'Connor M., Salzman A. L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — **93**, N 5. — P. 1753–1758.
154. *Дмитренко Н. П.* / Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. — К.: Наук. думка, 1991. — 198 с.
155. *Кишко Т. О., Дмитренко Н. П.* // *Укр. біохім. журн.* — 2000. — **72**, № 3. — С. 95–104.

Получено 04.04.2005