

## ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ОКСИДА АЗОТА

Титов В.Ю.<sup>1,2</sup>, Осипов А.Н.<sup>1</sup>, Кочиш И.И.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова  
ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ; e-mail: vtitov43@yandex.ru

<sup>2</sup> Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии-МВА имени К.И. Скрябина  
ул. Акад. Скрябина, 23, г. Москва, 109472, РФ; e-mail: kochish.i@mail.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2021

**Аннотация.** При помощи высокочувствительного и высокоспецифичного ферментного сенсора показано, что в норме большинство живых тканей содержит не более 50-100 нМ нитрита и нитрозоаминов, но единицы и десятки микромоляр соединений – доноров NO: S-нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), высокомолекулярные нитросоединения, способные трансформироваться в ДНКЖ (RNO<sub>2</sub>). Следовательно, в норме живые ткани имеют механизмы предотвращения окисления NO кислородом до токсических продуктов. Доноры NO – стабильные соединения и, практически, не распадаются спонтанно с высвобождением NO. Основной пул доноров NO в большинстве тканей представлен ДНКЖ. NO может переходить с комплекса на мишень в момент деструкции комплекса под действием более эффективных хелаторов железа, чем лиганды, входящие в состав комплекса. Причем переход осуществляется с минимальным пребыванием NO в свободном состоянии. В случае, если комплекс подвергается воздействию эффективного хелатора железа, но мишень отсутствует, образуется железонитрозильный комплекс, содержащий этот хелатор. Мы предполагаем, что части апофермента некоторых ферментов – физиологических мишеней NO могут выступать в роли хелаторов – конкурентов. Таким образом, физиологический эффект соединений – доноров NO зависит не от их способности диссоциировать с высвобождением NO, но, прежде всего от наличия и состояния физиологической мишени. Не NO случайно находит мишень, а мишень, взаимодействует с донором – NO, вызывая его деструкцию и присоединяя NO. Также эффективность ДНКЖ как донора NO зависит от состава комплекса. Комплекс, содержащий лиганды с высоким сродством к железу, труднее разрушается хелатором железа, что необходимо для переноса NO к мишени. Это показано как на модельных системах, так и на живых организмах.

**Ключевые слова:** Оксид азота, динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ), лиганды ДНКЖ.

До сих пор отсутствуют методы, позволяющие осуществлять оперативный контроль содержания метаболитов NO в живых тканях и его изменения в ходе физиологических и патологических процессов. Предполагается, что основную часть соединений – депо (или соединений – доноров NO) в клетках составляют динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ). Считается, что они продлевают физиологическое время жизни NO и непосредственно взаимодействуют с его физиологической мишенью [1-3]. Большинство ДНКЖ находятся в биядерной форме, не являющейся парамагнитной, и не могут быть определены методом ЭПР [1,3]. Прочие методы, основанные на использовании различных ловушек на NO, а также образовании комплексов с реагентами, не являются высокоспецифичными и не способны зафиксировать весь спектр метаболитов NO в живых тканях [4].

Разработанный нами ферментный сенсорный метод основан на обратимом ингибировании каталазы всеми нитрозосоединениями, исходно имеющими NO<sup>+</sup> - группу, или приобретающими ее под действием ряда факторов. Галоид-ионы увеличивают эффективность ингибирования на два порядка. Нитрозосоединения теряют ингибирующие свойства под действием ряда веществ, специфичных для каждой их группы. Такой подход позволяет определять концентрацию S-нитрозотиолов, ДНКЖ, нитрита и нитрозоаминов с точностью до 50 нМ. Ингибирующий эффект других известных ингибиторов каталазы не обладает зависимостью от концентрации галоид – ионов. Прочие ингибиторы не содержатся в норме в живых тканях в количествах, достаточных для значительного ингибирования фермента [5,6]. Так как разложение перекиси водорода каталазой – высокоэкзотермичный процесс, контролировать его кинетику и определять активность фермента возможно с помощью высокочувствительного динамического калориметра. Такая методика не требует предварительной очистки образца, так как его окрашенность и мутность не являются помехами [6]. Нитрат определялся посредством восстановления хлоридом ванадия до нитрита и определения как последнего [6].

Таким образом мы имеем возможность оперативного контроля общей концентрации нитро- и нитрозосоединений и их состава, а также изменения этих параметров при различных физиологических и патологических процессах. Очевидно, что физиологический эффект, опосредуемый NO, должен быть сопряжен с переносом NO на какую-то мишень, что, в свою очередь, неизбежно приведет к изменению состава нитро – и нитрозосоединений. Имея возможность контролировать эти изменения, мы можем количественно определить расход NO в процессе, и изменение состава нитро- и нитрозосоединений, как эндогенно синтезированных, так и экзогенно введенных. На основании этих данных возможно предположить роль тех или иных структур в передаче NO на мишень. И ответить на вопрос: как обеспечивается специфичность воздействия NO и предохранение от

токсического воздействия продуктов его окисления кислородом – нитрита, диоксида азота, пероксинитрита. Это является целью данного исследования.

### МЕТОДИКА

В экспериментах использовался однозамещенный фосфат калия, цитрат калия, хлорид натрия, трилон Б, пероксид водорода "Лаверна" (Россия), каталаза, нитрит калия, глутатион, цистеин, L-аргинин, L-нитроаргинин (НА), гемоглобин "Sigma" (США). Препарат ДНКЖ/GSH получали по описанной ранее методике [6, 7]. Путем инкубации 0,1 М нитрита калия с 0,12 М водным раствором глутатиона и 0,1 М HCl (1:1:2, v/v) в течение 15 минут получали препарат S-нитрозоглутатиона (GSNO). Полученный препарат разводился 40 мМ Na-фосфатным буфером, pH 6,0, до концентрации 10 мМ. К полученному раствору GSNO добавлялся FeSO<sub>4</sub> до конечной концентрации 10 мМ, раствор центрифугировался при 2000 g для отделения и удаления излишка железа. Препарат ДНКЖ/Cys получали по аналогичной методике, но вместо глутатиона использовался цистеин. Препарат нитрозильного комплекса железа, содержащего цитрат, (НКЖ/цитрат) получали путем добавления к 10 мМ раствору ДНКЖ/GSH цитрата калия до конечной его концентрации 20 мМ [6]. Препарат Fe (NO)<sub>n</sub> получали путем окисления ДНКЖ/GSH в системе пероксидазы хрена – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [8].

Гомогенаты эмбрионов на 5 сутки получали путем обработки содержимого яйца без скорлупы в стеклянном гомогенизаторе в присутствии физиологического раствора (8 мин, 40 фрикций/мин, 6 °С).

Для определения содержания нитро- и нитрозосоединений использовался ферментный сенсор [5, 6, 8]. Он основан на уникальной способности нитрита и других нитрозосоединений, имеющих в составе NO<sup>+</sup>-группу или приобретающую ее под воздействием ряда реагентов, ингибировать каталазу в присутствии галоид – ионов с примерно равной эффективностью, одинаково зависящей от pH – среды. Другие известные ингибиторы каталазы не обладают такими особенностями и в норме не встречаются в биообъектах в концентрациях, способных привести артефакты [6].

Определение активности каталазы осуществлялось калориметрическим методом, основанным на контроле кинетики теплопродукции, сопровождающей разложение пероксида водорода. Использовалась установка на основе прибора "Dithermanal" (Венгрия). Активность каталазы определялась по величине наклона начального прямолинейного участка кинетики. Концентрация нитрозосоединений определялась по степени ингибирования каталазы, согласно калибровочной кривой, полученной с использованием нитрита в различных концентрациях. [5,6].

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) теряют ингибирующую способность в среде, содержащей хелатор железа и ловушку NO (гемоглобин). Именно по этому свойству судили о их наличии и концентрации. Ингибирование каталазы в присутствии хлорида говорит о наличии NO<sup>+</sup>-группы [5]. Эффект хелаторов железа – о связи нитрозо – группы с железом. Концентрацию ДНКЖ/GSH и ДНКЖ/Cys в маточных растворах определяли спектрофотометрически, используя  $\epsilon_{310} = 3000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [5]. Известно, что S-нитрозотиолы (RSNO) трансформируются в ДНКЖ под воздействием закисного железа [1,2,7]. Нами показано, что S-нитрозотиолы не теряют способности ингибировать каталазу в системе гемоглобин – хелатор железа, но теряют их в такой системе, если предварительно было добавлено закисное железо, так как трансформируются в ДНКЖ и приобретают их свойства [6]. S-нитрозотиолы определялись как соединения, трансформирующиеся в ДНКЖ/SH под воздействием закисного железа и тиолов и приобретающие их свойства. Нитрит (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) и нитрозоамины (R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>NNO), практически, не продуцируют ДНКЖ в нейтральной среде и сохраняют ингибирующие способности при последовательном добавлении закисного железа, глутатиона, ловушки NO и хелатора железа. Их совокупное определение основано на этих свойствах [5,6]. Нитрозильные комплексы железа, не содержащие лиганды, кроме NO, либо содержащие таковые, но с очень низкой константой связывания (Fe-(NO)<sub>n</sub>), определялись как соединения, исходно лишённые свойства ингибировать каталазу, но приобретающие ингибирующие свойства (ДНКЖ/SH) после добавления глутатиона в реакционную среду [8]. Высокомолекулярные нитросоединения, способные трансформироваться в ДНКЖ (RNO<sub>2</sub>), определялись как соединения, приобретающие ингибирующие свойства ДНКЖ/SH под воздействием закисного железа и глутатиона [6]. Для определения общего пула нитросоединений использовалась их способность восстанавливаться треххлористым ванадием до нитрозо – состояния, в котором они приобретают способность ингибировать каталазу. Метод не нуждается в какой-либо предварительной подготовке образца, поскольку не основан на фотометрии. Чувствительность метода – 40 нМ [6].

Концентрация гемоглобина также определялась спектрофотометрически, используя  $\epsilon_{540} = 1,5\cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [9].

Реакционная среда во всех случаях содержала 40 мМ фосфатный буфер, 158 мМ NaCl, 9,0 нМ каталазы, pH 6,0. Реакция запускалась путем добавления в среду 10 мМ пероксида водорода. Концентрация всех исследуемых соединений в реакционной среде – 0,25 мкМ; добавляемых реагентов: глутатиона (GSH), цистеина (Cys) о-фенантролина (о-фен) и прочих хелаторов железа – 0,5 мМ; гемоглобина (HbO<sub>2</sub>) – 100 мкМ; FeSO<sub>4</sub> – 10,0 мМ. К 5,0 мкМ раствору исследуемого вещества в 40 мМ фосфатном буфере, pH 6,0 добавлялись реагенты с интервалом в 1 мин. После 5 мин. инкубации раствор переносили в реакционную среду. При этом исследуемое вещество разбавлялось в 20 раз.

Оплодотворенные куриные яйца породы мини-мясная и кросса Хайсекс белый, а также взрослые куры кросса Хайсекс белый получали в ООО «Генофонд». Для разведения вводимых в яйцо препаратов использовался

стерильный физиологический раствор. 10 мМ растворы препаратов вводились в яйца за 1 ч. до закладки на инкубацию через воздушную камеру в объеме 0,3 мл. Развитие эмбриона контролировалось путем овоскопии на 5 и 7 дни инкубации. Яйца, в которых не было развития эмбриона или имели место дефекты развития: отстаивание в развитии, кровь-кольцо, отбраковывались. Для инкубации использовался инкубатор ИПХ-10 (Россия). Температура в инкубационный период – 37,6 °С.

В экспериментах на взрослых курах забор крови осуществлялся в состоянии натошак после 16-часового голодания из подкрыльцовой вены в количестве 2-3 мл. В качестве антикоагулянта использовали 3,8%-й раствор цитрата натрия. Препараты вводились также в подкрыльцовую вену.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ BIOSTAT. Данные представлены в виде: среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В большинстве тканей концентрация нитрита менее 50 нМ [6], в то время как концентрация соединений – доноров NO – единицы и десятки мкМ [3, 6]. Это можно объяснить либо тем, что нитрит быстро исчезает из тканей, либо тем, что он не образуется. Но нитрит в концентрации несколько мкМ может в течение по крайней мере часа инкубироваться в растворе гемоглобина – известной ловушки NO. При этом он не утрачивал присущих ему ингибирующих свойств, на основании которых определялся как нитрит (табл. 1(6)). Следовательно, он не окисляется до нитрата, который не ингибирует каталазу [6], и не восстанавливается с выделением NO. Основной пул доноров NO в большинстве тканей составляют ДНКЖ [2, 3, 6]. ДНКЖ, содержащие две молекулы глутатиона и две молекулы цистеина в качестве лигандов (соответственно, ДНКЖ/GSH и ДНКЖ/Cys), также не теряли соответствующих свойств ингибировать каталазу при инкубации с ловушкой NO гемоглобином (табл. 1 (1,2)). Следовательно, спонтанного распада с высвобождением NO эти соединения, практически, не испытывают.

Деструкция ДНКЖ может произойти под воздействием хелаторов железа. Так ДНКЖ/GSH теряет ингибирующие свойства в система гемоглобин – цистеин, гемоглобин – цитрат, гемоглобин – ЭДТА (табл. 1 (1)). ДНКЖ/Cys теряет способность ингибировать только в системах гемоглобин – цитрат и гемоглобин – ЭДТА (табл. 1 (2)). В случае добавления хелатора в отсутствие гемоглобина ДНКЖ сохраняли способность ингибировать каталазу, но теряли ее в системе, содержащей гемоглобин и более эффективный, чем прежде добавленный, хелатор железа. Так продукт, получаемый при инкубации ДНКЖ/GSH и цистеина терял ингибирующие свойства в системах гемоглобин – цитрат и гемоглобин – ЭДТА, а продукт, полученный в системе ДНКЖ/GSH+цитрат – только в системе гемоглобин + ЭДТА (табл. 1 (3 и 4)). Следовательно, в отсутствие гемоглобина под действием хелатора происходит не высвобождение NO с дальнейшим образованием нитрита, а образование нового комплекса с более мощным хелатором.

В гомогенате мышечных каркасов 1 дневных цыплят пул нитрозосоединений, практически, полностью представлен ДНКЖ с ингибирующими свойствами, аналогичными ДНКЖ/GSH (табл. 1 (5)).

Нитрит, не содержащий железа, не утрачивал ингибирующие свойства в системе ловушка NO – хелатор железа (табл. 1 (6)).

При окислении ДНКЖ/GSH пероксидазой [8], при воздействии на него видимого света [6], образуется не нитрит, а соединение, исходно не имеющее способности ингибировать каталазу, но приобретающее свойство

**Таблица 1.** Ингибирование каталазы S-нитрозотиолами и динитрозильными комплексами железа различного состава в присутствии ловушки NO (HbO<sub>2</sub>) и различных хелаторов железа\*

№	Соединение	Добавляемые реагенты					
		Контроль	HbO <sub>2</sub>	HbO <sub>2</sub> + GSH	HbO <sub>2</sub> + Cys	HbO <sub>2</sub> + цитрат	HbO <sub>2</sub> + ЭДТА
1	ДНКЖ/GSH	57,4 $\pm$ 2,1	58,2 $\pm$ 3,4	60,8 $\pm$ 4,3	101,3 $\pm$ 3,4	101,3 $\pm$ 3,4	101,3 $\pm$ 3,4
2	ДНКЖ/ Cys	56,8 $\pm$ 3,7	59,1 $\pm$ 2,9	58,9 $\pm$ 3,1	57,8 $\pm$ 3,8	102,2 $\pm$ 3,2	102,2 $\pm$ 3,2
3	ДНКЖ/GSH+Cys	58,1 $\pm$ 3,1	59,9 $\pm$ 4,0	59,9 $\pm$ 4,0	58,2 $\pm$ 4,2	99,4 $\pm$ 4,2	99,4 $\pm$ 4,2
4	ДНКЖ/GSH+цитрат	56,2 $\pm$ 3,7	57,2 $\pm$ 4,1	56,8 $\pm$ 3,9	58,1 $\pm$ 3,5	59,8 $\pm$ 3,9	100,8 $\pm$ 4,1
5	Гомогенат мышечного каркаса 1 дневного цыпленка**	56,4 $\pm$ 4,1	57,2 $\pm$ 3,8	58,3 $\pm$ 4,2	99,5 $\pm$ 3,7	99,5 $\pm$ 3,7	98,5 $\pm$ 3,7
6	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	56,3 $\pm$ 3,1	57,7 $\pm$ 4,2	55,6 $\pm$ 3,9	56,8 $\pm$ 4,2	57,9 $\pm$ 3,4	56,6 $\pm$ 3,9
7	Fe(NO) <sub>n</sub>	101,2 $\pm$ 5,1	99,8 $\pm$ 4,8	56,8 $\pm$ 3,7	58,7 $\pm$ 4,0	57,4 $\pm$ 4,1	57,9 $\pm$ 4,2
8	Fe(NO) <sub>n</sub> + GSH	56,2 $\pm$ 3,6	56,7 $\pm$ 3,7	58,3 $\pm$ 3,8	100,3 $\pm$ 4,2	98,5 $\pm$ 4,3	102,2 $\pm$ 4,9

\* В таблице приведены данные активности каталазы (%) в реакционной среде, содержащей исследуемые соединения и указанные реагенты. За 100% активность принималась активность фермента в реакционной среде в отсутствие исследуемых соединений.

\*\* Использовался гомогенат мышечного каркаса и печени в физиологическом растворе в концентрации 600 нг. ткани/мл.

**Таблица 2.** Концентрация доноров NO и нитрата в гомогенатах птичьих эмбрионов (мкМ) на пятые сутки инкубации. Влияние препаратов ДНКЖ/GSH и ДНКЖ/Cys, добавленных перед инкубацией. \*

№	Объект	RSNO	ДНКЖ	Fe(NO)n	RNO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
1.	Эмбрион породы мини-мясная + 0,3 мл физраствора	<0,1	<0,1	1,5±0,7	4,1±0,9	121,1 ± 5,1
2.	+0,3 мл 10,0 мМ р-ра ДНКЖ/GSH	<0,1	<0,1	5,8±1,3	7,6±0,7	177,9±8,8
3.	+0,3 мл 10,0 мМ р-ра ДНКЖ/Cys	<0,1	54,8±4,9	1,4±0,9	4,4±1,5	126,1±7,7
4.	+0,3 мл 10,0 мМ р-ра НКЖ/цитрат	<0,1	56,3±4,1	1,6±0,8	4,2±0,8	120,5±8,1
5.	Эмбрион породы Хайсекс белый + 0,3 мл физраствора	4,8±0,6	<0,1	12,5±2,6	128,3±6,1	<0,1
6.	+0,3 мл 10,0 мМ р-ра ДНКЖ/GSH	3,1±0,8	44,6±6,3	18,3±3,3	132,1±5,1	<0,1

\*Концентрация NO<sub>2</sub> + RNNO во всех образцах <0,1 мкМ.

ингибировать каталазу при добавлении хелаторов железа и теряет его в системе гемоглобин – более эффективный хелатор (табл. 1 (7, 8)). Такие соединения обнаружены нами в крови некоторых животных [6]. Так как мы не можем количественно определить состав этих соединений, но, очевидно, что они содержат NO-группу и железо, мы представляем их как Fe(NO)n.

В гомогенатах эмбрионов разных пород линий и кроссов птиц примерно одинаково общее содержание нитро- и нитрозосоединений, но различно соотношение доноров NO и нитрата. Так на пятые сутки инкубации в гомогенате эмбриона породы мини – мясная преобладает нитрат, а в составе нитро- и нитрозосоединений гомогената кросса Хайсекс белый преобладали соединения – доноры NO (табл. 2 (1 и 5)). Нами показано, что синтезируемый в эмбрионе оксид азота включается в состав соединений – доноров, но с вторых – третьих суток эти соединения в эмбрионах одних пород, линий и кроссов претерпевают окисление до нитрата, а в других накапливаются. Степень окисления NO коррелирует со скоростью постэмбрионального роста мышечной ткани [10]. ДНКЖ/GSH, экзогенно введенный в эмбрион мини – мясной породы до закладки на инкубацию, полностью окислился к пятым суткам до нитрата (табл. 2 (2)). Это видно по соотношению общего пула доноров NO (RSNO, ДНКЖ/SH, Fe(NO)n и RNO<sub>2</sub>) и нитрата. В то же время ДНКЖ/Cys и продукт взаимодействия ДНКЖ/GSH и цитрата (НКЖ/цитрат) не окислялись. Они сохранялись как соединения, теряющие ингибирующие свойства в системе гемоглобин – ЭДТА. Концентрация нитрата не увеличивалась (табл. 2 (3, 4)). Но в эмбрионе Хайсекс белый ДНКЖ/GSH к пятым суткам, практически, полностью сохранился как ДНКЖ. Концентрация нитрата не увеличилась (табл. 2 (6)).

В крови взрослых кур пул доноров NO представлен соединениями типа Fe (NO)n. Внутривенный ввод аргинина – субстрата NO – синтазы вызывал кратковременное увеличение их концентрации. При этом достоверного увеличения концентрации других соединений – доноров оксида азота зарегистрировано не было (табл. 3). Но кратковременное увеличение содержания Fe (NO)n вызывало кратковременное впадение животного в обморочное состояние, вызванное, по-видимому, снижением тонуса сосудов под действием NO. Под действием L-нитроаргинина (НА) происходило, наоборот, снижение содержания Fe (NO)n (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных данных следует, что оксид азота в живых тканях в свободном состоянии находится минимальное время. Он находится в составе соединений – доноров, в которые включается, по-видимому,

**Таблица 3.** Содержание доноров NO и нитрата в крови 7 месячных несушек Хайсекс белый. Влияние внутривенных введений аргинина, нитроаргинина (НА)\*

Вводимый препарат (0,5 мл)	Концентрация, мкМ					
	До ввода		Через 7 минут		Через 20 минут	
	Fe (NO)n	нитрат	Fe (NO)n	нитрат	Fe (NO)n	нитрат
ф-р	10,4±0,3	123,5±8,7	10,8±0,4	126,5±8,8	10,6±0,4	125,7±9,5
40 мМ НА	9,8±0,4	119,5±9,4	4,9±0,5	78,2±9,4	9,3±0,5	110,6±9,6
140 мМ аргинин	10,9±0,5	121,6±8,9	75,9±5,8	129,4±10,1	12,9±0,5	137,9±10,6

\* Концентрация RSNO, ДНКЖ, RNO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> + RNNO во всех образцах <0,1 мкМ

сразу после синтеза, что предохраняет его от окисления кислородом до нитрита. В норме большинство тканей содержит нитрит в концентрации не более 50 нМ (табл. 2). Резкая интенсификация синтеза NO в крови после ввода аргинина не сопровождалась ростом концентрации нитрита. Увеличивалась концентрация соединений – доноров NO (табл. 3).

Доноры NO спонтанно, практически, не диссоциируют с высвобождением NO. В модельной системе показана способность ДНКЖ, составляющих основной пул доноров NO в большинстве тканей [2,3], лишаться NO группы под действием хелаторов железа, сродство которых к нему превышает сродство лигандов, находящихся в составе комплекса, если в системе присутствует ловушка NO: гемоглобин (табл. 1). Это следует из факта утраты способности ингибировать каталазу в такой системе. В случае, если ловушки нет, образуется комплекс, который не лишается способности ингибировать фермент, то есть NO – группа существует и доступна для каталазы (табл. 1). Образовавшийся комплекс теряет способность ингибировать в системе ловушка NO – хелатор, имеющий еще большее сродство к железу (табл.1). То есть комплекс сохранил NO – группу и железо. В реакционной среде после добавления хелатора к комплексу не появляется нитрит. Следовательно, происходит перестройка комплекса без выхода, или с минимальным, по времени, выходом NO в окружающую среду. NO – группа способна перейти на мишень, имеющую к ней химическое сродство, в момент ослабления ее связи с железом. Последнее происходит в момент перестройки комплекса под действием хелатора железа. Заметим, что игра хелаторов типа глутатион - цистеин вполне может иметь место в условиях *in vivo*. Мы предполагаем, что в роли хелаторов – конкурентов могут выступать части апофермента тех энзимов, на которые оказывает воздействие NO: гуанилат – циклаза [7, 11], каспаза [12-14]. Переход оксида азота через биологические мембраны может осуществляться путем такого же взаимодействия со структурой, выполняющей функцию переносчика.

Нитрозотиолы не теряют ингибирующие свойства при инкубации с гемоглобином. Но при добавлении железа они приобретают все свойства ДНКЖ, поскольку трансформируются в динитрозильные комплексы железа [6, 8]. Высокомолекулярные нитросоединения типа нитроглицерина, нитротирозина ( $RNO_2$ ) приобретают свойства ДНКЖ под воздействием железа и тиолов [6, 15, 16]. Показано, что физиологическая эффективность соединений – доноров NO зависит от концентрации железа в тканях [14]. Это тоже говорит о том, что структурой, взаимодействующей с физиологической мишенью, является ДНКЖ.

Таким образом, физиологическая эффективность соединений – доноров NO зависит прежде всего от наличия физиологических мишеней NO, или их состояния. Не NO случайно находит мишень, а мишень, взаимодействует с донором – NO, вызывая его деструкцию и присоединяя NO. Это продемонстрировано на куриных эмбрионах. В таблице 2 представлены данные о концентрации доноров NO и нитрата в гомогенатах эмбрионов кур породы мини – мясная и кросса Хайсекс белый. Экзогенно введенный перед закладкой на инкубацию ДНКЖ/GSH, практически, не окислялся в эмбрионе кросса Хайсекс белый и, практически, полностью окислялся до нитрата в эмбрионе кросса Смена 8. В то же время ДНКЖ/Cys не окислялся, а сохранился в виде ДНКЖ/SH. Следовательно, какой-то физиологический эффект NO в составе ДНКЖ/Cys в данном случае производить не может. По-видимому, комплекс, имеющий лиганды с высоким сродством к железу, труднее поддается деструкции, необходимой для передачи NO на мишень. ДНКЖ, содержащиеся в гомогенате тканей цыпленка, по способности терять способность ингибировать в системе ловушка – хелатор, соответствуют ДНКЖ/GSH, но не ДНКЖ/Cys (табл.1).

С этой точки зрения интерес представляет комплекс, не содержащий тиоловых лигандов  $Fe(NO)_n$ . Он исходно не способен ингибировать каталазу, но при добавлении указанных в таблице 1 хелаторов железа приобретает способность ингибировать, аналогичную ДНКЖ с соответствующими лигандами. Следовательно, комплекс исходно содержит железо и NO – группы. В дистиллированной воде этот комплекс быстро распадается, но в фосфатном буфере, а также в живых тканях относительно стабилен [6]. По-видимому, для его существования необходимы какие-то лиганды железа, пусть и с относительно низким сродством к нему.

Комплексы типа  $Fe(NO)_n$  были обнаружены нами в крови птиц. Там они составляют основу пула доноров NO. Их концентрация достигает нескольких мкМ (табл.3). При резкой интенсификации синтеза NO, вызванной введением субстрата его синтеза аргинина наблюдается резкое увеличение концентрации  $Fe(NO)_n$  (табл.3). Заметим, что внутриклеточный пул доноров NO представлен, преимущественно, ДНКЖ, имеющими ингибирующие свойства ДНКЖ/GSH (табл.1). Вполне возможно, что соединения типа  $Fe(NO)_n$ , проникая в клетки, где содержится глутатион в концентрации нескольких мМ [17], превращаются в ДНКЖ, содержащие тиоловые лиганды и способные взаимодействовать с физиологическими мишенями NO. Сами  $Fe(NO)_n$ , исходя из предложенного нами механизма взаимодействия NO с мишенью, не могут осуществлять такое взаимодействие (табл. 1).

Таким образом, не NO случайно находит мишень, а мишень, взаимодействует с донором – NO, вызывая его деструкцию и присоединяя NO. Так может обеспечиваться специфичность физиологического воздействия NO. Спонтанно соединения – доноры NO, практически, не диссоциируют с образованием свободного NO. Этим обеспечивается защита от образования токсичного нитрита. Также эффективность ДНКЖ как основного донора NO зависит от состава комплекса. Комплекс, содержащий лиганды с высоким сродством к железу, труднее разрушается хелатором железа, что необходимо для переноса NO к мишени.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 20-016-00204-а.*

**Список литературы / References:**

1. Vanin A., Borodulin R., Mikoyan V. Dinitrosyl iron complexes with natural thiol-containing ligands in aqueous solutions: Synthesis and some physico-chemical characteristics (A methodological review). *Nitric Oxide*, 2017, vol. 66, pp. 1-9. doi: 10.1016/j.niox.2017.02.005.
2. Vanin A. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a "working form" of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*, 2016, vol. 54, pp. 15-29. doi: 10.1016/j.niox.2016.01.006
3. Hickok J.R., Sahni S., Shen H., Arvind A., Antoniou C., Fung L.W., Thomas D. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: biological parameters of assembly and disappearance. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, vol. 51, no. 8, pp. 1558-1566. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.030
4. Tarpey M., Wink D., Grisham M., Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2004, vol. 286, pp. R431-R444. doi:10.1152/ajpregu.00361.2003.
5. Titov V., Osipov A. Nitrite and Nitroso Compounds can serve as Specific Catalase Inhibitors. *Redox Rep*, 2017, vol. 22, no. 2, pp. 91-97. doi: 10.1080/13510002.2016.1168589.
6. Titov V. The Enzymatic Technologies Open New Possibilities for Studying Nitric Oxide (NO) Metabolism in Living Systems. *Current Enzyme Inhibition*, 2011, vol. 7, no. 1, pp. 56-70. doi: 10.2174/157340811795713774.
7. Severina I., Bussygina O., Pyatakova N., Malenkova I., Vanin A. Activation of soluble guanylate cyclase by NO donors--S-nitrosothiols, and dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*, 2003, vol. 8, pp. 155-163. doi: 10.1016/s1089-8603(03)00002-8
8. Titov V.Y., Kosenko O.V., Starkova E.S., Kondratov G.V., Borkhunova E.N., Petrov V.A., Osipov A.N. Enzymatic Sensor Detects Some Forms of Nitric Oxide Donors Undetectable by Other Methods in Living Tissues. *Bull Exp Biol Med.*, 2016, vol. 162, no. 1, pp. 107-110. doi: 10.1007/s10517-016-3557-1.
9. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Петров В.А., Владимиров Ю.А. Механизм окисления оксигемоглобина, индуцированного перекисью водорода. *Бюлл. экспер. биол. мед.*, 1991, том 112, № 7, с. 46-49.  
[Titov V., Petrenko Yu., Petrov V., Vladimirov Yu. Mechanism of oxyhemoglobin oxidation induced by hydrogen peroxide. *Biull Eksp Biol Med.*, 1991, vol. 112, no. 7, pp. 46-49. (In Russ)]
10. Titov V., Dolgorukova A., Fisinin V., Borkhunova Ye., Kondratov G., Slesarenko N., Kochish I. The role of nitric oxide (NO) in the body growth rate of birds. *World Poultry Science Journal*, 2018, vol. 74, pp. 675-686. doi: org/10.1017/S0043933918000661
11. Stalmer J., Singel D., Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 1992, vol. 258, pp. 1898-1902. doi: 10.1126/science.1281928.
12. Rossig L., Fichtlscherer B., Breitschopf K., Haendeler J., Zeiher A., Mulsch A., Dimmeler S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, no. 11, p.6823-6826. doi: 10.1074/jbc.274.11.6823.
13. Dimmeler S., Haendeler J., Nehls, M., Zeiher A. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 185, no. 4, pp. 601-607. doi: 10.1084/jem.185.4.601.
14. Kim Y-M., Chung H-T., Simmons R., Billiar T. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, no. 15, pp. 10954-10961. doi: 10.1074/jbc.275.15.10954.
15. Schopfer F., Baker P., Giles G., Chumley Ph., Batthyany C., Crawford J., Patel R., Hogg N., Branchaud B., Lancaster J., Freeman B. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, no. 19, pp. 19289-19297. doi: 10.1074/jbc.M414689200
16. Lima E., Bonini M., Augusto O., Barbeiro H., Souza H., Abdalla D. Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic. Biol. & Med.*, 2005, vol. 39, no. 4, pp. 532-539. doi: 10.1016/j.freeradbiomed
17. Forman H., Zhang H., Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.*, 2009, vol. 30, no. 1-2, pp. 1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006

## PROPOSED MECHANISM OF REGULATION OF THE PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF NITRIC OXIDE

Titov V.Yu.<sup>1,2</sup>, Osipov A.N.<sup>1</sup>, Kochish I.I.<sup>2</sup><sup>1</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University  
Ostrovityanova str. 1, Moscow, 117997, Russia; e-mail: vtitov43@yandex.ru<sup>2</sup>Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA n. a. K.I. Skryabin  
Scryabina str. 23, Moscow, 109472, Russia; e-mail: kochish\_i@mail.ru

**Abstract.** By means of highly sensitive and specific enzyme sensor it was shown, that most of living tissues contain less than 50-100 nM of nitrite and nitrosamines and up to tens of  $\mu\text{M}$  of NO donors – S-nitrosothiols (RSNO), dinitrosyl iron complexes (DNIC) and high molecular weight nitrocompounds, that can turn to DNIC ( $\text{RNO}_2$ ). This fact means that living tissues can prevent NO oxidation to produce toxic compounds. NO donors – are stable compounds and they are not spontaneously decomposed with free NO release. The main pool of NO donors in most tissues is represented by DNIC. NO can transfer from the complex to the target at the moment of the complex destruction under the action of more effective iron chelators than the ligands of the DNIC. The transition is carried out with a minimum stay of NO in the free state. If the complex is exposed to an effective iron chelator, but there is no target, an iron-nitrosyl complex containing this chelator is formed. We assume, that some parts of the apoenzymes of NO targets can play the role of competitive chelators. Therefore, the physiological effect of NO donors depend not on their ability to produce free NO, but on the presence and characteristics of the physiological target. Not free NO accidentally finds the target, but the target, interacts with the NO donor causing its destruction and attaching NO. The effectiveness of DNIC as NO donor also depends on the DNIC structure and the ligand type. DNIC containing ligands with a high affinity for iron is more difficult to destroy by an iron chelator, which is necessary for the transfer of NO to the target. These effects were demonstrated both in model systems and living organisms.

**Key words:** nitric oxide, dinitrosyl iron complexes (DNIC), DNIC ligands.