

ОКСИД АЗОТА – ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЛОВУШКА АФК. ВОЗМОЖНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

Титов В.Ю.^{1,2,3}, Осипов А.Н.¹, Ананкина А.А.¹, Кочич И.И.²

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова
ул. Островитянова, 1с7, г. Москва, 117513, РФ; e-mail: vtitov43@yandex.ru

² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина
ул. Академика Скрябина, 23, г. Москва, РФ

³ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН
ул. Птицеградская, 10, г. Сергиев Посад, Московская область, РФ
Поступила в редакцию 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0607

Аннотация. Показано, что в норме нитрит присутствует в большинстве тканей в концентрации, не превышающей 50 нМ. Но ткани содержат десятки микромоляр соединений – доноров NO. Следовательно, в тканях есть механизмы, предотвращающие окисление NO до нитрита. Соединения-доноры NO спонтанно не распадаются с высвобождением NO. Трансформация NO, включенного в состав соединений доноров, до нитрита и нетиолатных нитрозосоединений ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) происходит под действием активных форм кислорода (АФК) и, прежде всего, супероксида (O_2^-). Последний продуцируется активированными фагоцитами. Таким образом, содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ – очень чувствительный показатель активации фагоцитов – процесса, сопровождающего любое воспаление. В данной работе рассмотрена возможность использования показателя содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ для ранней диагностики заболеваний, носящих воспалительный характер. Показано, что этот показатель обладает большей чувствительностью и специфичностью, чем все известные клинические и биохимические показатели. Это делает его особенно ценным для контроля состояния больных в стационаре, контроля состояния сельскохозяйственных животных. Фактором, ограничивающим использование показателя $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в диагностике является проницаемость тканевых барьеров для этих соединений. Это особенно актуально для контроля состояния плода, а также состояния центральной нервной системы.

Ключевые слова: оксид азота (NO), нитрит и нетиолатные нитрозосоединения ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$), фагоциты, воспаление.

ВВЕДЕНИЕ

Показано, что супероксид (O_2^-) эффективно взаимодействует с оксидом азота (NO), находящимся как в свободной форме, так и в составе соединений – доноров NO: нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [1-3]. Константа скорости – не менее $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [1]. Регистрация продуктов метаболизма NO в живых тканях затруднена тем, что используемые в настоящее время методы имеют либо относительно низкую чувствительность (фотометрические, ЭПР), либо высокую чувствительность, но низкую специфичность (хемилюминесцентный). Кроме того, все эти методы требуют очистку и подготовку образца. В частности, взаимодействия со специфическим реагентом, что требует кислой среды, в которой соединения-доноры NO распадаются и могут быть определены как нитрит [4,5]. Нами разработан ферментный сенсор, основанный на обратимом ингибировании фермента каталазы нитритом и нитрозосоединениями и утрате ими способности ингибировать под действием ряда веществ, специфичных для каждой группы этих соединений. Мы предполагаем, что непосредственным ингибитором является группа NO^+ , которую эти соединения либо имеют исходно, либо приобретают при взаимодействии с апоферментом [6,7]. Ингибирующий эффект усиливается на два порядка в присутствии хлорида в плазменной концентрации, а также бромида и тиоцианата. Способность ингибировать утрачивается в присутствии ловушки NO (гемоглобина) и ряда соединений, специфичных для каждой группы нитрозосоединений [6,7]. Сенсор позволяет оперативно, без какой-либо подготовки объекта, определить концентрации RSNO, ДНКЖ, а также нитрита (NO_2^-), нетиолатных нитрозосоединений (RNO), высокомолекулярных нитрозосоединений, способных трансформироваться в ДНКЖ (RNO_2) с точностью до 50 нМ [6,7]. При помощи него установлено, что конечные продукты взаимодействия супероксида и соединений – доноров NO (RSNO, ДНКЖ) в физиологических условиях представлены нитритом (NO_2^-) и нетиолатными нитрозосоединениями (RNO). В отсутствие активных форм кислорода (АФК) соединения – доноры NO не продуцируют NO_2^- и RNO, поскольку спонтанно не распадаются с высвобождением NO, который мог бы быть окислен кислородом до нитрита [8]. Нитрит и RNO появляются в крови под действием активатора фагоцитов зимозана. СОД предотвращала их появление. В связи со сравнительно высокой концентрацией доноров NO в тканях, равной десяткам микромоляр, и высокой константе скорости их взаимодействия с O_2^- , у доноров NO в тканях нет эффективных конкурентов за супероксид [5].

В норме $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ присутствуют в большинстве тканей в суммарной концентрации, не превышающей 50 нМ [2]. Но во всех случаях клинически идентифицированного воспаления наблюдается появление в плазме $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [9]. Более того, они появлялись задолго до наступления клинических признаков и изменения биохимических показателей, что делает показатель содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ одним из наиболее чувствительных

для ранней диагностики воспаления. И одним из наиболее специфичных: если концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в плазме выше 150 нМ, то однозначно имеет место активация фагоцитов как обязательное звено процесса воспаления. Неактивированные фагоциты не продуцируют супероксид, и содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в связи с этим минимально.

В связи с этим возникают следующие вопросы: можно ли по концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ судить о тяжести процесса, и, возможно ли по содержанию $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ диагностировать воспаление, носящее локальный характер и не приводящее к генерализованной активации фагоцитов. Это особенно касается контроля за состоянием плода.

В данной статье проведено исследование возможностей использования показателя концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ для диагностики воспалительных заболеваний, в том числе и носящих локальный характер.

МЕТОДИКА

В экспериментах использовался однозамещенный фосфат калия, цитрат калия, хлорид натрия, трилон Б, пероксид водорода "Лаверна" (Россия), каталаза, нитрит калия, глутатион, L-аргинин, L-нитроаргинин (НА), гемоглобин "Sigma" (США).

Для определения содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ у больных отбиралась кровь в количестве 2 мл. Для предотвращения свертывания крови использован раствор гепарина – 0,1 мл 1% раствора на 10 мл крови. Плазму получали путём центрифугирования образцов на центрифуге ЦУМ-1 при скорости 3000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант отделяли от эритроцитов и использовали для определения содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [3,6,9].

Для определения содержания нитро- и нитрозосоединений использовался ферментный сенсор. Он основан на уникальной способности нитрита и других нитрозосоединений, имеющих в составе NO^+ - 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 [6,7].

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. [6,7].

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) теряют ингибирующую способность в среде, содержащей хелатор железа (ЭДТА) и ловушку NO (гемоглобин). Именно по этому свойству судили о их наличии и концентрации. Ингибирование каталазы в присутствии хлорида говорит о наличии NO^+ - группы. Эффект хелаторов железа – о связи нитрозо – группы с железом [6,7]. Известно, что S-нитрозотиолы (RSNO) трансформируются в ДНКЖ под воздействием закисного железа [10]. 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 [6,7]. S-нитрозотиолы определялись как соединения, трансформирующиеся в ДНКЖ под воздействием закисного железа и тиолов и приобретающие их свойства. Нитрит (NO_2^-) и нитрозоамины ($\text{R}_1\text{R}_2\text{NNO}$), практически, не продуцируют ДНКЖ в нейтральной среде и сохраняют ингибирующие способности при последовательном добавлении гемоглобина, закисного железа, глутатиона и ЭДТА. Их совокупное определение основано на этих свойствах [6,7]. Нитрозильные комплексы железа, не содержащие лиганды, кроме NO, либо содержащие таковые, но с очень низкой константой связывания ($\text{Fe}(\text{NO})_n$), определялись как соединения, исходно лишённые свойства ингибировать каталазу, но приобретающие ингибирующие свойства ДНКЖ после добавления глутатиона в реакционную среду [6,7]. Высокомолекулярные нитрозосоединения, способные трансформироваться в ДНКЖ (RNO_2), определялись как соединения, приобретающие ингибирующие свойства ДНКЖ под воздействием закисного железа и глутатиона [6,7]. Для определения общего пула нитрозосоединений 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 – 50нМ [6,7].

Концентрация гемоглобина также определялась спектрофотометрически, используя $\epsilon_{540} = 1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [7].

В экспериментах использовались образцы крови и цереброспинальной жидкости, полученная от больных на кафедрах хирургии, неврологии, акушерства и гинекологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова. Диагностика преждевременного разрыва плодных оболочек (ППРО) осуществлялась с помощью теста на подтекание околоплодных вод – AmniSure ROM Test, основанного на выявлении во влагалищном содержимом плацентарного альфа-1-микроглобулина, присутствующего в норме только в околоплодных водах [11]. Для контроля воспалительных процессов определяли С-реактивный белок, используя иммуноферментный метод для количественного определения *in vitro* С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови человека. Использован также показатель числа лейкоцитов.

Диагноз ишемический инсульт (ИИ), локализация и объем поражения устанавливались на основании клинической картины и подтверждались результатами КТ или МРТ головного мозга. В контрольную группу входили больные, у которых диагноз ИИ не подтвердился.

Гомогенаты эмбрионов на 14 сутки получали путем обработки содержимого яйца без скорлупы в измельчителе тканей «Oster» (Мексика).

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), ЭДТА – 0,5 мМ; гемоглобина (HbO₂) – 100 мкМ; FeSO₄ – 100 мкМ. 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 яйца препаратов использовался стерильный физиологический раствор. 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: отставание 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%-ный раствор цитрата натрия. Препараты вводились также в подкрыльцовую вену.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлены данные о содержании нитро- и нитрозосоединений в различных тканях человека и животных. Во всех случаях концентрация нитрита и нитрилатных нитрозосоединений (NO₂⁻ + RNO) ниже детектируемой. Концентрация доноров NO (RSNO, ДНКЖ, Fe(NO)_n, RNO₂) достигает десятков и сотен мкМ. Но даже в объектах с очень высокой концентрацией соединений-доноров NO, таких как амниотическая жидкость курицы и коровы, кровь куриного эмбриона, концентрация NO₂⁻ + RNO ниже 0,05 мкМ. Внутривенное введение аргинина – субстрата синтеза NO, способствовало увеличению концентрации доноров NO в крови курицы в 6 раз в течении 5 минут. Но это не приводило к увеличению концентрации NO₂⁻ + RNO. Применение нитро-аргинина – блокатора NO-синтазы наоборот снижало концентрацию соединений-доноров NO. Но это опять-таки не сказывается на их соотношении и на концентрации NO₂⁻ + RNO (табл. 1).

Эти соединения появляются под действием активатора фагоцитов зимозана при наличии последних. Причем, появление NO₂⁻ + RNO сопряжено с пропорциональным снижением концентрации соединений – доноров NO (табл. 2).

Супероксиддисмутаза (СОД) предотвращает появление NO₂⁻ + RNO. Следовательно, причиной появления этих соединений является супероксид, продуцируемый активированными фагоцитами. Супероксид взаимодействует с соединениями – донорами NO, что приводит к образованию NO₂⁻ + RNO [1,2].

Таблица 1. Концентрация нитро- и нитрозосоединений (мкМ), в тканях человека и животных (n=5)

ткань	RSNO	ДНКЖ	Fe-(NO) _n	RNO ₂	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻ + RNO
Кровь человека	<0,05	18,7±6,9	<0,05	<0,05	69,4±28,2	<0,05
Спинномозговая жидкость человека	<0,05	14,1±6,1	<0,05	<0,05	61,1±22,3	<0,05
Амниотическая жидкость куриного эмбриона кросса Хайсекс белый	31,3±4,1	<0,05	550±33	5150±450	<0,05	<0,05
Амниотическая жидкость коровы	25,1±0,8	<0,05	183,5±39,6	2600±450	<0,05	<0,05
Кровь 18 суточного куриного эмбриона	89,7±17,5	<0,05	980±19	14200±1500	450,4±21,6	<0,05
Кровь курицы	<0,05	<0,05	12,4±0,8	<0,05	141,5±11,3	<0,05
Кровь курицы через 5 минут после внутривенного ввода аргинина (14,0 мг/кг)	<0,05	<0,05	71,2±2,4	<0,05	159,3±12,4	<0,05
Кровь курицы через 5 минут после внутривенного ввода нитроаргинина (2,0 мг/кг)	<0,05	<0,05	5,8±0,5	<0,05	118,3±10,9	<0,05

Таблица 2. Изменение концентрации метаболитов NO (мкМ) в плазме крови под действием зимозана. Влияние СОД

Объект	ДНКЖ	Fe-(NO) _n	NO ₂ ⁻ + RNO
Плазма человека	14,7±1,9	<0,05	<0,05
+зимозан (0,2 мг/мл)	4,3±0,4	<0,05	10,8±0,9
+зимозан (0,2 мг/мл)+40 мкМ СОД	15,3±1,8	<0,05	<0,05
Плазма курицы	<0,05	16,2±0,8	<0,05
+зимозан (0,2 мг/мл)	<0,05	1,9±0,2	13,9±0,9
+зимозан (0,2 мг/мл)+40 мкМ СОД	<0,05	15,9±0,8	<0,05
Плазма курицы, отцентрифугированная до 500 клеток/мм ³ +зимозан (0,2 мг/мл)	<0,05	10,1±0,4	5,7±0,6
Плазма курицы, отцентрифугированная до 200 клеток/мм ³ +зимозан (0,2 мг/мл)	<0,05	16,3±0,8	<0,05

В случаях воспалительных заболеваний в крови человека и животных появляются NO₂⁻ + RNO (табл. 3). Эти соединения образуются также в инкубируемом курином яйце, у которого 75% поверхности закрыто скотчем. То есть эмбрион испытывает гипоксию. Вначале это привело к некоторому увеличению концентрации соединений-доноров NO, что, по-видимому, связано с интенсификацией синтеза NO. Затем, через три часа, имело место появление NO₂⁻ + RNO, но общая концентрация нитро- и нитрозосоединений не возросла. Следовательно, появление NO₂⁻ + RNO обусловлено не интенсификацией синтеза NO, а, по-видимому, активацией оксидаз, продуцирующих супероксид.

Таким образом, мы имеем основание предположить, что появление NO₂⁻ + RNO в живых тканях есть следствие продукции супероксида. Но зафиксировать NO₂⁻ + RNO в тканях значительно легче, чем O₂⁻, хотя бы потому, что они относительно долгоживущие. В таблице 4 представлены данные о содержании NO₂⁻ + RNO в плазме крови здоровых беременных и с диагностированным преждевременным разрывом плодных оболочек (ПРПО). В контрольной группе повышенное содержание NO₂⁻ + RNO имело место у 9 из 39 пациенток. Во всех

Таблица 3. Концентрация доноров NO, нитрита и нетиолатных нитрозосоединений (NO₂⁻ + RNO) человека и животных при воспалительных заболеваниях (мкМ)

Объект	Доноры NO (RSNO+ДНКЖ+Fe(NO) _n +RNO ₂)	NO ₂ ⁻ + RNO
Плазма здорового человека (n=4)	8,7±1,7	<0,05
Плазма человека, больного аппендицитом (n=4)	1,2±0,2	4,1±0,4
Плазма человека, больного ОРЗ (n=15)	9,3±1,8	0,9±0,3
Молоко здоровой коровы (n=4)	8,8±1,6	<0,05
Молоко коровы, больной маститом (n=4)	1,1±0,4	5,8±0,4
Гомогенат 12 суточного куриного эмбриона (n=4)	360,9±18,8	<0,05
Гомогенат 12 суточного куриного эмбриона через 1 ч. после закрытия 75% поверхности яйца (n=4)*	413,7±22,3	<0,05
То же через 3,5 часа после закрытия 75% поверхности яйца (n=4)	418,1±23,1	14,6±1,9

* Поверхность яйца закрывалась скотчем.

Таблица 4. Частота встречаемости значений концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$, содержания СРБ, и числа лейкоцитов в венозной крови беременных в норме и при ПРПО

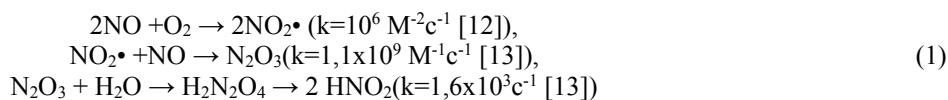
Показатели	Нормальная беременность	ПРПО
($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) мкМ		
<0,15	30 (77%)	0
>0,15	9 (23%)	60 (100%)
СРБ, мг/л (норма до 6,0)		
<6,0	36	54
>6,0	3	4
Лейкоциты, тыс /мм ³ (норма: 4-9)		
<9,0	17	19
>9,0	22	41

случаях ПРПО имело место значительная, от сотен нМ до нескольких мкМ, концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в плазме. Антибактериальная терапия способствовала нормализации этого показателя (табл. 5). Следовательно, появления $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ связано с процессом инфекционного характера. Но это повышение концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ не сопровождалось какими-либо клиническими признаками воспалительного процесса. Концентрация С реактивного белка лишь в 10% случаев была выше нормы. В таком же проценте случаев этот показатель был выше нормы в группе здоровых. Причем в эту группу отбирались пациентки без каких-либо диагностированных воспалительных заболеваний. Содержание лейкоцитов также не являлось информативным показателем, поскольку в случае ПРПО у 41 из 60 пациенток было повышенное их содержание, а в контрольной группе у 22 из 39.

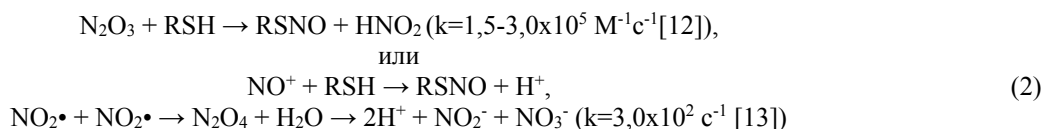
Таким образом содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ – самый чувствительный показатель ранней стадии воспаления, так как по сути является индикатором активации фагоцитов. И в тоже время самый специфичный, поскольку продуцироваться $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в тканях могут под действием супероксида, а последний продуцируется активированными фагоцитами. Но если речь идет о диагностическом показателе, то всякий ли воспалительный процесс возможно контролировать по содержанию $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$? Обязательно ли любое воспаление отразится на содержании $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в плазме крови? В таблице 6 представлены данные о содержании $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и плазме крови больных с диагностированным ишемическим инсультом (ИИ). Во всех случаях диагностированного инсульта ЦСЖ содержало $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в концентрации 0,2-1,0 мкМ. Но плазма крови таких больных содержала $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ только в 22% случаев. То есть возможна ситуация, когда $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ присутствуют в ЦСЖ, но не присутствуют в плазме.

ОБСУЖДЕНИЕ

Очевидно, что если синтезированный из аргинина NO будет находиться в свободном состоянии длительное время, то он либо будет окислен, преимущественно, до нитрита кислородом, либо свяжется с тиоловой группой. Это следует из величин констант процессов, имеющих место в системе оксид азота - кислород:



Либо вступит во взаимодействие с любой SH-группой:



Считается, что соединения – доноры NO (RSNO, ДНКЖ) продлевают время жизни NO, предохраняя от окисления кислородом [10,14,15]. Но если эти соединения будут спонтанно распадаться с высвобождением NO, то никакого предохранения NO от окисления и обеспечения специфичности его воздействия не будет. В наших работах показано, что соединения – доноры NO: RSNO, ДНКЖ, Fe(NO)_n, практически, не продуцируют NO спонтанно. Это следует из того, что они могут часами инкубироваться в среде, содержащей ловушку NO: гемоглобин, сульфониловую кислоту, но не теряя специфический галоид-зависимый ингибирующий эффект,

Таблица 5. Влияние антибактериальной терапии на концентрацию $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в плазме крови пациенток с ПРПО

№ пациентки	$\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ (мкМ) до начала антибактериальной терапии	применяемый препарат	$\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ (мкМ) после 7 суток проведения антибактериальной терапии
1.	1,4±0,2	7 сут., цефазолин,	<0,05
2.	4,4±0,4	11 сут, цефтриаксон	0,2±0,1
3.	0,9±0,2	7 сут. амоксилав	<0,05
4.	1,8±0,3	8 сут, цефтриаксон	1,3±0,2
5.	2,5±0,3	7 сут., фортум, клофабрин	0,6±0,2
6.	2,3±0,4	6 сут, цефтриаксон	<0,05
7.	4,8±0,4	7 сут, цефтриаксон	<0,05
8.	1,7±0,3	8 сут. амоксилав	<0,05

связанный с наличием группы NO^+ . При этом они могут претерпевать изменения в спектральных и ЭПР характеристиках, но не теряя способности галоид-зависимо ингибировать каталазу [7]. Так ДНКЖ под действием видимого света сначала приобретают свойства $\text{Fe}(\text{NO})_n$, затем свойства RNO_2 . При инкубации в темноте эти процессы шли медленнее. ЭПР-свойства утрачивались с утратой ингибирующих свойств, присущих ДНКЖ [16]. Но это не означало потери комплексом группы NO .

GSNO под действием света трансформировался в соединение со свойствами RNO_2 [16].

В системе пероксидаза – H_2O_2 ДНКЖ трансформировался в соединение со свойствами $\text{Fe}(\text{NO})_n$, а GSNO – до соединения со свойствами RNO_2 . Нитрит в такой системе окислялся до нитрата [17]. То есть и здесь отсутствует высвобождение NO в окружающую среду из соединений – доноров.

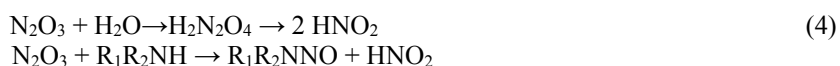
Несмотря на то, что растворы ДНКЖ, $\text{Fe}(\text{NO})_n$ и RSNO продуцируют окрашенный продукт при инкубации с реактивом Грисса, их воздействие на каталазу говорит о том, что они не содержат нитрит в количестве равном порогу чувствительности метода. Реакция с реактивом Грисса, по-видимому, обусловлена распадом соединений-доноров в кислой среде [3,7].

Утрата ингибирующих свойств ДНКЖ/SH имела место в системе, содержащей ловушку NO (гемоглобин, сульфониловую кислоту) и хелатор железа, разрушающий комплекс [7]. Предполагается, что роль такого хелатора могут играть части апофермента физиологической мишени NO . Это дает возможность NO перейти на мишень с минимальным пребыванием в свободном состоянии. Так может достигаться и специфичность воздействия предохранения от окисления [8].

В то же время инкубация соединений - доноров NO с активированными лейкоцитами приводит к трансформации ДНКЖ, $\text{Fe}(\text{NO})_n$ и RSNO в соединения с ингибирующими свойствами, характерными для нитрита и нитрозоаминов. СОД предотвращала этот процесс. Достаточно 500 активированных фагоцитов на микролитр крови, чтобы обеспечить трансформацию 30% содержащихся в плазме доноров NO до $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ (таблица 2). Можно предположить, что в данном случае супероксид взаимодействует непосредственно с группой $\text{NO}(\text{NO}^+)$. Присутствие в системе ДНКЖ/SH – лейкоциты – зимозан тирозина приводило к тому, что вместо $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ образовывался продукт с ингибирующими свойствами RNO_2 . По-видимому, нитротирозин [7]. По-видимому, сначала образуется пероксинитрит, который затем может распасться до $\text{NO}_2^\bullet + \text{OH}^\bullet$:



Поскольку плазма содержит относительно мало SH-групп, по сравнению с внутриклеточной средой, где концентрация только глутатиона достигает нескольких миллимоль, N_2O_3 либо подвергается гидролизу с образованием нитрита, либо образуют нетиолатные нитрозосоединения (RNO), прежде всего нитрозоамины. Сравнивая данные теста Грисса и ферментного сенсора, мы пришли к выводу, что в большинстве тканей нетиолатные нитрозосоединения составляют не менее половины конечных продуктов взаимодействия супероксида с донорами NO [9]:



То есть появление $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в большинстве тканей может быть результатом продукции супероксида. Он может продуцироваться при активации НАДФН-оксидазы фагоцитов, а также некоторых других оксидаз [9]. Как

Таблица 6. Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в ЦСЖ и плазме крови больных с диагностированным ИИ

Группы	ЦСЖ, мкМ*	Кровь, мкМ*	Число больных (%)
К	<0,15	<0,15	6 (100)
		>0,15	0
	>0,15	<0,15	0
		>0,15	
ИИ	<0,15	<0,15	0
		>0,15	
	>0,1(0,3-1,8)	<0,15	18 (78)
		>0,1 (0,2-1,0)	5 (22)

*В скобках дан диапазон значений концентрации (мкМ), имеющий место у пациентов.

следует из наших данных, всякое заболевание, сопровождаемое воспалительным процессом, приводит к появлению $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [9]. Воспалительный процесс сопровождается активацией фагоцитов, а, следовательно, активацией НАДФН-оксидазы [18]. А активация фагоцитов – одна из начальных стадий любого воспалительного процесса. Нами измерены пробы плазмы от нескольких сот больных. В наших исследованиях не было ни одного случая, чтобы при наличии клинических признаков воспаления концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ была ниже 0,1 мкМ. Наоборот, $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ появлялись до проявления клинических и биохимических признаков воспаления [3,9].

Как следует из данных, приведенных в таблице 4, во всех случаях клинически диагностированного ПРПО имело место появление $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в крови матери. Антибактериальная терапия приводила к нормализации этого показателя (табл. 5). Это означает, что появление $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ связано с бактериальным инфицированием. Но показатели содержания С-реактивного белка и числа лейкоцитов не были информативными (табл. 4). Никаких клинических признаков воспалительного процесса у пациенток не наблюдалось. Показатель $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$, таким образом, является очень чувствительным и специфичным критерием ранней диагностики воспаления. Если концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в крови выше 0,15 мкМ, то однозначно можно констатировать наличие воспалительного процесса [9].

Но есть два вопроса касательно возможности использования этого показателя в диагностике. Во-первых, можно ли по концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ судить о тяжести процесса? И второй – возможно ли по концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ судить о локальных воспалительных процессах? Прежде всего, $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в большинстве тканей – результат трансформации соединений – доноров NO. Поэтому концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ лимитируется с одной стороны исходной концентрацией соединений – доноров NO, а с другой стороны – интенсивностью продукции супероксида, которая, в свою очередь, зависит от концентрации лейкоцитов. Поэтому самым ценным показателем является само появление $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в концентрации выше 0,15 мкМ [9].

В случае диагностированного ишемического инсульта $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ во всех случаях появляется в спинномозговой жидкости, но не во всех – в крови (табл. 6). Также показано, что в содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в материнской крови и в крови из пуповины не всегда одинаково [19]. Следовательно, существуют тканевые барьеры, которые непроницаемы для $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$.

Таким образом, онцентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ является одним из наиболее чувствительных индикаторов активации лейкоцитов, а, следовательно, ранних стадий воспаления. Высокая чувствительность обусловлена тем, что продуцироваться $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в тканях могут только под действием активных форм кислорода и, прежде всего, супероксида. А последний в плазму крови продуцируется активированными лейкоцитами. Доноры NO является высокоэффективными ловушками супероксида. Учитывая их концентрацию в живых тканях – десятки, а иногда сотни мкМ, и константу скорости взаимодействия с супероксидом, у доноров NO не должно быть значимых конкурентов за супероксид. Аскорбат в концентрации 100 мкМ незначительно снижал интенсивность образования $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [7, 9]. $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ являются относительно стабильными продуктами, образовавшимися в результате воздействия короткоживущего соединения. Их зафиксировать легче, чем непосредственно O_2^- . Но не все тканевые барьеры проницаемы для $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$. В частности, амниотический пузырь не проницаем для всех нитро- и нитрозосоединений, включая $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [8]. Проницаем ли для них плацентарный барьер, пока неясно.

Отдельного внимания заслуживает гипоксия. Ее моделирование на инкубируемом яйце, обмотанном скотчем, также приводило к появлению $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ (табл. 3). По-видимому, здесь совокупный эффект активации оксидаз и реакции иммунной системы на пораженные ткани.

Список литературы / References:

1. Shumaev K., Gubkin A., Gubkina S., Gudkov L., Sviriaeva I., Timoshin A., Topunov A., Vanin A., Ruuge E. Interaction between dinitrosyl iron complexes and intermediate products of oxidative stress. *Biofizika*, 2006, vol. 51, pp. 472-477.

2. Shumaev K., Gubkin, A., Serezhenkov V., Lobysheva I., Kosmachevskaya O., Ruuge E., Lankin V., Topunov A., Vanin A. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide*, 2008, vol. 18, pp. 37-46, doi: 10.1016/j.niox.2007.09.085.
3. Titov V., Osipov A., Vanin A. The Ability of Blood Plasma to Inhibit Catalase in the Presence of Chloride is a Highly Sensitive Indicator of Deposited Nitric Oxide and Leukocyte Activation. *Current Enzyme Inhibition*, 2020, vol. 16, no. 2, pp. 172-180, doi: 10.2174/1573408016999200429123919.
4. Tarpey M., Wink D., Grisham M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004, vol. 286, pp. R431-R444, doi: 10.1152/ajpregu.00361.2003.
5. Емченко С.В., Цыганенко О.И. *Аналитические обзоры*. Новосибирск, 1993, вып. 27, с. 95-115 [Yemchenko S.V., Tsyganenko O.I. *Analytical review*. Novosibirsk, 1993, vol. 27, pp. 95-115 (In Russ.)].
6. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф. *Способ определения нитрозосоединений и нитрита в биообъектах*. Патент РФ, №2395096, рег. 20 июля 2010. [Titov V.Yu., Petrenko Yu.M., Vanin A.F. *Method of determination of nitroso compounds and nitrite in biological objects*. Patent of the Russian Federation, no. 2395096, reg. July 20, 2010 (In Russ.)].
7. Titov V., Petrenko Yu., Vanin A., Stepuro I. Detection of nitrite and nitrosocompounds in chemical systems and biological liquids by the calorimetric method. *Biophysics*, 2010, vol. 55, no. 1, pp. 77-86.
8. Titov V., Dolgorukova A., Osipov A., Kochish I. Putative Role of Ligands of DNIC in the Physiological Action of the Complex. *Bull Exp Biol Med.*, 2021, vol. 171, no. 5, pp. 606-610, doi: 10.1007/s10517-021-05278-1.
9. Titov V., Osipov A., Kreinina M., Vanin A. Features of Metabolism of Nitric Oxide in Normal State and Inflammation. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 5, pp. 676-688.
10. Vanin A., Poltorakov A., Mikoyan V., Kubrina L., Burbaev D. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide*, 2010, vol. 23, no. 2, pp. 136-49, doi: 10.1016/j.niox.2010.05.285.
11. Lee S., Lee J., Seong H., Lee S., Park J., Romero R. et al. The clinical significance of a positive Amnisure test in women with term labor with intact membranes. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, 2009, vol. 22, no. 4, pp. 305-310, doi: 10.1080/14767050902801694.
12. Kharitonov V., Sundquist A., Sharma V. Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, no. 47, pp. 28158-29164, doi: 10.1074/jbc.270.47.28158.
13. Licht W., Tannenbaum S., Deen W. Use of ascorbic acid to inhibit nitrosation: kinetic and mass transfer considerations for an in vitro system. *Carcinogenesis*, 1988, vol. 9, pp. 365-372.
14. Rassaf T., Preik M., Kleinbongard P., Lauer T., Hei Ch., Strauer B-E., Feelisch M., Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J. Clin. Invest.*, 2002, vol. 109, no. 9, pp. 1241-1248.
15. 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, no. 3, pp. 155-163.
16. Titov V., Osipov A., Ibragimova L., Petrov V., Dolgorukova A., Oleshkevich A. Hypothetical mechanism of light action on nitric oxide physiological effects. *Lasers in Medical Science*, 2021, vol. 36, no. 7, pp. 1389-1395, doi: 10.1007/s10103-020-03169-x.
17. 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.
18. Guzik T.J., Korbut R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2003, vol. 54, no. 4, pp. 469-87.
19. Титов В.Ю., Ананкина А.А., Осипов А.Н., Шалина Р.И., Иванова Е.А., Попова М.В. Возможности диагностики внутриутробного инфицирования по содержанию нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме материнской крови. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2022, т. 67, № 11, с. 633-639, doi: 10.51620/0869-2084-2022-67-11-633-639 [Titov V.Yu., Osipov A.N., Shalina R.I., Anankina A.A., Ivanova E.A., Popova M.V. The possibility of diagnosing intrauterine infection by the content of nitrite and non-thiolate nitroso compounds in maternal blood plasma. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, vol. 67, no. 11, pp. 633-639 (In Russ.)].

NITRIC OXIDE IS A HIGHLY EFFICIENT ROS TRAP. POSSIBILITY OF CLINICAL USE FOR DIAGNOSTICS**Titov V.Yu.^{1,2,3}, Osipov A.N.¹, Anankina A.A.¹, Kochish I.I.²**¹ Russian National Research N.I. Pirogov Medical University*Ostrovityanova str., 1c7, Moscow, 117513, Russia; e-mail: vtitov43@yandex.ru*² Moscow State K.I. Skryabin Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology*Akademika Skryabin str., 23, Moscow, Russia*³ Russian National Research and Technological Poultry Farming Institute, RAS*Ptitsegradskaya str., 10, Sergiev Posad, Moscow region, Russia*

Received 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpc.2023.0607

Abstract. It has been shown that nitrite is normally present in most tissues at a concentration not exceeding 50 nM. But the tissues contain NO donor compounds in concentration dozens of micromoles. Consequently, there are mechanisms in the tissues that prevent the oxidation of NO to nitrite. The NO donor compounds do not spontaneously dissociate with the release of NO. The transformation of NO included in the composition of donor compounds to nitrite and non-thiolate nitroso compounds ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) occurs under the action of active oxygen species (ROS) and, above all, superoxide that is produced by activated phagocytes. Thus, the content of $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ is a very sensitive indicator of phagocyte activation, a process that accompanies any inflammation. In this paper, the possibility of using the $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ content as indicator for the early diagnosis of inflammatory diseases is considered. It has been shown that this indicator has greater sensitivity and specificity than all known clinical and biochemical indicators. This makes it especially valuable for monitoring the state of patients in the hospital, monitoring the farm animals. The factor limiting the use of the $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ indicator in diagnostics is the permeability of tissue barriers to these compounds. This is especially important for monitoring the condition of the fetus, as well as the state of the central nervous system.

Key words: nitric oxide (NO), nitrite and non-thiolate nitroso compounds ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$), phagocytes, inflammation.