УДК 612.015.3:546.215

АБАТУРОВ А.Е.[1], ВОЛОСОВЕЦ А.П.[2], БОРИСОВА Т.П.[1]
[1]ГУ «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины», г. Днепропетровск
[2]Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АКТИВИРОВАННЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ МЕТАБОЛИТОВ В РЕСПИРАТОРНОМ ТРАКТЕ. ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ (часть 1)

Резюме. *В обзоре литературы дана краткая характеристика монооксида азота и активных радикалов азота. Детально рассмотрены механизмы действия монооксида азота в респираторном тракте: влияние высоких и низких концентраций, прямое и опосредованное действие, протекторные функции.*
Ключевые слова: *активированные азотсодержащие метаболиты, легкие, провоспалительное действие.*

Введение

Монооксид азота (NO) в респираторном тракте продуцируется нитрооксидсинтазами (NOS) эпителиоцитов, эндотелиоцитов, провоспалительных клеток иммунной системы (макрофагов, нейтрофилов, тучных клеток, Т-лимфоцитов), нейронов [9, 17]. Из множества процессов в организме, которые регулируются NO, особое значение при патологии органов дыхания имеет его провоспалительное действие.

Краткая характеристика монооксида азота и активных радикалов азота

Различают три электронных состояния молекулы NO — нейтрально заряженный радикал; отрицательно заряженный радикал нитроксил (NO^-), образующийся при присоединении одного электрона; положительно заряженный радикал нитрозоний (NO^+), образующийся при потере одного электрона [3]. Период полураспада NO в живых организмах составляет от 1 до 5 секунд [4]. Активные радикалы азота участвуют в следующих процессах: 1) нитрования, образуя нитротирозин, нитрогуанозин; 2) нитрозилирования, образуя нитрозотиолы, нитрозамины; 3) окисления [1].

К активированным азотсодержащим метаболитам относятся радикальные $NO^{\cdot}$, $NO_2^{\cdot}$ и $NO_3^{\cdot}$ и нерадикальные HNO_2, NO^+, NO^-, N_2O_4, N_2O_3, NO_2^+, ROONO и RO_2ONO соединения. NO быстро окисляется до двуокиси азота (NO_2), которая в водных растворах превращается в нитрит-анион (NO_2^-) или нитрат-анион (NO_3^-) (рис. 1).

Взаимодействие NO и O_2^- приводит к образованию аниона пероксинитрата ($OONOO^-$), сильнейшего нитрозилирующего агента динитрогентриоксида (азотистого ангидрида, N_2O_3) и мощного окислителя пероксинитрита ($ONOO^-$). Пероксинитрит является основным промежуточным продуктом взаимодействия между молекулами NO и O_2^- [7, 16]. Анион пероксинитрата распадается с образованием нитрит-аниона (NO_2^-) и кислорода (O_2), в то время как N_2O_3 может реагировать с тиоловыми группами, образуя нитрозотиолы, или с гидроксильным радикалом, образуя нитриты. Динитрогентриоксид также реагирует с пероксинитритом, образуя две молекулы диоксида азота и одну молекулу NO_2^-. Данная реакция происходит в естественных условиях, особенно тогда, когда NO образуется быстрее, чем супероксид анион-радикал. В связи с этим воспалительный процесс протекает с увеличе-

Адрес для переписки с авторами:
Абатуров Александр Евгеньевич
E-mail: alexabaturov@i.ua

© Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Борисова Т.П., 2015
© «Здоровье ребенка», 2015
© Заславский А.Ю., 2015

нием концентрации нитритов в организме. Пероксинитрит является сильным окислителем и может вступать в непосредственную реакцию с сульгидридными группами, цинк-тиоловыми кластерами. Он также взаимодействует с двуокисью углерода (CO_2) и ионом водорода. Анион $ONOO^-$ реагирует с нуклеофилами, в частности с CO_2, образуя переходный промежуточный нитрозопероксикарбонат, который быстро разлагается на диоксид азота (NO_2) и сильный окислитель анион триоксида углерода (CO_3^-). Пероксинитрит взаимодействует и с ионами водорода. Это приводит к образованию пероксиазотистой кислоты (HOONO), которая быстро распадается на гидроксильный радикал и диоксид азота (рис. 2). Поскольку уровень концентрации CO_2 почти в 10 000 раз выше, чем ионов водорода, в физиологических условиях преобладает формирование карбонатных радикалов перед образованием гидроксильных радикалов. Несмотря на то что действие карбонатного радикала, в отличие от гидроксильных радикалов, характеризуется выраженной селективностью, он является участником многих патофизиологических процессов [15].

Ни O_2^-, ни NO в физиологических условиях не проявляют особых цитотоксических свойств, так как они эффективно нейтрализуются антиоксидантной системой: O_2^- дисмутируется супероксиддисмутазами в перекись водорода, NO инактивируется оксигемоглобином, приводя к образованию метгемоглобина и NO_3^-. Однако если O_2^- и NO генерируются в непосредственной близости, то образуется пероксинитрит — каждое столкновение данных молекул без участия каких-либо катализаторов приводит к образованию пероксинитрита. Монооксид азота является единственной известной молекулой биологической системы, которая опережает супероксиддисмутазы в реакции O_2^-, поэтому образование пероксинитрита является неизбежным процессом. Скорость образования пероксинитрита в несколько раз превосходит скорость генерации супероксида анион-радикала и NO. Так, при воспалительном процессе количество O_2^- и NO увеличивается в 1000 раз, а пероксинитрита — в 1 000 000 раз [15]. Пероксинитрит может проникать внутрь клетки через анионные каналы клеточных мембран. Он является высокореактивным радикалом, который окисляет и нитрозилирует ароматические аминокислоты, липиды и ДНК. Пероксинитрит сравнительно медленно реагирует с биологическими молекулами [5]. Цитотоксические действия пероксинитрита многообразны. Он инициирует процессы перекисного окисления липидов, ингибирует активность митохондриальных ферментов дыхательной цепи, инактивирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, угнетает мембранные Na^+/K^+-АТФазы, подавляет мембранные натриевые каналы и др. Кроме того, пероксинитрит является мощным триггером процесса обрыва нити ДНК с последующей активацией ядерного фермента поли(АДФ-рибоза) полимеразы, гиперактивность которой может привести к некрозу клетки [19].

Активная генерация NO сопровождается S-нитрозилированием протеинов — ковалентной модификацией их цистеиновых остатков Точный механизм, с помощью которого происходит S-нитрозилирование в естественных условиях, до сих пор остается неизвестным. Основными нитрозилирующими агентами считают пероксиазотистую кислоту и N_2O_3. Результаты современных исследований представили доказательства, что процесс S-нитрозилирования, модифицирующий тиоловые группы цистеина, определяет большинство эффектов NO. В респираторном тракте человека в состоянии практического здоровья концентрация S-нитрозоглутатиона (GSNO) и S-нитрозотиольных белков колеблется в пределах 0,5–1,0 мкмоль. S-нитрозоглутатион является основным депо NO в организме человека и также выполняет другие физиологические функции. Так, GSNO усиливает биение ресничек реснитчатого эпителия и обладает бронходилатирующим цГМФ-независимым эффектом, который приблизительно вдвое превосходит действие теофиллина. В процессе восстановления GSNO принимает участие GSNO-редуктаза [8]. S-нитрозилирование оказывает влияние на экспрессию и активность большинства ионных хлоридных, в частности трансмембранного регуляторного

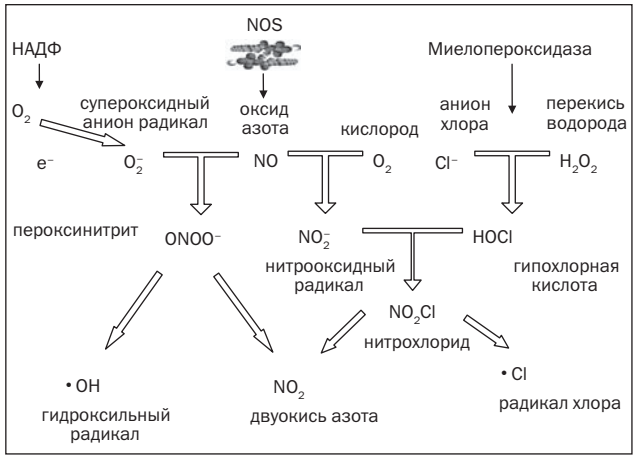

Рисунок 1. Пути генерации свободных радикалов (по M.A. Sharpe и соавт.) [14]

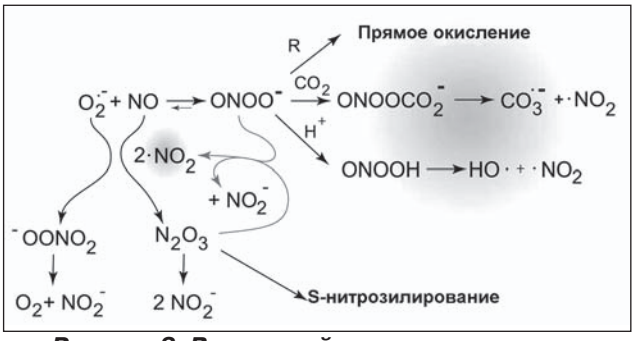

Рисунок 2. Взаимодействие оксида азота, супероксида анион-радикала, пероксинитрита и диоксида азота [15]

белка муковисцидоза (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator — CFTR), натриевых и кальциевых каналов клеток бронхолегочной системы. Показано, что NOS способны физически связываться с ионными каналами или со скаффолд-протеинами, которые способствуют локализации NOS в непосредственной близости каналов. Продукция NO вблизи ионных каналов обусловливает селективное S-нитрозилирование данных белковых структур. S-нитрозилирование модифицирует передачу сигналов с G-протеинсвязанных рецепторов (GPCR — G-protein-coupled receptor), рецептора тирозиновых киназ, а также процесс репарации ДНК [13, 18, 20].

Механизмы действия монооксида азота в респираторном тракте

Коэффициент диффузии азота в воде при 37 °С несколько больше, чем кислорода и углекислого газа, и идеально подходит для быстрой передачи информации на короткие расстояния. Молекула NO свободно проникает через клеточную мембрану и может многократно за считанные доли секунды диффундировать из клетки во внеклеточное пространство и обратно. Средняя скорость движения молекулы NO при комнатной температуре составляет примерно 400 метров в 1 секунду. Молекула NO в растворе производит около 10 000 000 000 столкновений в секунду. В связи с этим путь молекулы NO внутри клетки и в экстрацеллюлярном пространстве может быть очень сложным, а биологические эффекты — очень разнообразными [15]. В клетках организма NO может выполнять ряд функций: 1) активировать солютабную гуанилатциклазу (сГЦ); 2) инактивироваться, взаимодействуя с железом оксигемоглобина и с аминокислотным остатком Cys^{93} субъединицы В гемоглобина; 3) оказывать цитотоксическое действие.

Спектр биологического действия NO зависит от уровня его концентрации. При низком уровне концентрации, которая сопровождает функционирование конститутивных эндотелиальных и нейронных изоформ NOS (eNOS и nNOS), NO оказывает цитопротекторное действие. В условиях высокой концентрации, возникающей при работе индуцибельной изоформы нитрооксидсинтетазы (iNOS), NO оказывает цитотоксическое действие (рис. 3).

Высокая концентрация NO также оказывает антибактериальное, противовирусное, противогрибковое действие, способствует развитию воспалительного процесса, вызывает повреждение ДНК, ингибирует тканевое дыхание, способствует усилению апоптоза клеток, модулирует функциональную активность различных иммуноцитов [21, 22].

Низкая концентрация NO (5–10 нмоль) индуцирует активность циклической гуанилатциклазы (цГЦ), цитохрома P^{450}. Прямое взаимодействие $NO^{\cdot}$ с ионом Fe цГЦ протекает быстрее, чем с любым другим известным гемопротеином. В результате активации цГЦ происходит увеличение внутриклеточной концентрации циклического 3',5'-гуанилатмонофосфата (цГМФ), который индуцирует цГМФ-зависимую протеинкиназу (протеинкиназу G Iα — PKGIα), цГМФ-регулируемые фосфодиэстеразы и активируемые циклическим нуклеотидом ионные каналы (CNG), действие которых обусловливает вазодилатационное, бронходилатационное,

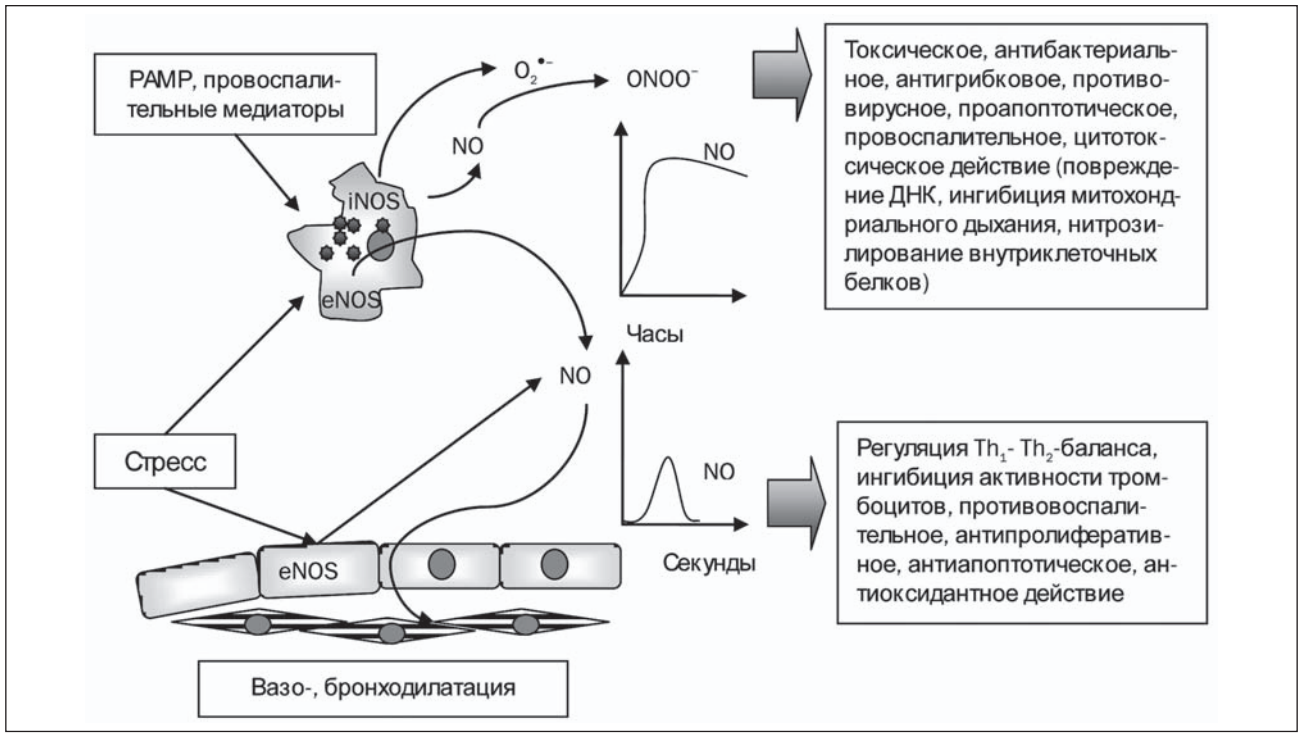

Рисунок 3. Действие высоких и низких концентраций оксида азота [10]

Таблица 1. Протекторные функции NO [21]

Источник NO (тип клеток)	Функции	Эффект
Макрофаги, микроглии, нейтрофилы, эозинофилы, фибробласты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки	Защита от инфекционных агентов	Киллинг или подавление роста колоний бактерий, грибов, репликации вирусов
Макрофаги, эозинофилы	Противоопухолевая активность	Гибель или ингибирование роста опухолевых клеток
Макрофаги (супрессорного фенотипа)	Иммуносупрессия	Ингибиция пролиферации и функциональной активности Т- и В-клеток, синтеза антител, подавление активности аутореактивных Т- и В-клеток
Макрофаги, Т-клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты	Модуляция продукции цитокинов, хемокинов и факторов роста	Усиление или подавление продукции таких цитокинов, как IL-1, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN-γ, TNF TGF-β, G-CSF, M-CSF, VEGF, CCL3/MIP-1α, CXCL2/MIP-2, CCL2/MCP-1
Макрофаги	Регуляция дифференциации CD4+ Т-клеток	Индукция и дифференцировка Th1-клеток, супрессия толерогенных Т-клеток

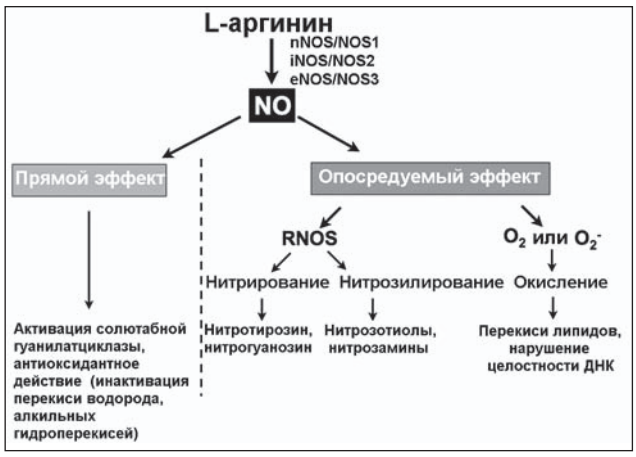

Рисунок 4. Прямое и опосредованное действие NO [11]

антипролиферативное, антиапоптотическое, иммунорегулирующее, антитромбоцитарное, антиоксидантное действие NO. Самая распространенная форма сГЦ (α1/β1), обеспечивающая бронходилатацию, высоко экспрессирована в гладкомышечных клетках респираторного тракта. Солютабная ГЦ и ГМФ-зависимая киназа I, экспрессированные в эпителиальных клетках респираторного тракта, участвуют в eNOS-ассоциированной регуляции функции ресничек [2, 6]. Участие в регуляции активности внутриклеточных сигнальных путей принимают N_2O_3 и пероксинитрит. Динитроген триоксид (N_2O_3) изменяет функциональность протеинов, вызывая S-нитрозилирование тиоловых групп их цистеиновых остатков, а пероксинитрит активирует МАРК (рис. 4) [12].

Протекторные эффекты NO представлены в табл. 1.

Список литературы

1. Бабак О.Я. Механизмы гепатопротекторного и токсического влияния азота оксида / О.Я. Бабак, Н.В. Ярмыш, Г.Ю. Панченко // Сучасна гастроентерологія. — 2006. — № 5 (31). — С. 76-84.

2. Козина О.В. Образование и биологическая роль NO при аллергическом воспалении / О.В. Козина, Л.М. Огородова // Бюллетень сибирской медицины. — 2009. — № 3. — С. 95-105.

3. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота / И.Ю. Малышев, Е.Б. Манухина // Биохимия. — 1998. — № 7. — С. 992-1006.

4. Фрейдлин И.С. Регуляторные функции провоспалительных цитокинов и острофазных белков / И.С. Фрейдлин, П.Г. Назаров // Вест. РАМН. — 1999. — № 5. — С. 28-32.

5. Calcerrada P. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications / P. Calcerrada, G. Peluffo, R. Radi // Curr. Pharm. Des. — 2011. — Vol. 17, № 35. — P. 3905-3932. PMID: 21933142.

6. Coleman J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation // Int. Immunopharmacol. — 2001. — Vol. 1. — P. 1397-1406. doi:10.1016/S1567-5769(01)00086-8.

7. Exner M. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin / M. Exner, S. Herold // Chem. Res. Toxicol. — 2000. — Vol. 13, № 4. — P. 287-293. PMID: 10775329.

8. Foster M.W. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective / M.W. Foster, D.T. Hess, J.S. Stamler // Trends Mol. Med. — 2009. — Vol. 15, № 9. — P. 391-404. doi: 10.1016/j.molmed.2009.06.007.

9. Goodrum K.J. Cytokine Responses to Group B Streptococci Induce Nitric Oxide Production in Respiratory Epithelial Cells / K.J. Goodrum, J. Poulson-Dunlap // Infect Immun. — 2002. — 70 (1). — P. 49-54. doi: 10.1128/IAI.70.1.49-54.2002.

10. Guzik T.J. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation / T.J. Guzik, R. Korbut, T. Adamek-Guzik // J. Physiol. Pharmacol. — 2003 — Vol. 54, № 4. — P. 469-487. PMID:14726604.

11. Hollenberg S.M. Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness-update 2008 / S.M. Hollenberg, I. Cinel // Crit. Care. — 2009. — Vol. 13, № 4. — P. 218. doi: 10.1186/cc7706.

12. S-nitrosylation in cardiovascular signaling / B. Lima, M.T. Forrester, D.T. Hess, J.S. Stamler // Circ. Res. — 2010. — Vol. 106, № 4. — P. 633-646. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.207381.

13. S-Nitrosothiol Signaling in Respiratory / B.Gaston, D. Singel, A. Doctor, J.S. Stamler // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2006. — Vol. 173, № 11. — P. 1186-1193. PMID: 16528016.

14. Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics / M.A. Sharpe, R. Ollosson, V.C. Stewart, J.B. Clark // Biochem. J. — 2002. — Vol. 366. — P. 97-107. PMID: 11994046.

15. Pacher P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // Physiol. Rev. — 2007. — Vol. 87, № 1. — P. 315-424. PMID: 17237348.

16. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe / J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, № 19. — P. 14210-14216. doi: 10.1074/jbc.M110.110080.

17. Rao K.M.K. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types // J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. — 2000. — 3 (1). — P. 27-58. doi: 10.1080/109374000281131.

18. Regulation of ion channel structure and function by reactive oxygen-nitrogen species / S. Matalon, K.M. Hardiman, L. Jain et al. // Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. — 2003. — Vol. 285. — P. 1184-1189. PMID: 14604848.

19. Szabó C. Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock / C. Szabó, K. Módis // Shock. — 2010. — Vol. 34, Suppl. 1. — P. 4-14. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181e7e9ba.

20. Tang C.H. Regulation of DNA repair by S-nitrosylation / C.H. Tang, W. Wei, L. Liu // Biochim. Biophys Acta. — 2012. — Vol. 1820, № 6. — P. 730-735. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.04.014.

21. The role of nitric oxide in inflammatory reactions / P. Tripathi, P. Tripathi, L. Kashyap, V. Singh // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2007. — Vol. 51, № 3. — P. 443-452. PMID: 17903207.

22. Tripathi P. Nitric oxide and immune response // Indian. J. Biochem. Biophys. — 2007. — Vol. 44, № 5. — P. 310-319. PMID: 18341206.

Получено 11.10.15

Абатуров О.Є.[1], Волосовець О.П.[2], Борисова Т.П.[1]
[1]ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України», м. Дніпропетровськ
[2]Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

МЕХАНІЗМ ДІЇ АКТИВОВАНИХ АЗОТУМІСНИХ МЕТАБОЛІТІВ У РЕСПІРАТОРНОМУ ТРАКТІ. ПРОЗАПАЛЬНА ДІЯ (частина 1)

Резюме. В огляді літератури викладена коротка характеристика монооксиду азоту та активних радикалів азоту. Детально розглянуті механізми дії монооксиду азоту в респіраторному тракті: вплив високих і низьких концентрацій, пряма й опосередкована дія, протекторні функції.

Ключові слова: активовані азотумісні метаболіти, легені, прозапальна дія.

Abaturov O.Ye.[1], Volosovets O.P.[2], Borysova T.P.[1]
[1]State Institution «Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Healthcare of Ukraine», Dnipropetrovsk
[2]National Medical University named after O.O. Bohomolets, Kyiv, Ukraine

THE MECHANISM OF ACTION OF THE ACTIVATED NITROGEN-CONTAINING METABOLITES IN THE RESPIRATORY TRACT. PROINFLAMMATORY EFFECT (Part 1)

Summary. The literature review presents a brief description of nitric oxide and nitrogen reactive intermediates. The mechanisms of action of nitric oxide in the respiratory tract are discussed in detail: the impact of high and low concentrations, the direct and indirect effects, protective functions.

Key words: activated nitrogen-containing metabolites, lungs, proinflammatory effect.