

В.И.Капелько, В.Л.Лакомкин, А.А.Тимошин, К.Б.Шумаев, В.П.Мох, Э.К.Руге, А.Ф.Ванин*, Е.И.Чазов Динитрозильные комплексы железа – естественные доноры оксида азота в организме

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава,

*Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, Москва, Россия

Ключевые слова: артериальное давление, обезьяны, крысы SHR

Оксид азота (NO, нитроксид) является мощным естественным вазодилататором. Нарушение его синтеза или повышенное связывание с супероксидом является одной из основных причин эндотелиальной дисфункции, имеющей важное значение в патогенезе атеросклероза. В связи с этим актуальной проблемой современной кардиологии является изучение метаболизма нитроксида. Как известно, он является очень нестойким соединением с периодом полужизни около 6 с, что стимулирует поиск веществ, обладающих пролонгированным гипотензивным действием. Нитроксид в модельных системах способен связываться с железосодержащими соединениями, образуя S-нитрозотиолы ($RS\text{-NO}^+$) и динитрозильные комплексы негемового железа ($(RS)_2\text{Fe}+(\text{NO}^+)_2$), куда он входит в качестве ионов нитрозония (NO^+). Важно выяснить - могут ли они образовываться в естественных условиях, в клетках, а также изучить условия их распада.

Цель работы. Изучение гипотензивного эффекта ДНКЖ *in vivo* и *in vitro*, изучение зависимости синтеза и распада ДНКЖ от активных форм кислорода.

Материал и методы. Объектами исследования служили изолированные полоски аорты крыс, а также крысы Wistar, SHR и обезьяны *Macaca mulatta*. ДНКЖ (А.Ф.Ванин, патент РФ №2005137364) животным вводили внутривенно с одновременной регистрацией среднего артериального давления (САД) через предварительно вживлённый катетер в бедренной артерии и частоты сердечных сокращений. У обезьян параметры гемодинамики с помощью датчиков Omgon определяли под слабым кетаминным наркозом (10 мг/кг) на базе Института медицинской приматологии РАН в Адлере (дир. Б.А.Лапин). В опытах на изолированных полосках аорты регистрировали изометрическое напряжение при предварительном сокращении, вызванном стандартной концентрацией норадреналина (10^{-7} М). Для измерения уровня нитроксида в органах животным вводили компоненты спиновой ловушки NO: диэтилдитиокарбамат (DETC) и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с цитратом Na^+ , которые в гидрофобных компартментах клеток образуют спиновую ловушку Fe^{3+} -DETC₂, связывающую нитроксид. Содержание ловушки в ткани определяли с помощью ЭПР-спектроскопии.

Результаты и их обсуждение. В опытах *in vitro* при наличии источника железа - ферритина, источника NO - GSNO (нитрозоглутатиона) и глутатиона в качестве лиганда происходит образование ДНКЖ, о чём свидетельствовало нарастание сигнала ЭПР. Супероксид, образуемый при добавлении к смеси ксантина и ксантиноксидазы, практически не влиял на образование ДНКЖ с участием GSNO, но значительно (приблизительно в 3 раза) увеличивал скорость образования ДНКЖ в присутствии более сильного донора нитроксида PAPA/NONO. В той же среде, но при сниженной скорости образования ДНКЖ из-за очень низкого содержания глутатиона добавление энергизированных митохондрий (в присутствии

сукцината) как генератора супероксида повышало скорость образования ДНКЖ вдвое, а добавление антимицина А, резко усиливающего образование супероксида, повышало скорость образования ДНКЖ на порядок. В то же время при усиленном образовании активных форм кислорода в отсутствие доноров нитроксида распад ДНКЖ значительно ускорялся, особенно при наличии в среде хелатора железа ДТПА, а добавление антиоксидантов значительно замедляло распад. На полоске аорты пероксид водорода укорачивал вазодилататорный эффект ДНКЖ, его действие снималось добавлением СОД или каталазы. Таким образом, ДНКЖ могут образовываться в клетках при умеренном окислительном стрессе и тем самым формировать собственный внутриклеточный пул NO как форму запаса оксида азота. Вместе с тем при снижении уровня NO окислительный стресс активирует его выход из комплексов с последующим демпфированием повреждающего действия активных форм кислорода.

В опытах на изолированных полосках аорты и крысах Wistar действие различных доноров нитроксида характеризовалось быстрым развитием гипотензивного эффекта с последующим замедленным его исчезновением. Крутизна падения и скорость последующего восстановления тонуса убывали в следующем порядке: нитроприсид>нитрозотиол>ДНКЖ с цистеином в качестве лиганда>ДНКЖ с глутатионом. Длительное вазодилаторное действие ДНКЖ *in vivo* обеспечивается его связыванием с белками (альбуминами, гемоглобином), что сильно замедляет выход NO. Фаза восстановления САД сопровождалась значительным ростом частоты сокращений. Обе фазы эффекта зависели от дозы, высокие дозы ДНКЖ способны поддерживать сниженное САД на протяжении нескольких часов. У обезьян начальный гипотензивный эффект ДНКЖ был более выражен, но восстановление происходило быстрее, чем у крыс Wistar, что может быть обусловлено действием наркоза, как показано в опытах на крысах. У крыс SHR с повышенным в 1,5 раза исходным САД увеличены и глубина снижения в первой фазе, и длительность второй фазы при равной дозе ДНКЖ и одинаковой динамике распада ДНКЖ в крови по данным ЭПР. У крыс Wistar через 30 мин после введения ДНКЖ наблюдали резкое увеличение амплитуды компонентов сигнала ЭПР NO-Fe²⁺-DETC₂ в органах, что указывает на повышение содержания NO в ткани. Степень накопления NO убывала в следующем порядке: печень>сердце=почка>> лёгкие>скелетная мышца.

Выводы. Умеренный окислительный стресс в клетках и крови активирует образование ДНКЖ, но при дефиците нитроксида комплексы распадаются. Величина и длительность гипотензивного эффекта ДНКЖ *in vivo* зависят от скорости освобождения нитроксида, который затем диффундирует в ткани и органы, реализуя там своё действие. У гипертензивных животных гипотензивное действие ДНКЖ усилено.