

Оксид азота — с гемоглобином и не только

Кандидат биологических наук

К.Б.Шумаев, О.В. Космачевская,

доктор биологических наук

А.Ф.Топунов

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

С экранов телевизоров и со страниц журналов не сходит слово «антиоксидант». Антиоксиданты теперь содержатся в соке, в креме для лица, в шампуне и во многих других пищевых и парфюмерных продуктах, без которых трудно представить жизнь современного человека. Почему эти антиоксиданты так необходимы нашему организму? Потому что они устраняют действие сильных окислителей. Самые сильные окислители в нашем организме — свободные радикалы. Доказано их участие в развитии таких заболеваний, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, нейродегенеративные заболевания, катаракта, рак и диабет. Но откуда свободные радикалы берутся в нашем организме? И всегда ли они вредны?

Свободные радикалы: хорошо или плохо?

Напомним читателям, что свободными радикалами называются вещества с неспаренным электроном на внешней орбитали. Благодаря этому неспаренному электрону свободные радикалы могут активно взаимодействовать с различными веществами внутри клетки, а это неминуемо приводит к повреждению клеточных систем. Самая распространенная среди этих неспецифических реакций — перекисное окисление липидов. Как известно из учебников по органической химии, оно протекает по радикальному механизму — с образованием вторичных радикалов, которые, в свою очередь, могут окислять другие молекулы.

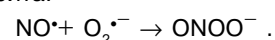
Представление об активных формах кислорода впервые сформировалось в исследованиях, связанных с так называемым окислительным стрессом. Собственно говоря, увеличение в организме концентрации этих соединений кислорода и вызывает комплекс процессов и ответных реакций, определяемых как окислительный стресс.

Оксиды азота — NO и другие, образующиеся в биологических системах, — первоначально также относили к активным формам кислорода, однако позднее за ними закрепилось название «активные формы азота». Возникло и понятие «нитрозативный стресс».

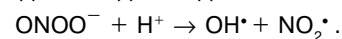
Разделение этих групп соединений условно, поэтому часто используют определение «активные» или «активированные кислородные метаболиты», объединяющее активные формы кислорода, азота и галогенов.

Источником вторичных радикалов становятся первичные, а именно супероксидный анион-радикал $O_2^{\cdot-}$ и оксид азота NO. Эти двухатомные молекулы синтезируются в клетках специальными ферментами. Ксантинооксидаза и НАДФН-оксидаза отвечают за синтез $O_2^{\cdot-}$, NO-синтаза — за NO. В определенных условиях эти ферменты могут меняться ролями: NO-синтаза может продуцировать супероксид, а ксантинооксидаза — восстанавливать нитрит с образованием оксида азота. $O_2^{\cdot-}$ и NO возникают и как побочные продукты работы дыхательной цепи митохон-

дрий — «энергетических станций» клетки: супероксид в результате одноэлектронного восстановления O_2 , а NO как продукт восстановления нитрита. Последняя реакция может быть рудиментом «докислородной эпохи», когда конечным акцептором электронов дыхательной цепи были ионы нитрита и нитрата. А то, что NO и $O_2^{\cdot-}$ образуются в одних и тех же зонах клетки, увеличивает вероятность образования суперсильного окислителя — пероксинитрита:



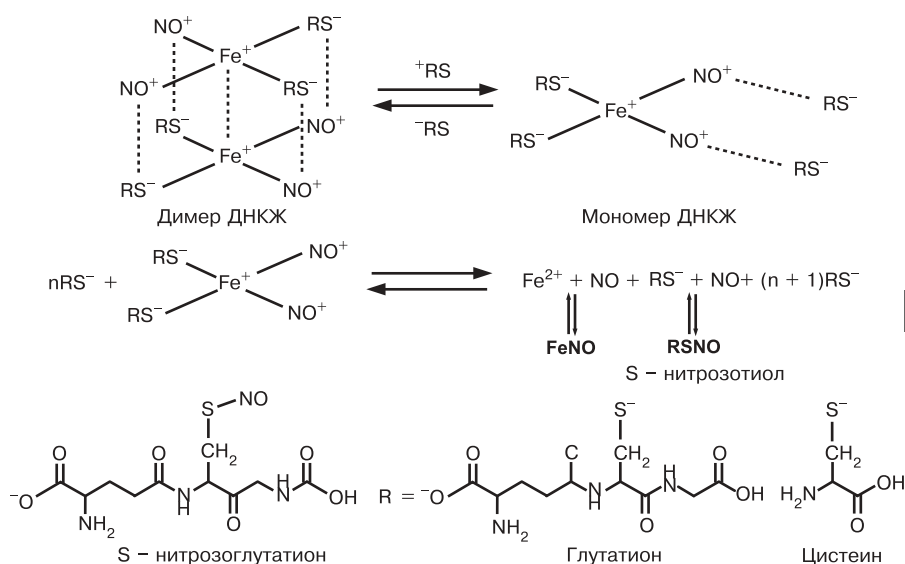
Считается, что цитотоксические свойства пероксинитрита определяются его распадом с образованием таких окислителей, как гидроксильный радикал и диоксид азота:



Возникающие при этой реакции свободные радикалы могут окислять липиды, белки и ДНК митохондрий. В настоящее время патологии, связанные с генерацией активных форм кислорода и азота, объединяют в группу «митохондриальные болезни». (Оказывается, и на клеточном уровне получение энергии связано с загрязнением среды!) Самая серьезная и неизбежная из этих болезней — приближение старости. Не случайно в лаборатории академика В.П.Скулачева разрабатываются замедляющие старение антиоксидантные препараты, действие которых направлено именно на митохондрии (см. «Химию и жизнь», 2007, № 5).

Итак, поскольку свободные радикалы повреждают клеточные структуры, в любой клетке предусмотрены системы их детоксикации, как ферментативные (пероксидазы, каталазы), так и неферментативные — низкомолекулярные антиоксиданты. К последним относятся, например, витамин С (аскорбиновая кислота), убихинол (восстановленная форма коэнзима Q) и альфа-токоферол (витамин E). Поэтому, если в составе вашего шампуня вы обнаружите витамин E, значит, реклама не обманула, это действительно «шампунь с антиоксидантом». Работает ли он в соответствии с обещаниями — уже другой вопрос.

Активные формы кислорода		Активные формы азота	
$O_2^{\cdot-}$	супероксидный анион-радикал (супероксид)	NO^{\cdot}	оксид (монооксид) азота
OH^{\cdot}	гидроксильный радикал	NO_2^{\cdot}	диоксид азота
OH_2^{\cdot}	гидроперекисный радикал	N_2O_4	тетраоксид диазота
H_2O_2	пероксид водорода	NO^+	нитрозильный (нитрозония) катион
O_2^1	синглетный кислород	NO^-	нитроксильный анион
O_3	озон	$ONOO^-$	пероксинитрит
RO^{\cdot}	алкоксильный радикал	$ONOOH$	пероксиазотистая кислота
RO_2^{\cdot} (ROO $^{\cdot}$)	алкилперекисный радикал	$ROONO$	органический пероксинитрит
$ROOH$	органические пероксиды	NO_2^+	нитроний (нитрил) катион
$CO_3^{\cdot-}$	анион-радикал карбоната	NO_2Cl	нитроний (нитрил) хлорид
$HOCl$	гипохлорная кислота		



1

Клетка хранит опасный оксид азота в составе специальных комплексов. Вот как можно изобразить динамическое равновесие между мономерными и димерными нитрозильными комплексами железа (МНКЖ и ДНКЖ), S-нитрозотиолами и свободным NO

Но при этом в организме существуют генетически детерминированные системы, отвечающие за образование O_2^- и NO. Иначе говоря, организм не только борется с активными формами кислорода и азота, но и синтезирует их. Что это, биохимический способ самоубийства? Или эти опасные молекулы могут быть и полезными?

Убийца и спаситель в одном лице

Если за кислородными радикалами и другими активными соединениями закрепилась нехорошая репутация разрушителей и токсических агентов, то NO — куда более благонадежная молекула. Оксид азота с момента его обнаружения в организме человека и животных рассматривался как фактор, регулирующий тонус сосудов. (Подробнее об этом см. «Химию и жизнь», 2000, № 2.) В этом случае NO играет роль сигнальной молекулы: его связывание с определенными белками изменяет их структуру и активность. NO и его метаболиты, пероксинитрит и NO_2Cl , — важная составляющая иммунного ответа многоклеточных организмов. У млекопитающих NO, гипохлорит и супероксидный радикал вырабатывают клетки иммунной системы (моноциты и макрофаги). При атаке патогенов эти клетки быстро выбрасывают активные формы кислорода и азота. Это явление получило название «дыхательного взрыва».

Кроме того, оксид азота и супероксид постоянно вырабатываются ле-

гочным эпителием — это первая линия защиты организма от проникающих с воздухом чужеродных клеток. У растений NO, пероксинитрит и активные формы кислорода также принимают участие в борьбе с патогенными микроорганизмами и грибами. Целенаправленный синтез активных форм кислорода и азота как способ защиты присущ представителям всех царств живой природы. Существуют бактерии и грибы, которые таким способом борются с растительными или животными клетками. По мнению известного специалиста в области изучения окислительного стресса у бактерий профессора Д.Н.Островского, «бактерии, по-видимому, в большинстве случаев генерируют активные формы кислорода не по злобе (не во вред другим) и не по глупости (не во вред себе). Склонность бактерий к образованию АФК является также прообразом системы внеклеточного пищеварения и инактивации ксенобитов, которая у животных приобрела вид гидроксиллирующей системы с участием цитохрома P_{450} ».

Физиологической активностью обладает не только оксид азота, но и многочисленные продукты его превращения. Среди них особое место занимают нитрозотиолы, а также гемовые и негемовые нитрозильные комплексы (рис. 1). Все они способны при определенных условиях выделять оксид азота в свободном виде. Нитрозотиолы представляют собой NO, связанный через атом серы аминокислоты (цистеина), пептида (глутатиона) или белка (альбумина и гемоглобина).

В негемовых нитрозильных комплексах NO связан с низкомолекулярными тиолами или белками, также, как правило, содержащими SH-группу. В последнем случае он соединяется с белком через ион железа. То есть, в отличие от двухкомпонентных нитрозотиолов, нитрозильные комплексы — трехкомпонентные, их можно изобразить формулой $(RS^-)_n-Fe^+-(NO^+)_m$, где $n=2$ или 4, а $m=1$ или 2.

В зависимости от того, одна или две молекулы NO присоединены к железу, эти комплексы могут быть моно- и динитрозильными (сокращенно МНКЖ и ДНКЖ). Именно такие комплексы образуются в макрофагах и эндотелиальных клетках. Они важны для обмена NO в живых организмах, в том числе и человека, поскольку стабилизируют и транспортируют оксид азота. Впервые ДНКЖ в биологических системах обнаружил А.Ф.Ванин из Института химической физики им. Н.Н.Семенова РАН. Он работал с клетками дрожжей. Вообще-то известны и другие нитрозильные комплексы, однако «наши» ДНКЖ с SH-лигандами, о которых пойдет речь дальше, имеют большое преимущество — физиологичность.

Неспроста природа прибегла к включению NO в нитрозотиолы и ДНКЖ. Эти вещества способны к взаимопревращениям, образуя с ионами двухвалентного железа, оксидом азота и тиолами динамическую саморегулирующую систему. По нашим данным, нитрозотиолы и динитрозильные комплексы железа взаимодействуют с супероксидом, не образуя пероксинитрит и другие агрессивные окислители. Более того, ДНКЖ непосредственно реагируют с пероксинитритом, защищая другие биологические молекулы. Известно, что свободная молекула NO ингибирует перекисное окисление липидов, предотвращая повреждение биологических мембран. Аналогичные свойства обнаруживаются и у динитрозильных комплексов железа. Образование ДНКЖ может спасти митохондрии, связав одновременно NO и ионы «свободного» железа. Тем са-

мым природа убивает даже не двух, а трех зайцев — нейтрализует супероксид и предотвращает образование гидроксильного радикала и пероксинитрита.

Динитрозильные комплексы железа и свободный NO также нейтрализуют другие «активные формы железа», восстанавливая оксоферрилформы миоглобина и гемоглобина (гем-Fe(IV)=O) до нетоксичной окисленной формы (гем-Fe(III)). Таким образом, нитрозотиолы и ДНКЖ могут действовать как эффективные антиоксиданты.

Видно, что NO способен как стимулировать, так и подавлять процессы окисления биологических молекул. То есть NO по отношению к активным формам кислорода выступает в роли двуликого Януса.

Возьмем, например, апоптоз (рис. 2). Участие NO в этом процессе может привести к реализации двух альтернативных сценариев. В первом образовании пероксинитрита приводит к открытию пор в митохондриальных мембранах, выходу цитохрома c в цитоплазму и индукции каскада реакций, вызывающих в итоге гибель клетки. Во втором — нитрозирование сульфгидрильной группы каспаз (ключевых ферментов апоптоза) блокирует гибель клетки.

Вообще, нитрозирование различных групп белков — один из универсальных механизмов регуляции или передачи сигнала. Известны белки, регулирующие активность генов, их называют факторами транскрипции. Некоторые из таких факторов активируют либо присоединением оксида азота к SH-группам, либо образованием нитрозильных комплексов железа с участием SH-групп.

Итак, нитрозотиолы и нитрозильные комплексы очень важны для биологической системы. Это и способ депонирования NO, и способ транспорта NO, и способ изменения активности белков. Но есть и еще один тип физиологически значимых комплексов оксида азота — NO, связанный с гемом (HbNO). И конечно, главную роль в образовании этих комплексов играют наши любимые гемоглобины.

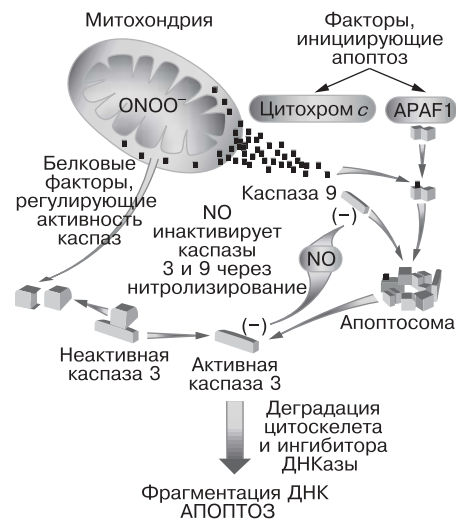
Гемоглобин и NO

В предыдущей статье (см. «Химию и жизнь», 2008, № 2) мы писали о том, что первичной функцией гемоглобинов могло быть взаимодействие не с кислородом, а с NO. И поныне существуют гемоглобины, для которых эта функция — основная: несимбиоти-

ческие растительные, нейроглобины, цитоглобины, бактериальные флавогемоглобины. На то, что взаимодействие гемоглобинов с NO более древнее, указывает и тот факт, что у них есть несколько способов связывания этого вещества. Оксид азота может нитрозировать железо гемовой группы, включаться в динитрозильный комплекс, связанный с β-субъединицей, и образовывать нитрозотиол гемоглобина (рис. 3). Однако не все гемоглобины содержат SH-содержащие аминокислоты, например их нет у растительного симбиотического гемоглобина — леоглобина. Но несмотря на такую «ущербность», леоглобин все же способен образовывать нитрозильные комплексы. Каким способом — пока неясно. В настоящее время мы пытаемся разрешить эту загадку. Мы предполагаем, что SH-группы — не единственный возможный лиганд ДНКЖ, и ведем исследования других физиологических способов присоединения динитрозильных комплексов железа. (Уже получены предварительные данные об их существовании, и стоит заметить, что заслуга в открытии этих «новых» ДНКЖ принадлежит одному из авторов статьи К.Б.Шумаеву.)

Еще один экзотический способ связывания NO миоглобином был обнаружен итальянским «гемоглобинщиком» Маурицио Брунори. На эту догадку его натолкнула старая работа нобелевского лауреата сэра Джона Кендрю, который, изучая кристаллическую структуру миоглобина, открыл в его молекуле полости, заполняемые ксеноном. Спустя много лет Брунори, исследуя NO-диоксигеназную активность миоглобина, обнаружил, что эти же самые полости могут служить «хранилищем» NO. Последние данные по структуре так называемых усеченных гемоглобинов (их белковая цепь на 20–30% короче обычного гемоглобина) показали, что в этих белках имеются каналы, которые служат для хранения NO и транспорта его к гемму. Функционально каналы усеченных гемоглобинов подобны полостям миоглобина.

Вернемся к лучшему всего изученному способу связывания NO с гемоглобинами — образованию нитрозотиолов (Hb-SNO). Такие нитрозотиолы играют огромную роль в метаболизме оксида азота. Группа Джона Стэмлера из США показала, что Hb-SNO расширяет сосуды и усиливает кровоток. Исследователи показали также, что если Hb-SNO переходит из окси- в дезоксиформу, то выделяется кислород, разрывается

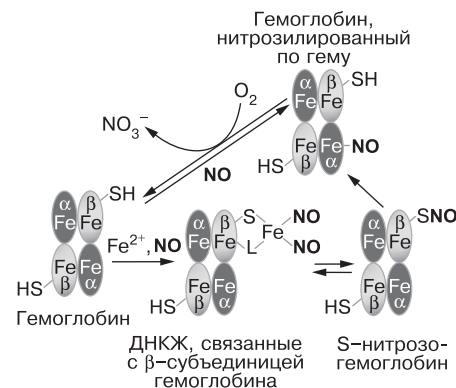


2

Регуляция апоптоза под действием активных форм азота (NO и пероксинитрита). Апоптоз запускается белковым фактором APAF1 и цитохромом c. Освобождение цитохрома c из митохондрией стимулируется пероксинитритом (ONOO-). Ингибирование каспаз отмечено значком (-)

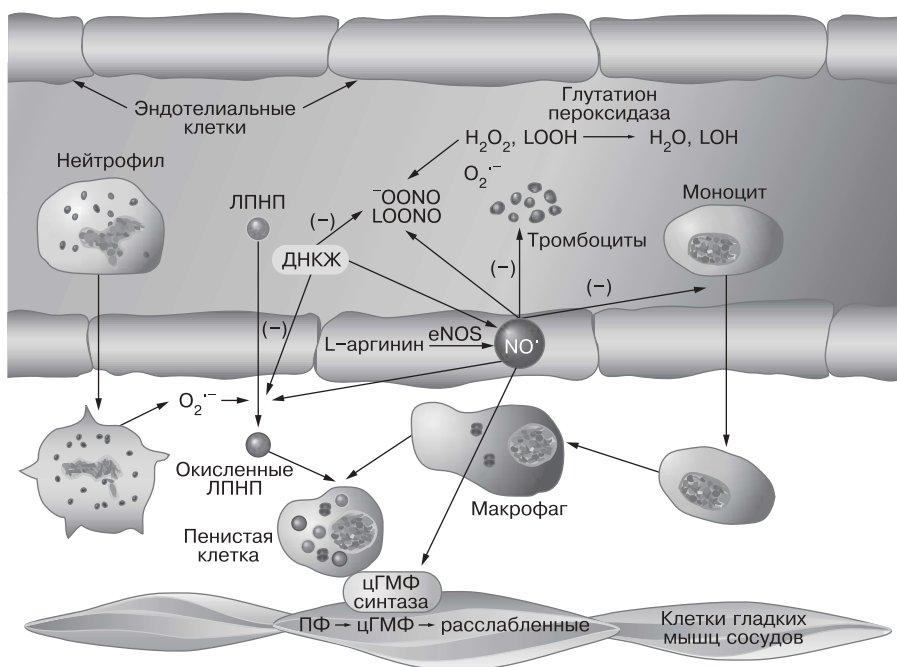
связь S-NO и освобождается NO. Другими словами, изменение конформации гемоглобина сопровождается переносом части пула NO от SH-группы цистеина к гемму или выделением его в свободном виде. Что же касается NO, связанного с самим гемом, а не с белком, то такой комплекс очень устойчив, и в физиологических условиях NO не может из него высвободиться. В этом случае гемоглобин выступает в роли «утилизатора» оксида азота, тогда как нитрозотиол гемоглобина рассматривается как форма стабилизации и в то же время донор NO. Доля образующихся HbNO и Hb-SNO зависит от физиологического насыщения Hb кислородом.

Гемоглобиновые ДНКЖ находятся в равновесии с S-нитрозотиолом и



3

Схематическое изображение различных форм гемоглобина, связанного с NO



ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

правлениях. Защитное действие NO заключается в расслаблении сосудов, снижении агрегации тромбоцитов и подавлении перекисного окисления липидов. Однако очень важно, с какими радикалами будет взаимодействовать NO. Окисление ЛПНП снижается, когда оксид азота реагирует со свободными радикалами липидов. При этом образуется органический пероксинитрит (ROONO), который, в отличие от своего неорганического аналога, не является активным окислителем. Напротив, пероксинитрит, образующийся в реакции NO с супероксидом, усиливает перекисное окисление липидов.

Польза от цистеиновых и глутатионовых ДНКЖ очевидна. Поскольку они предотвращают образование пероксинитрита и в то же время вызывают продолжительное расслабление гладких мышц сосудов, можно считать, что включенный в эти комплексы оксид азота проявляет здесь свои защитные свойства. Действие ДНКЖ как лекарств только начинают изучать, но уже сейчас ясно, что оно может быть намного шире, чем у пролонгированных нитратов, включая нитроглицерин. Достаточно упомянуть, что некоторые ДНКЖ способны заменить и такой популярный препарат, как виагра.

Изучение короткоживущих активных соединений, выполняющих функцию регуляторов на различных уровнях организации, — одна из самых интересных задач, стоящих сейчас перед биохимиками. К таким молекулам относятся оксид азота и активные формы кислорода. Заболевания, вызванные их повышенным образованием в организме, — не единственный результат их действия. Эти вещества необходимы нам для нормальной жизнедеятельности, а могут стать и очень перспективными лекарственными препаратами.

4

Действие NO и ДНКЖ при атеросклеротическом поражении сосудов. Атеросклероз вызывается множеством взаимосвязанных процессов, таких как образование оксида азота эндотелиальной NO-синтазой (eNOS), продукция супероксида нейтрофилами, накопление в ЛПНП продуктов окисления липидов (LOOH)

также могут быть донорами NO. В наших экспериментах эти комплексы защищали связанный с ними гемоглобин от окислительной модификации. Именно гемоглобиновые ДНКЖ разрушаются под действием активных форм кислорода и азота. Мы полагаем, что свойства гемоглобиновых динитрозильных комплексов делают их кандидатами на роль сенсоров, чувствительных к определенному уровню окислительного стресса. Таким образом, Hb-SNO, HbNO и ДНКЖ образуют пул депонированного NO в организме.

Кроме гемоглобина человека, SH-аминокислоты содержатся в гемоглобине аскариды и несимбиотических растительных гемоглобинах. Только SH-аминокислоты у этих гемоглобинов расположены не на поверхности молекулы, как у нашего гемоглобина, а внутри, рядом с гемом. Эти SH-группы выполняют функцию связывания NO, который затем взаимодействует с кислородом, связанным с гемом, — в результате образуется нитрит. По мнению некоторых исследователей, эти гемоглобины представляют собой пример более древнего механизма детоксикации NO с участием SH-групп.

На смену нитроглицерину

В настоящее время различные физиологические формы динитрозиль-

ных комплексов железа изучаются в Институте химической физики РАН, в Кардиоцентре и в нашей лаборатории. Результатом исследований стала разработка препаратов ДНКЖ, проходящих испытание в качестве перспективных фармакологических средств. До сих пор для лечения гипертонической болезни использовались так называемые пролонгированные нитраты (например, известный всем нитроглицерин). Однако эти доноры NO — не природные соединения. Кроме того, со временем организм привыкает к этим препаратам, что существенно снижает их эффективность. В то же время ДНКЖ, содержащие цистеин или глутатион, представляют собой естественные производные NO, ответственные за многие его физиологические функции.

Терапевтическое действие ДНКЖ в процессе атеросклеротического поражения сосудов показано на рисунке 4. Известно, что одна из причин возникновения атеросклероза — как раз окислительный стресс. Упрощенно его влияние можно описать так: макрофаги поглощают окисленные липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), после чего превращаются в пенистые клетки. Гибель этих клеток приводит к образованию на стенке сосуда атеросклеротической бляшки. При этом оксид азота, как ему свойственно, действует в нескольких на-

