

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГЕМОПРОТЕИНОВ

©2007 г. А. Н. ОСИПОВ, Г. Г. БОРИСЕНКО,
Ю. А. ВЛАДИМИРОВ

*Российский государственный медицинский университет, Москва,
Научно-исследовательский институт физико-химической
медицины Росздрава, Москва,
Факультет фундаментальной медицины Московского
государственного университета им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Химические и биологические свойства NO.
III. Взаимодействие гем-содержащих белков с оксидом азота.
IV. Фотохимические реакции гемопротеинов, связанных с лигандами.
VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Открытие Р. Фуршготтом фактора, вызывающего расслабление гладкой мускулатуры сосудов, образующегося в эндотелии и получившего в связи с этим название «эндотелиальный фактор расслабления сосудов» (endothelium-derived relaxing factor, EDRF), заставило исследователей по-новому взглянуть на роль эндотелиальных клеток в организме [1]. К началу 90-х годов XX века свойства EDRF были уже достаточно хорошо изучены и были приняты предположения о том, что в состав EDRF входит молекула оксида азота [2]. Исследования

Принятые сокращения: •ОН – гидроксильный радикал; cGMP – цикло ГМФ; cNOS – конститутивная изоформа NO синтазы; cyt a₃²⁺-NO – нитроцитохром a₃ в восстановленном состоянии; cyt a₃³⁺-NO – нитроцитохром a₃ в окисленном состоянии; cyt c²⁺ – восстановленный цитохром c; cyt c²⁺-NO – восстановленный нитроцитохром c; cyt c³⁺ – окисленный цитохром c; cyt c³⁺-NO – окисленный нитроцитохром c; deoxyHb – дезоксигемоглобин; DETA-NONOate – соединение, распадающееся с выделением свободного NO; (см. окончание на сл. стр.)

Адрес для корреспонденции: anosipov@yahoo.com

Авторы благодарят РФФИ за финансовую поддержку исследований, положенных в основу данного обзора, гранты 06-04-49296 и 05-04-49765.

показали, что именно NO может связываться с гемом в активном центре гуанилат-циклазы, образуя комплекс, активность которого во много раз превышает активность нативного фермента [3]. В 1998 г. за исследование физиологической роли оксида азота Р. Фуршготту, Л. Иньярро и Ф. Мураду была присуждена нобелевская премия.

Интерес к NO первоначально был вызван его способностью регулировать тонус сосудов. Однако очень скоро список биологических функций NO значительно расширился. Оксид азота оказалась связан с передачей сигналов нейронами, иммунными реакциями, репродуктивными и другими функциями. Таким образом, молекула, долгое время считавшаяся токсичной и потенциально канцерогенной, проявила разнообразные физиологические свойства, и в 1992-м году журнал Science присвоил ей статус «молекулы года».

Однако, физиологической активностью обладает не только оксид азота, но и многочисленные продукты его превращения. Среди них особое место занимают пероксинитрит, нитриты и нитраты, а также нитрозотиолы и гемовые и негемовые нитрозильные комплексы. За исключением пероксинитрита, все они способны при определенных условиях выделять оксид азота в свободном виде, и таким образом, являются депо NO. Предлагаемый обзор как раз и посвящен рассмотрению механизмов образования и распада нитрозильных комплексов гемопротеинов и их биологической роли.

Принятые сокращения (окончание): DNIC – dinitrosyl iron complexes, динитрозильные железосерные комплексы; EDRF – endothelium-derived relaxing factor, эндотелиальный фактор расслабления сосудов; Hb – гемоглобин; Hb(I)* – возбужденное состояние гемоглобина; Hb(II)* – возбужденное состояние гемоглобина; Hb-4Fe^{IV}=O – феррил гемоглобин; Hb₄NO – нитрозилированный гемоглобин; Hb₄O₂ – оксигемоглобин; HbCO – карбоксигемоглобин; HbNO – нитрозогемоглобин; HbO₂ – оксигемоглобин; Hb-SNO – S-нитрозогемоглобин; heme-Fe²⁺ – гем, содержащий двухвалентное железо; heme-Fe²⁺-NO – нитрозилированный гемм; iNOS – индуцибельная форма NO-синтазы; IP₆ – гексаинозитолфосфат; LPS – липополисахариды; Mb-Fe^{IV}=O – феррил миоглобин; metHb – метгемоглобин; metMb – метмиоглобин; mtNOS – митохондриальная изоформа NO-синтазы; NO – оксид азота; NO⁻ – нитроксил-анион; NO⁺ – нитрозоний-катион; NO₂ – радикал двуоксида азота; NO₂⁻ – нитрит; NO₃⁻ – нитрат; O₂⁻ – супероксидный радикал; ONOO⁻ – анион пероксинитрита; RSH (RS⁻) – тиолы; (протонированная (депротонированная) формы); RS-NO – нитрозотиолы; TNF – tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли; CTC – сверхтонкая структура; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

II. ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА NO

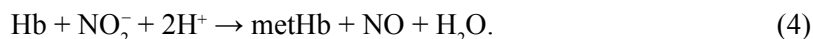
ОБРАЗОВАНИЕ NO *IN VIVO*

Существует немало интересных обзоров о химических и биологических свойствах оксида азота, например, одним из них является работа Винка и Митчелла [4]. Тем не менее, мы решили привести здесь краткий анализ свойств NO, т.к. они имеют прямое отношение к обсуждаемому предмету. Существует два основных пути образования оксида азота *in vivo*: ферментативный и неферментативный. Под неферментативным путем обычно понимают восстановление нитритов или нитратов до NO. Данная реакция протекает либо как диспропорционирование нитрита или азотистой кислоты при закислении среды, либо как прямое восстановление нитрита (например, ионами Fe). Диспропорционирование нитрита становится существенным при pH < 6 [5]. Для этой реакции Цвайер предложил следующий механизм:



Однако этот механизм может иметь место лишь в состояниях, сопровождающихся закислением среды, например, при ишемии или воспалении, прямое же восстановление нитрита в присутствии гемопротеинов происходит при нейтральных pH [6].

Среди гемсодержащих белков, обладающих нитритредуктазной активностью, выделяют гемоглобин, миоглобин, цитохром с оксидазу и цитохром P-450 [7, 8]. Примерная схема реакции, предложенная для Hb [9] такова:



Ферментативный синтез NO в клетках осуществляется семейством белков с общим названием «NO-синтаза» [10, 11]. NO синтезируется NO-синтазой путем превращения L-аргинина в L-цитруллин в реакции, идущей через присоединение двух атомов кислорода [12]. Т.е. синтез NO является кислород-зависимым процессом. Различают конститутивную и индуцибельную изоформы NO-синтазы [13]. Конститутивная изоформа представлена нейрональной и эндотелиальной NO-синтазами. Нейрональная (nNOS) экспрессируется в нейронах, микроглии, астроцитах и мышечных клетках скелетной мускулатуры. Эндотелиальная NO-синтаза (eNOS) экспрес-

сируется в эндотелиальных и гладкомышечных клетках [14, 15]. Для активации nNOS и eNOS необходимо присутствие ионов Ca^{2+} и кальмодулина. eNOS обеспечивает постоянный уровень NO, который в эндотелии составляет, примерно, 4 пМ/мин на мг белка. Суточная продукция NO только одним эндотелием составляет около 1,7 мМ, а стационарная концентрация NO в плазме крови находится в диапазоне 3 нМ [16]. Индуцибельная NO-синтаза (iNOS) может присутствовать в нейтрофилах и макрофагах, т.е. в клетках, присутствующих в очаге воспаления, и синтезируется в ответ на воздействие, например, цитокинов или липополисахаридов. В отличие от nNOS и eNOS индуцибельной NO-синтазе не требуется присутствия ионов Ca^{2+} для активации.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКСИДА АЗОТА

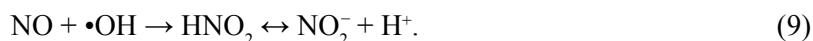
Оксид азота существует в трех формах, которые могут переходить друг в друга при окислении или восстановлении. Кроме собственно радикала NO существуют еще две формы: нитрозоний-катион (NO^+) и нитроксил-анион (NO^-), которые образуются, соответственно, в ходе окисления или восстановления оксида азота. К основным реакциям NO следует отнести его реакции с кислородом, свободными радикалами (в том числе O_2^- , $\bullet\text{OH}$), тиолами и металлами переменной валентности.



В этом процессе убывание NO соответствует реакции первого порядка ($k = 0,124 \text{ c}^{-1}$) [17]. Скорость реакции NO с супероксидным анион-радикалом, очень высока и ограничена только быстротой диффузии частиц друг к другу ($6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$). Она приводит к образованию высокоактивного соединения – пероксинитрита [18]:



Эта реакция лежит в основе механизма повреждения клеток и тканей при ишемии/реоксигенации, т.к. именно реоксигенация сопровождается повышенным образованием супероксидного анион-радикала [19]. Весьма эффективно NO реагирует и с другими радикалами: например, в реакции с гидроксильным радикалом образуется нитрит:



Взаимодействие с пероксильными и алкоксильными радикалами липидов приводят к обрыву цепи перекисного окисления липидов в результате восстановления этих радикалов до гидропероксидов или оксипроизводных липидов [20, 21]. Таким образом, NO может активно участвовать и в регуляции процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов.

С гемсодержащими белками оксид азота может взаимодействовать двумя путями: 1) образуя нитрозильный комплекс с железом в активном центре (константа взаимодействия, как правило, варьирует в пределах 10^3 – 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ в зависимости от окружения гема), либо, 2) вступая в окислительно-восстановительные реакции, в которых она почти всегда выступает в роли восстановителя. Так NO может ингибировать работу циклооксигеназы и липоксигеназы за счет восстановления соединения I или II (пероксидазного цикла), образующихся в ходе ферментативного акта [22], а также восстанавливать феррилгемоглобин до metHb [23].

Так, результаты наших исследований показали, что NO может реагировать с сильными окислителями, например, с соединениями I или II пероксидазного цикла, содержащим Fe^{+5} или Fe^{+4} , восстанавливая их до обычного состояния с валентностью железа в геме +3 без образования нитрозильных комплексов. Благодаря восстановлению оксоферрильных радикалов в Mb и Hb NO демонстрирует антиоксидантные свойства [23]. В наших исследованиях было показано, что оксоферрильные радикалы $Mb-Fe^{+4}=O$ и $Hb-Fe^{+4}=O$, образующиеся в присутствии H_2O_2 или органического гидропероксида (например, гидропероксида трет-бутила), обладают высокими прооксидантными свойствами, а добавление NO тормозит окислительные процессы, индуцированные $Mb-Fe^{+4}=O$ и $Hb-Fe^{+4}=O$, восстанавливая оксоферрильные радикалы до metMb и metHb [23].

Для реакций NO^+ характерны реакции присоединения и замещения с нуклеофилами и ароматическими соединениями. Среди органических соединений, вступающих в эти реакции, следует упомянуть амины, карбоксилы и тиолы. В физиологических условиях тиолы наиболее активны и могут реагировать с образованием сравнительно устойчивых нитрозотиолов [24, 25]:



Металлы переменной валентности также участвуют в реакциях с NO и его производными. Так, ионы Cu и Fe могут катализировать распад нитрозотиолов с образованием NO, NO^+ и RSSR или RS^- [26, 27]. Например:



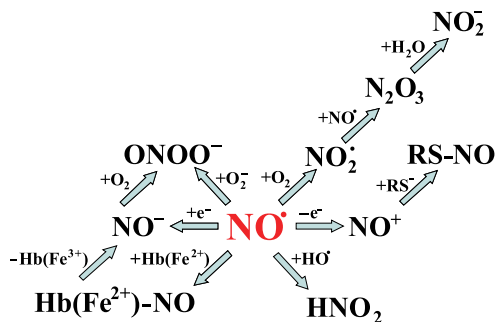


Рис. 1. Схема основных химических реакций оксида азота.

Эта реакция обратима, и равновесие в ней часто смещается в сторону образования RS-NO [28]:



Кроме того, NO может образовывать негемовые моно- и динитрозильные железосерные комплексы [29, 30]. Таким образом, металлы переменной валентности и гемсодержащие белки могут образовывать комплексы с NO и способствуют взаимопревращению ее редокс-форм.

Учитывая высокую скорость реакций NO с кислородом и другими соединениями (такими как, супероксидный анион-радикал, ионы металлов и радикалы) время жизни свободного NO в клетках и тканях невысоко. По данным разных авторов, оно составляет около 100 мс в плазме крови, а расстояние, на которое может диффундировать NO, не превышает 200 мкм от места образования [31, 32]. Эти обстоятельства и определяют основные свойства NO: действие NO проявляется в непосредственной близости от места синтеза, большое значение приобретают процессы, протекающие с участием внутриклеточных комплексов, входящих в пул оксида азота в организме. Основные химические реакции оксида азота суммированы на рис. 1.

ПУЛ ОКСИДА АЗОТА В ОРГАНИЗМЕ

Относительно стабильной формой существования NO в клетках считают динитрозильные железосерные комплексы (dinitrosyl iron complexes, DNIC). В образовании этих комплексов участвуют тиоловые группы белков или низкомолекулярных тиолов (например, цистеина или глутатиона) и негемовое железо [33]. Такие комплексы образуются в макрофагах и эндотелиальных клетках, и их рассматривают как основное депо (пул) NO в организме [34]. Существуют экспериментальные данные о том, что NO может высвобож-

даться из эндотелиальных клеток не в свободной форме, а в форме DNIC. Известно также, что низкомолекулярные тиолы (например, цистеин или глутатион) конкурируют с тиоловыми группами белков за образование нитрозильных комплексов. Наконец, картину свойств DNIC дополняет и тот факт, что они имеют, практически, такую же физиологическую активность и стабильность, что и EDRF и, следовательно, могут участвовать в реализации биологического действия NO [35].

Динитрозильные комплексы негемового железа существуют в динамическом равновесии с S-нитрозотиолами, продуктами взаимодействия оксида азота и тиолов. Так же, как и DNIC, нитрозотиолы обладают EDRF-подобной активностью, но время их жизни гораздо короче [36]. Так же, как и динитрозильные комплексы негемового железа S-нитрозотиолы являются одной из форм депонирования NO в клетках. Наиболее стабильными среди них являются S-нитрозопротеины. Поэтому не удивительно, что около 95% S-нитрозотиолов плазмы составляет нитрозилированный альбумин [2]. Концентрация S-нитрозотиолов в плазме на 3–4 порядка выше чем концентрация свободного NO; распад нитрозопротеинов катализируется ионами металлов переменной валентности, среди которых первое место занимают ионы железа [27, 28].

Наряду с нитрозилированием цистеинового остатка альбумина, NO может нитрозилировать и гемоглобин, взаимодействуя с Cys93 β-цепи и образуя S-нитрозогемоглобин (Hb-SNO) [37]. Долгое время считалось, что основной реакцией NO и оксигемоглобина, составляющей основную фракцию Hb как в артериальной (~90%), так и в венозной (70%) крови, является реакция образования нитрата:



Однако, Стэмлер и соавт. обнаружили в артериальной крови крыс около 0,3–0,4 нМ Hb-SNO, тогда как в венозной крови Hb-SNO практически не обнаруживался. Авторы предположили, что Hb-SNO образуется в организме, и, также, может служить донором NO. Было найдено также, что если Hb-SNO находясь в R-конформации (оксиHb), переходит в T-конформацию (дезоксигемоглобин) с выделением кислорода, то происходит разрыв нитрозотиольной связи и освобождается NO. Стэмлеру и соавт. удалось показать, что Hb-SNO оказывает сосудорасширяющее действие и усиливает кровоток в сосудах, в отличие от HbO₂, который вызывает сокращение сосудов, поскольку превращает NO в нитрат [38]. Таким образом, Hb-SNO, как в свободном виде, так и в составе эритроцитов, обладает EDRF-подобными свойствами.

Нельзя, также, забывать и тот факт, что NO может реагировать не только с SH-группами Hb, но и с его гемом, образуя нитрозильные комплексы (HbNO). HbNO обнаружен в плазме крови при ишемии [39], некрозе опухолей [40], гипертермии [41] и отторжении аллотрансплантата [42]. В то же время известно, что эритроцитарный Hb реагирует с NO на 2–3 порядка медленнее, чем внеэритроцитарный, и до середины 90-х годов XX века полагали, что эритроциты *in vivo* не могут аккумулировать NO [43]. Более того, считалось, что оксигемоглобин при взаимодействии с NO скорее окисляется, чем образует комплексы [44]. Однако, в 1996 году Стэмлер и соавт. обнаружили, что и артериальная и венозная кровь у крыс содержит HbNO (0,6 и 0,9 нМ, соответственно) [37]. В экспериментах *in vitro* было показано, что при физиологических соотношениях NO и Hb (~ 1 : 1000) и физиологическом насыщении Hb кислородом, от 10% до 40% оксида азота участвует в образовании нитрозильных комплексов [45, 46], а оставшаяся часть NO – в образовании Hb-SNO. Изменение конформации гемоглобина (R-T переход) сопровождается переносом части NO от SH-группы цистеина к гему или выделению ее в свободном виде [45].

Таким образом, и Hb-SNO и HbNO и нитрозильные комплексы негемового железа образуют большой пул депонированного NO [8]. Однако, взаимодействие NO с тиолами или гемом и образование соответствующих нитрозильных комплексов могут рассматриваться не только как реакции, приводящие к депонированию NO, но и как реакции, с помощью которых может быть изменена активность фермента, если тиолы или гем входят в состав его активного центра.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФУНКЦИИ NO

NO способен изменять активность ферментов, взаимодействуя с их функционально важными группами и в первую очередь, с Fe гема и тиолами. Наиболее впечатляющим примером этого является активация гуанилат-циклазы. Присоединение NO к железу гема регуляторной субъединицы гуанилат-циклазы вызывает разрыв связи между Fe и азотом имидазольной группы гистидина, в результате чего изменяется как структура активного центра, так и конформация белка [47]. Активность фермента возрастает в десятки раз, что приводит к увеличению уровня сGMP. Если клеткой-мишенью оказываются тромбоциты, то повышение сGMP вызывает снижение свертываемости крови. В случае гладкомышечной клетки, увеличение внутриклеточного сGMP приводит к расслаблению гладкой мускулатуры. Данный механизм лежит в основе таких физио-

логических явлений, как регуляция тонуса сосудов, регуляция тонуса сфинктера Одди в двенадцатиперстной кишке и некоторых других.

Наряду с гуанилат-циклазой, NO образует нитрозильные комплексы с гемом цитохрома a_3 и Cu_b в активном центре цитохром c оксидазы – терминального акцептора электронов митохондриальной транспортной цепи. Эти комплексы нестабильны и, по-видимому, являются промежуточными продуктами реакции, которая заканчивается восстановлением NO до NO^- [48]. В результате взаимодействия NO с цитохром c оксидазой обратимо ингибируется клеточное дыхание [49].

Другой механизм влияния NO на активность ферментов – это нитрозилирование SH-групп, определяющих активность ферментов. Как правило, восстановление или окисление таких групп вызывает конформационные перестройки белка, отражающиеся на его ферментативной активности. Примером этого является изменение активности глутаматных рецепторов. Оксид азота нитрозилирует SH-группы глутаматных рецепторов постсинаптических мембран. В результате изменяется конформация рецепторного комплекса, и он переходит в неактивное состояние. По такому механизму NO модулирует передачу нервных импульсов в нейронах головного мозга [50].

Реакции S-нитрозилирования/денитрозилирования протеинов являются, одним из механизмов передачи внутриклеточных сигналов. Таким образом, может регулироваться запуск каскада сериновых протеаз (каспаз), участвующих в запрограммированной клеточной смерти (апоптозе) [51]. Одним из возможных механизмов запуска апоптоза является Fas-индуцированный апоптоз, а ключевым ферментом, определяющим начало протеолитического каскада, является каспаза 3. В клетке каспаза 3 обычно находится в неактивном состоянии (в виде прокаспазы 3) и для ее активации (превращения в каспазу 3) необходимо отщепление каталитически активной субъединицы. В некоторых случаях этого оказывается недостаточно, поскольку цистеин, расположенный в активном центре каспазы 3, находится в нитрозилированном состоянии, а S-нитрозилированный белок имеет низкую ферментативную активность [52]. Денитрозилирование служит вторым условием активации. Оба процесса активации каспазы 3 (частичный протеолиз и денитрозилирование) обеспечивает белок Fas [51]. Однако, вторичное S-нитрозилирование ингибирует каспазу 3 и останавливает апоптоз. Таким образом, инициирование апоптотического каскада реакций зависит от уровня NO в клетке.

Наконец, NO может нитрозилировать SH-группы белков, участвующие в транспорте и депонировании металлов переменной валентности. К таким белкам относятся, например, белки, участвующие в метаболизме меди и металлотioneины [53, 54]. Характерной

чертой структуры этих белков является наличие аминокислотных последовательностей с высоким содержанием цистеина. SH-группы цистеиновых остатков образуют стабильные комплексы с Cu и обеспечивают функциональную активность белков. NO, образуя нитрозильные комплексы, вытесняет медь и, таким образом, вызывает освобождение меди [55]. Освобожденная медь может катализировать окислительные процессы в клетке (в первую очередь Фентон-подобные реакции), которые, в свою очередь, могут стать причиной некроза или апоптоза [56]. Кроме того, медь, освобожденная из металлотионеина, может попадать в апопротеин супероксиддисмутазы и, таким образом, увеличивать пул активного фермента [55, 57].

Регуляция активности ферментов через образование нитрозильных комплексов – феномен, имеющий большое значение не только при обычных физиологических условиях, но и при возникновении патологических процессов.

УЧАСТИЕ NO В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Являясь регулятором тонуса сосудов (и тем самым кровяного давления), NO участвует и в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний, включая, гипертоническую болезнь и атеросклероз. Хорошо известна защитная роль NO в начальной стадии ишемии, как фактора, улучшающего кровоток и снижающего повреждение тканей [58]. Способность NO влиять на легочный кровоток и тонус бронхов нашло терапевтическое применение [59]. Например, S-нитрозоглутамат (естественный метаболит NO), регулирует воздушное сопротивление бронхов [36]. В роли нейромедиатора периферической нервной системы NO обеспечивает репродуктивные функции у мужчин и может иметь решающее значение при лечении импотенции [60].

NO принимает участие в воспалительных и иммунных процессах. Так макрофаги, активированные γ -интерфероном, TNF и LPS, резко увеличивают синтез NO и ONOO⁻, повреждают бактериальные клетки и, таким образом, обеспечивают антимикробное действие. В то же время, образование NO в токсических количествах при сепсисе играет негативную роль. Снижение сосудистого тонуса и неизбежное падение артериального давления под действием NO может стать критическим и привести к шоку. Повышенный синтез NO и ONOO⁻ при ишемии/реоксигенации обуславливает повреждение тканей и смерть клеток [18]. Токсичность NO на клеточном уровне связывают с образованием нитрозильных комплексов гемовых белков и/или их S-нитрозилированием. Следствием таких модификаций является ингибирование ферментов дыхательной цепи, цикла Кребса, синтеза ДНК. Кроме того, развитие окислительного стресса, в присутствии

NO, обусловлено продукцией мощного оксиданта ONOO⁻, который необратимо ингибирует ферменты, окисляет липиды и ДНК.

Таким образом, с одной стороны, NO благодаря образованию ONOO⁻ может выступать в качестве прооксиданта а, с другой, будучи перехватчиком свободных радикалов и восстановителем, – может играть роль антиоксиданта. NO легко реагирует с другими свободными радикалами и, таким образом, может приводить либо к обрыву цепи перекисного окисления липидов, либо к торможению его иницирования [20, 21].

В ряде патофизиологических процессов, протекающих с участием NO, нитрозильные комплексы гем-содержащих белков могут играть важную роль. В первую очередь, это касается состояний, связанных с нарушениями кровообращения – ишемии, гипертензии, шока, при которых происходит образование нитрозильных комплексов гуанилат-циклазы. С образованием нитрозильных комплексов цитохромов транспортной цепи электронов может быть связано снижение клеточного дыхания и повышенная продукция свободных радикалов митохондриями при воспалительных и нейродегенеративных процессах [61].

III. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕМ-СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ С ОКСИДОМ АЗОТА

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Особый интерес исследователей к нитрозильным комплексам гемопротеинов был вызван тем, что, во-первых, эти комплексы имеют важные биологические функции и, во-вторых, образование нитрозильных комплексов сопровождается изменением свойств гема в результате присоединения NO, которые удобно регистрировать спектральными методами. Классическими примерами этого являются гемоглобин и цитохром *c* оксидаза [62–64].

Железо в геме имеет шесть координационных связей. Четыре из них – связи с атомами азота порфиринового кольца – находятся в плоскости гема. Оставшиеся 5-я и 6-я связи расположены аксиально, т.е. перпендикулярно плоскости гема и в гемсодержащих белках они, как правило, заняты атомами азота имидазольных групп или серы аминокислотных остатков полипептидной цепи. Белки, в которых 6-я координационная связь железа гема свободна (например, гемоглобин, миоглобин, пероксидазы) реагируют с NO быстрее, чем белки, в которых все координационные связи заполнены (например, цитохром *c*),

так как им требуется дополнительная энергия, для вытеснения 6-го лиганда.

Для белков, находящихся в феррисостоянии и имеющих вакантную 6-ю координационную связь, характерно образование связи с молекулой воды в этом положении, как это происходит в metHb. Наличие этой связи затрудняет реакцию с NO, по сравнению с ферро-состоянием [65]. Этим объясняется тот факт, что гем реагирует с NO быстрее в ферро- (10^7 – 10^8 М⁻¹с⁻¹), чем в ферри-состоянии (10^2 – 10^7 М⁻¹с⁻¹) [66]. Скорость диссоциации такого комплекса, наоборот, обычно выше для ферри-состояний (Fe³⁺-NO).

Образование комплекса между гемом и NO приводит к изменению основных физических свойств гема: происходит изменение оптического спектра, а в случае Fe²⁺-NO появляется парамагнетизм и этот комплекс имеет сигнал ЭПР с $g \sim 2,0$ [63, 67]. В отличие от комплекса Fe²⁺-NO, комплекс Fe³⁺-NO является диамагнитным. [68].

Нитрозильные комплексы гемопротеинов обладают достаточно высокой стабильностью. Например у гемоглобина, сродство к NO составляет 10^{12} М⁻¹. Наряду с этим, NO и гем могут участвовать в окислительно-восстановительных реакциях. NO не является ни сильным восстановителем, ни сильным окислителем ($E_{NO/NO^+} = 380$ мВ, $E_{NO/NO^-} = 1210$ мВ) [69], поэтому направление этих реакций, по большей части, зависит от редокс-свойств конкретного белка и условий протекания реакции:



Несмотря на то, что окислительно-восстановительные процессы в геме обратимы, последующие реакции образовавшихся продуктов могут значительно сместить равновесие системы в ту или иную сторону и сделать процесс практически необратимым.

НИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГЕМОГЛОБИНА

Нитрозильные комплексы гемоглобина впервые были описаны в шестидесятых годах XX века [64]: они образуются при соединении NO с железом гема. Причем, атом Fe в парамагнитных комплексах, находится в восстановленном состоянии (heme-Fe²⁺-NO). Парамагнетизм комплекса объясняется наличием в системе неспаренного электрона, принадлежащего NO[•]. Обе формы гемоглобина – окисленная (Hb(Fe³⁺) – metHb) и восстановленная (Hb(Fe²⁺)) могут реагировать с NO. Реакция metHb обратима, а константы скорости прямой и обратной реакций сравнительно невелики (табл. 1).

Таблица 1.
Константы скорости реакции NO и Hb

Форма Hb	$K_{\text{acc}} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$K_{\text{дисс}} \text{ c}^{-1}$	Ссылка
metHb, α -цепь	$1,7 \times 10^3$	0,65	[66]
metHb, β -цепь	$6,4 \times 10^3$	1,5	[66]
Hb, R-конформация	$1,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^{-5}$	[72, 73]
Hb, T-конформация	$1,4 \times 10^7$	$3,0 \times 10^{-3}$	[72, 73]
Hb, α -цепь	$2,4 \times 10^7$	$4,6 \times 10^{-5}$	[72, 73]
Hb, β -цепь	$2,4 \times 10^7$	$2,2 \times 10^{-5}$	[72, 73]



Реакция Hb (деохиHb) с NO ограничена только скоростью диффузии и практически необратима. Связывание NO в отличие от связывания кислорода не носит кооперативного характера. Это подтверждается зависимостью насыщения гемоглобина от концентрации NO, а также тем, что образование связи NO с гемом не требует существенных изменений структуры белка [70, 71].

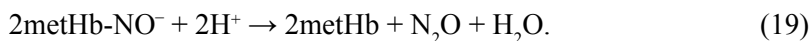
Благодаря низкой скорости диссоциации нитрозильных комплексов Hb, сродство деохиHb к NO ($K = 10^{12} \text{ M}^{-1}$) на три порядка выше, чем к CO [44]. Поэтому оксид азота может вытеснить CO из карбоксигемоглобина (HbCO):



Однако в отличие от CO, который вызывает симптомы отравления, оксид азота не только не вызывает негативных последствий, но успешно применяется для лечения легочной гипертензии новорожденных [74]. Этот эффект объясняется тем, что молекула CO, связавшись с одной из субъединиц деохиHb, переводит белок в R-состояние, снижая его сродство к кислороду. Связывание одной молекулы NO с деохиHb также изменяет сродство к O_2 , однако константа связывания сильно зависит от pH. При понижении pH уменьшается сродство Hb к O_2 . Так, при pH 7,4 сродство частично нитрозилированного Hb к кислороду превышает сродство нативного белка (Hb_4NO лучше связывает O_2 , чем Hb_4O_2), а при pH 5,8 наблюдается обратное соотношение: ($\text{Hb}_4\text{NO}(\text{O}_2)_3$ лучше освобождает O_2 , чем $\text{Hb}_4(\text{O}_2)_4$). Таким образом, нитрозилирование способствует улучшению транспорта кислорода к тканям [71].

Реакция полностью насыщенного кислородом HbO_2 с NO протекает с образованием metHb и нитрита с константой скорости $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [75]. Однако, в физиологических условиях гемоглобин насыщен кислородом не полностью (от 35% в капиллярах до ~95% в артериальной крови), и число свободных мест связывания (при концентрации гемоглобина в крови ~2 мМ) заметно превышает концентрацию NO (<1 μM). В этих условиях, наряду с реакцией окисления гемоглобина NO , идет реакция образования нитрозильных комплексов [45]. Кроме того, формирование HbNO обнаружено при реакциях S-нитрозотиолов с HbO_2 [76]. И последнее, образование HbNO показано не только в растворах Hb , но и при обработке оксидом азота цельных эритроцитов [37, 77].

HbNO может распадаться с образованием метгемоглобина [46]:



Изучать структуру нитрозильных комплексов очень удобно с помощью метода ЭПР. Сигнал ЭПР нитрозильных комплексов в большинстве случаев представляет собой одиночную, слегка асимметричную линию с g-фактором 2,03. Изменение структуры комплекса, вызванное воздействием на белковую глобулу, например, гексаинозитолфосфата (IP_6) или додецилсульфата натрия, приводит к появлению триплетной сверхтонкой структуры (СТС) в спектре ЭПР. Центральная компонента СТС имеет $g = 2,01$ и константу расщепления 16,5 Гс. Механизм этого явления следующий. Известно, что неспаренный электрон в HbNO локализован в основном на d-орбиталях железа и лишь незначительно на π -орбиталях азота [78]. При добавлении IP_6 (или додецилсульфата натрия) связь железа с гистидином белковой глобулы разрывается и образуется 5-ти координированный гем. Железо гема смещается в сторону NO и появляется СТС [78,79]. СТС характерна только для α -цепей HbNO (см. рис. 2) [72]. Такое смещение атома Fe α -цепей в направлении связи с NO приводит к тому, что гем приобретает куполообразную форму и в результате этих перестроек образуется высокоспиновый комплекс. Такое влияние лиганда на связь гема с проксимальным гистидином является характерной особенностью взаимодействия Hb с NO . Если в качестве лиганда выступает CO или O_2 , то связь Fe-His не изменяется [71].

Хилл и соавт. пришли к выводу, что все многообразие спектров ЭПР, наблюдающееся в экспериментах, является лишь комбинацией

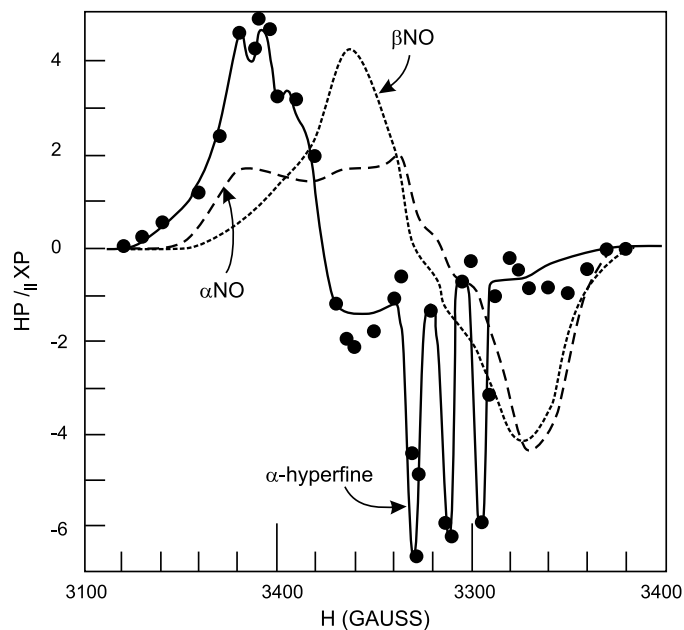


Рис. 2. Спектры ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина: 6-ти координированных α NO и β NO и 5-ти координированных α -цепей NO [63].

По оси абсцисс отложена напряженность магнитного поля (H, гауссы); по оси ординат – интенсивность сигнала ЭПР (dX''/dH). α NO, β NO и α -hyperfine – спектры ЭПР нитрозильных комплексов α -цепи и β -цепи (в 6-координированном состоянии) и α -цепи (в 5-координированном состоянии, можно видеть появление сверхтонкой структуры).

сигналов α - и β -цепей с 6-ти координированным Fe (α NO и β NO) и α -цепи с 5-ти координированным железом ($\alpha(5)$ NO) (рис. 1) [63]. Доля фракции $\alpha(5)$ NO зависит от разных причин. Она увеличивается при понижении pH, а также по мере снижения насыщения Hb [63, 71]. Так при pH = 6 HbNO, насыщенный на 10%, имеет $\alpha(5)$ NO-сигнал, при pH = 8 и полном насыщении гемоглобина оксидом азота его спектр ЭПР не содержит СТС вообще. Очевидно, эффект pH объясняется величиной рК гистидина, участвующего в образовании связи: с повышением pH она становится все более стабильной, и все гемы переходят в 6-ти координированное состояние. Увеличение фракции $\alpha(5)$ NO при снижении насыщения Hb связано с тем, что сродство α -цепи к NO выше, чем β -цепи (табл. 1) [71–73].

Таблица 2
Константы скорости реакции NO и цитохрома *c*

Форма цитохрома	$K_{\text{асс}}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$K_{\text{дисс}}, \text{c}^{-1}$	Ссылка
cyt c^{2+}	8,3	$2,9 \times 10^{-5}$	[87, 88]
cyt c^{3+}	$7,2 \times 10^2$	$4,4 \times 10^{-2}$	[87, 88]
cyt c^{3+}	$1,3 \times 10^3$	$8,7 \times 10^{-2}$	[89]

НИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЦИТОХРОМА *C*

Другим важным гемопротеином, образующим нитрозильные комплексы является цитохром *c*. Цитохром *c* как и гемоглобин образует нитрозильные комплексы, как в окисленном, так и в восстановленном состоянии (cyt c^{2+} и cyt c^{3+}):



В отличие же от гемоглобина эти реакции протекают гораздо медленнее (табл. 2). Константы равновесия для нитрозильных комплексов цитохрома в восстановленном и в окисленном состоянии (cyt $c^{2+}\text{-NO}$ и cyt $c^{3+}\text{-NO}$) равны соответственно $2,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Они, также оказываются на несколько порядков ниже, чем для нитрозильных комплексов Hb. Это объясняется, по-видимому, тем, что в нативном цитохроме *c* гемовое железо находится в 6-ти (а не в 5-ти, как в гемоглобине) координированном состоянии. Обе формы белка (окисленная и восстановленная) имеют кроме четырех основных лигандов, принадлежащих гему, еще два аксиальных лиганда: гистидин (His18) и метионин (Met80).

Оказалось, однако, что скорость взаимодействия малых лигандов (таких как NO или H_2O_2) с гемопротеинами, имеющими 6 координационных связей можно изменить. Это явление было изучено нами на примере цитохрома *c*. Проблема оказалась особенно интересной еще и потому, что взаимодействие цитохрома *c* NO и/или H_2O_2 играет важную роль при развитии апоптотических процессов в митохондриях. Суть явления заключается в том, что при взаимодействии цитохрома *c* с некоторыми отрицательно заряженными липидами (в первую очередь, такими как кардиолипин и фосфатидилсерин) наблюдается появление/увеличение пероксидазной активности у комплекса цитохром *c*/анионный липид. Это связано с тем, что ускоряется взаимодействие

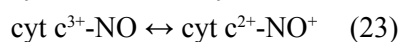
ионов Fe с H_2O_2 . Взаимодействие с кардиолипином изменяет структуру и свойства молекулы цитохрома *c*. При этом, как показывают данные ЭПР [80], спектроскопии комбинационного рассеяния [81] и ^{31}P -ЯМР [82], гемовый канал в структуре цитохрома *c* раскрывается и железо гема переходит из низкоспинового 6-координированного состояния в высокоспиновую 5-координированную форму. Данные Н-ЯМР показывают, что изменяется также конформация полипептидной цепи и происходит дестабилизация альфа-спиралей [82]. Методом ИК спектроскопии было показано, что вероятно происходит раскручивание около 10% альфа-спиралей [83]. Использование ЯМР позволило предположить, что при связывании цитохрома *c* с кардиолипином происходит увеличение расстояния между метионином-80 и гемом, а также, изменение окружения метионина 65, который входит в состав короткого альфа-спирального участка недалеко от гема [84]. В результате этих внутримолекулярных перестроек происходит удаление (с возможным последующим разрывом связи) метионина-80 и H_2O_2 и/или оксид азота получают доступ к ионам Fe в геме. В случае с пероксидом водорода эти изменения структуры ведут к резкому возрастанию пероксидазной активности цитохрома. Если речь идет о подобных реакциях в митохондриях, то и увеличение пероксидазной активности цитохрома *c* может привести в конечном итоге к нарушению целостности митохондриальной мембраны и выходу цитохрома *c* из митохондрий, что и происходит при апоптозе. Присутствие же молекулы NO вблизи иона железа может привести к образованию нитрозильных комплексов цитохрома *c*. При взаимодействии NO с гемом происходит разрыв связи между метионином и железом, с последующим замещением аминокислоты на NO в качестве 6-ого лиганда. Образование этих нитрозильных комплексов приводит к тому, что 6 координационная связь оказывается занятой, затрудняется доступ H_2O_2 к атому Fe и резко снижается пероксидазная активность цитохрома *c* [85, 86].

Таким образом, низкие скорости реакций и константы равновесия обусловлены энергозатратами, связанными с замещением 6-ого лиганда. Действительно, цитохром *c*, в котором Met80 алкилирован и, следовательно, гемовое железо имеет 5-ти координированную структуру, имеет на два порядка более высокое сродство к NO ($2 \times 10^7 M^{-1}$), чем нативный белок [67].

Нитрозильный комплекс $cyt\ c^{2+}$ ($cyt\ c^{2+}-NO$), так же как и $HbNO$, имеет сигнал ЭПР с $g \sim 2,0$. Как и в случае с Hb, форма спектра соответствует комплексу Fe с ромбической симметрией. На спектре ЭПР замороженного раствора $cyt\ c^{2+}-NO$ отсутствует

СТС, что подтверждает 6-ти координированное состояние железа в комплексе.

Помимо образования нитрозильных комплексов цитохром *c* вступает в окислительно-восстановительные реакции с NO. Описана реакция восстановления цитохрома *c* оксидом азота. По аналогии с другими гемовым белкам была предложена следующая схема реакций [90]:



Шарп и соавт. показали, что комплекс $\text{cyt } c^{3+}\text{-NO}$ может самопроизвольно разрушаться в присутствии кислорода, причем практически весь NO превращается при этом – в нитрит [89]. Кроме того, описана реакция восстановления NO до нитроксил-аниона (NO^-), характеризующая константой скорости $200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [89]:



Подводя итог можно сказать, что и Hb и цитохром *c* могут образовывать достаточно прочные нитрозильные комплексы, которые являются временным депо оксида азота в организме и при определенных условиях могут освобождать NO. Более того, стало известно, что эти нитрозильные комплексы обладают фоточувствительностью и могут разрушаться под действием излучения видимого диапазона.

IV. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ГЕМОПРОТЕИНОВ, СВЯЗАННЫХ С ЛИГАНДАМИ

МЕХАНИЗМЫ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ

О фотолизе комплексов гемопротеинов известно более 100 лет, начиная с работ Холдена и Лоррейна, обнаруживших фотолиз карбокси-гемоглобина (HbCO) при облучении видимым светом [91]. Почти 60 лет спустя Кейлин и Хартри сообщили о фотолизе миоглобинцианида [92]. Позднее, Гибсон и Эйнсворт расширили список фотолизируемых комплексов гемопротеинов, включив в него комплексы с O_2 и NO [93].

Фотохимия гемопротеинов изучалась в основном методами оптической и ИК-спектроскопии. Самым популярным объектом исследования был HbCO, поскольку фотолитический эффект при его облучении наиболее выражен. В 50–60-е годы XX века были измерены квантовые выходы фотолиза различных комплексов Hb, которые

оказались равными для $\text{HbCO} = 0,4$ [94], $\text{HbO}_2 = 0,01$, $\text{HbNO} < 0,001$ [95]. С усовершенствованием техники величина квантового выхода была уточнена и оказалась равной для $\text{HbCO} = 0,7$, $\text{HbO}_2 = 0,08$, $\text{HbNO} < 0,004$ [96]. Появилось множество работ, посвященных быстрой кинетике процессов фотодиссоциации, изучению констант связывания и конформационных переходов комплексов [96, 97]. Своего апогея эти исследования достигли во второй половине 80-х годов XX века, когда появились современные установки для импульсной спектроскопии, и стали возможными измерения вплоть до фемтосекундного диапазона [98]. Оказалось, что квантовые выходы для разных гемовых белков (Hb, Mb) и разных лигандов (CO, O₂, NO) мало отличаются друг от друга [99]. Согласно Петрич и соавт. кинетика этого процесса может быть представлена в виде следующих стадий [98, 99]: (1) переход комплекса гемопротейна с лигандом в возбужденное состояние ($\tau_{1/2} < 50$ фс); (2) фотодиссоциация комплекса и появление спектра deoxyHb ($\tau_{1/2} = 300$ фс); (3) быстрая релаксация, которая соответствует переходу возбужденной молекулы на основной энергетический уровень ($\tau_{1/2} = 2,5\text{--}3,2$ пс); (4) медленная рекомбинация продуктов фотолиза (т.е. реассоциация лиганда с гемом, который отделился под действием излучения, но не успел удалиться) [97]. Процесс медленной рекомбинации имеет различные характерные времена для разных лигандов: 0,1 μs для HbCO, 1–3 нс для HbO₂ и около 10 пс для HbNO.

Сравнительный анализ спектров поглощения комплексов Hb с лигандами, в области полосы Soret показывает, что переход в возбужденное состояние у Hb происходит с характерным временем около 50 фс, независимо от типа лиганда. После диссоциации гемоглобин оказывается в одном из двух возбужденных состояний – Hb(I)* или Hb(II)*. Из Hb(I)* гем релаксирует с $\tau_{1/2} = 300$ фс, а из Hb(II)* – с $\tau_{1/2} = 2,5$ фс. Соотношение форм Hb(I)* или Hb(II)* зависит от типа лиганда. В случае с CO образуется в основном Hb(I)*. И, наоборот, при диссоциации HbNO – наиболее велика вероятность образования Hb(II)*. Последний факт, возможно, и объясняет быструю фазу рекомбинации HbNO (10 пс).

Известно, что при фотодиссоциации комплексов Hb происходят конформационные изменения, как в геме, так и в белковой глобуле. Перестройка гема при фотодиссоциации HbCO хорошо изучена [99]. Этот процесс интерпретируют как «смещение атома железа из плоскости гема» или как «куполообразный изгиб гема». При этом гемовое Fe переходит из низкоспинового состояния в высокоспиновое. Возбужденная форма Hb(I)* является молекулой с куполообразным

гемом. При релаксации в области гема возникают изменения структуры, затрудняющие рекомбинацию гема с лигандом, при этом сам гем возвращается в основное состояние. Конформация Hb(II)^* при релаксации не изменяется, и гем остается плоским и сохраняет способность к быстрой ассоциации с лигандом.

Сходные явления были обнаружены Жу и соавт. при облучении нитрозильных комплексов миоглобина. Им удалось показать, что после поглощения кванта света происходит разрыв связи гем-NO. При этом изменяется спиновое состояние железа, ослабляется связь Fe-His и гем приобретает «куполообразную форму» [100].

Тем не менее, известные механизмы фотолиза HbNO не позволяют сделать однозначного вывода о деталях фотохимических реакций комплексов гемопротеинов с лигандами. Это связано с тем, что подавляющая часть фотолизированных молекул NO быстро рекомбинирует с гемом и не диффундирует в раствор [98, 99]. Известно, что при повторном облучении комплексов гемопротеинов не происходит полного восстановления спектра поглощения исходного белка, т.к. возможны побочные реакции [98, 101]. В результате фотолиза HbNO можно ожидать образование как NO так и его производных – нитроксил-аниона или нитрозоний-катиона. Кроме того, поскольку Hb реагирует с NO с константой скорости $\approx 10^7 \times \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ и имеет родство $\approx 10^{15} \text{M}^{-1}$ можно ожидать, что даже в случае фотодиссоциации свободной молекулы NO, она может вновь соединиться с гемоглобином.

Механизм фотолиза нитрозильных комплексов цитохрома *c* еще мало изучен [87, 88]. Согласно публикациям Хошино и Розе $\text{c}^{3+}\text{-NO}$ и $\text{c}^{2+}\text{-NO}$ также обладают фоточувствительностью и могут распадаться под действием излучения видимого диапазона.

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГЕМОГЛОБИНА

В нашей лаборатории были проведены исследования фотолиза нитрозильных комплексов гемоглобина. Полученные нами экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что при облучении нитрозильных комплексов гемоглобина лазерным излучением He-Cd лазера (441 нм) происходит обратимый разрыв связи гем-NO [102]. При этом железо гема остается в восстановленном состоянии, а NO освобождается в виде свободного радикала. Реакция фотолиза HbNO обратима. Это подтверждают результаты экспериментов, проведенных в анаэробных условиях: (1) комплексы HbNO восстанавливаются в темновой период после облучения; (2)

фотолитический эффект зависит от интенсивности излучения (т.е. имеет место последовательность событий, состоящая из поглощения кванта излучения нитрозильным комплексом, разрыва связи гем-NO и реассоциацией NO и гема с образованием нового нитрозильного комплекса и (3) измеряемый квантовый выход фотолиза HbNO низок и составляет величину $< 0,001$. При облучении HbNO в присутствии кислорода помимо фотолитического распада комплекса и последующей его реассоциации происходят и реакции между продуктами фотолиза (Hb и NO) и кислородом. Реакции с кислородом приводят к тому, что фотолитический эффект становится необратимым (1) перестает зависеть от интенсивности излучения и (2) квантовый выход реакции фотолиза HbNO вырастает до величины $\sim 0,01$.

Таким образом, если фотолиз происходит в отсутствие кислорода, то фотолитический эффект нивелируется быстрой реассоциацией; если в присутствии кислорода – то оба продукта вступают в реакцию с кислородом, и реассоциация продуктов фотолиза становится невозможной [102]. Интересно, что образование свободного NO при облучении раствора HbNO нам удалось зарегистрировать только в анаэробных условиях, в то время как в присутствии кислорода метод спиновых ловушек (с использованием нитронил-нитроксильного радикала в качестве ловушки оксида азота) не дал положительных результатов [102]. Этот факт можно объяснить тем, что спиновая ловушка взаимодействует с NO с константой скорости примерно $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, а кислород – с $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Иными словами, кислород оказывается весьма эффективным конкурентом гема за NO. Следовательно, в присутствии кислорода лазерное излучение инициирует не только фотолиз HbNO с образованием свободного NO, но и дальнейшие превращения NO и Hb в результате реакций с O_2 .

Фотолиз HbNO происходит при его облучении как в высоко- (R), так и в низкоаффинных (T) конформациях. Эта особенность представляется особенно важной, поскольку образование и R- и T-конформаций происходит при низких концентрациях NO, близких к физиологическим [45], а также *in vivo* [37, 39–41].

Более того, нами обнаружено, что фотолиз нитрозильных комплексов происходит не только в растворе, но и в целых эритроцитах. Комплексы HbNO в эритроцитах имеют более высокую чувствительность к облучению, чем комплексы в растворе. Распад HbNO в эритроцитах происходит при значительно меньших дозах, а образование свободного NO удается зарегистрировать даже в присутствии кислорода, причем его образование продолжается еще некоторое время и после полного распада HbNO. Этот факт можно объяснить

взаимодействием свободного оксида азота с тиолами эритроцитов и в первую очередь с глутатионом. GSH, который присутствует в эритроцитах в концентрации ~ 1 мМ, может реагировать с NO с образованием S- нитрозоглутатиона, а затем распадаться под действием излучения, освобождая радикал NO. Таким образом, с одной стороны, GSH способствует усилению фотолитического распада HbNO, благодаря удалению NO из сферы реакции с Hb, а с другой – продлевает время существования NO уже в виде комплексов нитрозотиолов.

Независимо от механизма фотолиза эритроцитарного HbNO и образования свободного NO, нитрозильные комплексы гемоглобина, по всей вероятности, могут служить донором NO. Очевидно, также и то, что лазерное излучение индуцирует распад HbNO и образование NO. Интересно, что светочувствительные доноры NO, находящиеся в кровеносном русле, в несколько раз усиливают фотоиндуцированное расслабление стенки артерии [103]. Следовательно, HbNO также может принимать участие и в фотоиндуцированном расслаблении кровеносных сосудов. Данный механизм может работать как в нормальных физиологических условиях (уровень HbNO в крови достигает 1 нМ [37]), так и при патологии (особенно ишемии), когда оксигенация ткани снижается, а образование NO возрастает и создаются условия для деоксигенации и нитрозилирования гемоглобина [39].

Утверждение, что HbNO может служить временным депо оксида азота, который освобождается при действии лазерного излучения и приводит к расширению сосудов, было проверено нами в экспериментах на крысах [104]. Эксперименты проводили следующим образом: животному давали наркоз, после чего из бедренной артерии брали кровь, которую насыщали NO для образования нитрозильных комплексов Hb. Затем, кровь, содержащую HbNO, вводили обратно в кровотоки и наблюдали за тонусом сосудов а. epigastrica и ее ветвей с помощью лазерной доплеровской спектроскопии. При этом было обнаружено, что облучение He-Cd лазером сосудов, по которым течет кровь с высоким содержанием Hb-NO, приводит к существенному усилению кровотока ($\approx 30\%$) по сравнению с контролем (облучение крови не содержащей Hb-NO). Результаты этих экспериментов можно объяснить таким образом, что лазерное излучение приводит к разрушению HbNO с образованием свободного NO, которая активирует гуанилат-циклазу и, в конечном итоге, приводит к расслаблению сосудов брюшной стенки. Таким образом, фотолиз нитрозильных комплексов гемоглобина может способствовать нормализации циркуляции крови в сосудах. Эти эксперименты, как нам кажется, особенно важны с

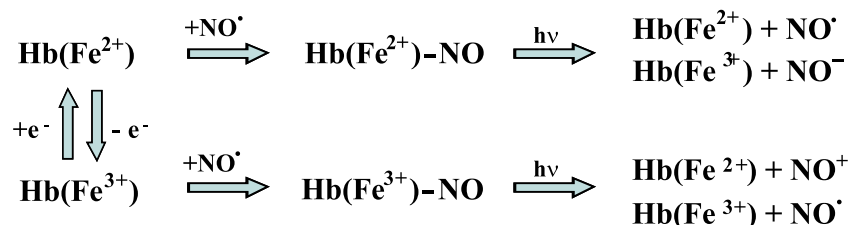


Рис. 3. Схема реакций образования и распада нитрозильных комплексов Hb.

точки зрения восстановления кровоснабжения органов после их пересадки или эмболии сосудов. Основные реакции нитрозильных комплексов Hb представлены на рис. 3.

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЦИТОХРОМА С

Реакции NO с цитохромом *c* имеют важное значение для функционирования дыхательной цепи митохондрий. Так образование нитрозильных комплексов как ферро- так и феррицитохрома *c* может приводить к ингибированию цепи переноса электронов. В то же время восстановление NO до NO⁻ феррицитохромом *c* приводит к удалению NO из сферы реакций с другими участниками транспортной цепи митохондрий (цитохром *bc_L*, цитохромом *a₃* и убихинолом) и реактивации дыхания [105]. В этой связи влияние излучения видимого диапазона на взаимодействие цитохрома *c* и NO представляется весьма интересным.

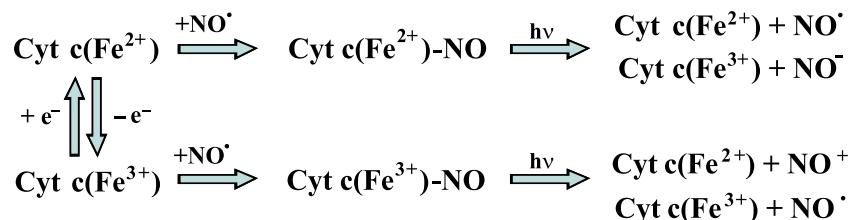
Нам удалось доказать экспериментально, возможность распада нитрозильных комплексов обеих форм цитохрома *c* (сyt c²⁺ и сyt c³⁺) под действием He-Cd лазера. Оказалось, что лазерное излучение ускоряет распад нитрозильных комплексов сyt c²⁺, наблюдаемый по снижению сигнала ЭПР комплекса сyt c²⁺-NO, по крайней мере, в 20 раз по сравнению с темновой реакцией. Аналогичным образом уменьшалась интенсивность характерной полосы в спектре оптического поглощения сyt c³⁺-NO при 560–570 нм. Очевидно, что фотолиз нитрозильных комплексов может протекать с образованием восстановленного и/или окисленного цитохрома *c* и свободного NO. Иными словами, облучение может просто смещать равновесие в реакциях распада нитрозильных комплексов в сторону исходных компонентов. Мы обнаружили, что сyt c²⁺-NO диссоциировал при облучении He-Cd лазером, в то время как, сyt c³⁺-NO, скорее всего, распадался с образованием сyt c²⁺ и NO⁺.

На основе полученных данных мы предположили, что действие излучения He-Cd лазера на митохондрии или даже целые клетки, дыхание которых подавлено NO, может вызывать реактивацию дыхания и синтеза АТФ. Одним из механизмов этой реактивации является фотодиссоциация нитрозильных комплексов цитохрома *c* и ускорение цитохром *c*-опосредованного метаболизма NO.

В данном случае уместно вспомнить и об изменении скорости взаимодействия цитохрома *c* с оксидом азота в присутствии анионных липидов. Нами было показано, что не только H₂O₂, но и NO могут быстро взаимодействовать с цитохромом *c*, если последний находится в комплексе с кардиолипином или фосфатидилсеринем. В присутствии кардиолипина цитохром *c* образует достаточно прочный нитрозильный комплекс с оксидом азота [86]. Образование такого комплекса сильно снижает или даже полностью подавляет пероксидазную активность цитохрома *c*. Если подобное явление происходит в митохондриях, то уменьшение пероксидазной активности может повлечь за собой и снижение вероятности развития апоптотических реакций.

Нами также было обнаружено, что нитрозильные комплексы цитохрома *c*, полученные в присутствии кардиолипина, обладают фоточувствительностью, т.е. могут распадаться при облучении светом лазера видимого диапазона. Эти эксперименты показали, что облучение He-Cd лазером (441 нм), ведет к распаду нитрозильных комплексов цитохрома *c*, и при этом вновь становится возможным доступ H₂O₂ к активному центру цитохрома *c*, т.е. восстанавливается пероксидазная активность цитохрома *c*. Это означает, что лазерное излучение может служить проапоптотическим фактором в развитии апоптоза, если в системе присутствуют нитрозильные комплексы цитохрома *c*. Таким образом, NO и лазерное излучение могут служить инструментами, при помощи которых можно воздействовать на пероксидазную активность цитохрома *c*, и возможно, на апоптоз [85].

Разумеется, цитохром *c* является не единственным местом приложения действия NO на митохондриальную электрон-транспортную цепь. Показано, что NO образует нитрозильные комплексы с гемом а₃ цитохром оксидазы и вызывает ее обратимое ингибирование [49]. Сартти и сотр., исследуя механизм ингибирования цитохром *c*-оксидазы, показали, что белый свет реактивирует фермент и усиливает потребление кислорода в системе цитохром а₃/NO [106]. Кроме того, NO сравнительно медленно, но необратимо ингибирует соединение I за счет нитрозилирования тиоловых групп фермента, а облучение нитрозилированного соединения I ближним УФ и видимым светом приводит к его реактивации. Данный эффект связывают с фотолизом

Рис. 4. Схема реакций образования и распада нитрозильных комплексов Cyt *c*.

нитрозотиольных групп [107]. Иными словами можно утверждать, что NO оказывает влияние на активность нескольких участников цепи переноса электронов, при этом излучение видимой и УФ области модулирует эффекты NO на уровне этих ферментативных сайтов цепи. Дальнейшее исследование фотобиологических эффектов, связанных с действием NO на дыхательные процессы, помогут прояснить роль каждого из элементов цепи метаболизма NO в ингибировании дыхания, продукции активных форм кислорода в присутствии NO, а также выяснить механизмы фотохимических реакций цитохромов и оксида азота. Основные реакции нитрозильных комплексов Cyt *c* представлены на рис. 4.

V. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИЗЛУЧЕНИЯ ВИДИМОГО ДИАПАЗОНА

РАССЛАБЛЕНИЕ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ СОСУДОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

Явление расслабления аорты кролика под действием белого света впервые было обнаружено Фуршготтом в 1955 г. [108]. Позднее выяснилось, что вызываемое светом расслабление сосудов напоминает реакцию сосудов на EDRF, так как сопровождается увеличением уровня cGMP и ингибируется метиленовым голубым [109]. Реакция расслабления сосудов под действием света не зависит от самого эндотелия и, возможно, связана с существованием в стенке сосуда фоточувствительных соединений, освобождающих при облучении соединение подобное NO [110, 111]. Резерв этого вещества истощается по мере увеличения дозы облучения и восстанавливается донорами NO [103]. Вентурини и соавт. показали, что роль фоточувствительных доноров оксида азота принадлежит S-нитрозотиолам и S-нитрозопротеинам, поскольку эти соединения образуются в физиологических условиях в реакциях нитрози-

лирования тиолов и могут диссоциировать при облучении УФ-светом с освобождением NO [25, 112].

Однако, значительное влияние на этот эффект оказывают также светочувствительные соединения, находящиеся в крови [103]. Ю.А. Владимиров высказал предположение, что одним из хромофоров, принимающих участие в механизме фоторасслабления, являются нитрозильные комплексы гемоглобина [113]. Основанием для этого послужили следующие факты. Во-первых, NO легко присоединяется в качестве лиганда к гемоглобину, и во-вторых, нитрозильные комплексы Hb обнаружены *in vivo*. Следовательно, Hb может служить переносчиком NO от мест его образования к биологическим мишеням. Наконец, важным свойством HbNO, как и многих других гемопротеинов, является фотолиз под действием излучения видимой области. Можно предположить, что *in vivo* под действием света HbNO распадается с образованием свободной оксида азота, который вызывает расширение сосудов.

ФОТОРЕАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ

Как известно, видимый свет вызывает увеличение потребления кислорода митохондриями, увеличение их трансмембранного потенциала и увеличение продукции АТФ [114]. Аналогичные эффекты наблюдались и на целых клетках [115]. Исходя из анализа спектров действия, полагают, что первичным акцептором излучения может быть цитохром *c* оксидаза [116]. К сожалению, механизм фотореактивации цитохром *c* оксидазы митохондрий остается малоизученным.

Как уже было сказано, среди многочисленных биологических эффектов NO известен эффект ингибирования активности митохондриальной транспортной цепи электронов [49]. Ингибирование дыхания оксидом азота продемонстрировано как на выделенных митохондриях [117], так и на цельных клетках [118]. Более того, показана возможность регуляции клеточного дыхания активированными макрофагами [119], которая имеет прямое отношение к патогенезу воспалительных процессов. Интерес к этому явлению особенно возрос после открытия митохондриальной NO-синтазы (mtNOS) [120, 121]. Исследования показали, что активность дыхания может ингибироваться не только экзогенным NO, но и эндогенным путем через модулирование активности mtNOS [122]. В этом случае, следствием ингибирования дыхания является восстановление элементов цепи переноса электронов и, как следствие, повышение продукции O_2^- , H_2O_2 и пероксинитрита [117, 123, 124]. Таким образом, NO, известный как перехватчик свободных радикалов

становится индуктором их образования в митохондриях. Индукция окислительного стресса, вызванная NO, ведет к окислению митохондриальных липидов, падению трансмембранного потенциала, открытию митохондриальных пор и высвобождению цитохрома *c* в цитоплазму [123, 125]. Последний эффект является ключевым в запуске каскада апоптотических реакций и гибели клеток [126].

Внимание большинства авторов, исследовавших механизм ингибирования дыхания, было сконцентрировано на цитохром *c* оксидазе, как основной мишени NO. Однако, многочисленные данные свидетельствуют о том, что практически все элементы митохондриальной электрон-транспортной цепи вступают в реакцию с оксидом азота. С помощью ингибиторов дыхательной цепи было установлено, что супрессорный эффект NO проявляется на всех участках цепи транспорта электронов [105]. NO ингибирует цитохром *c* оксидазу [49] и снижает активность цитохрома *bc₁* [117, 124].

Ингибирование оксидом азота цитохром *c* оксидазы было продемонстрировано на очищенном белке [106, 127], на митохондриях [105] и нативных клетках [128] с использованием ингибиторов транспорта электронов в митохондриях. Характерной особенностью этого эффекта является его обратимость, т.к. по мере снижения концентрации NO фермент восстанавливает свою активность. Существует несколько представлений о механизме ингибирования цитохром *c* оксидазы. Одно из них гласит, что NO может образовывать нитрозильные комплексы как с Fe гема цитохрома *a₃* (сyt a_3^{2+} -NO), так и с Cu_B^+ и Cu_B^{2+} [48, 127–132]. Однако, помимо комплексообразования с цитохром *c* оксидазой, NO может вызывать ингибирующий эффект, восстанавливая железо в ее активном центре. Дело в том, что в ходе восстановления молекулы кислорода до воды, цитохром *c* оксидаза образует два высокоокисленных соединения: соединение P ($Fe(a_3)^{5+}=O$ (оксоферрил, аналог соединения I в пероксидазном цикле)) и соединение F ($Fe(a_3)^{4+}=O$, (феррил, аналог соединения II в пероксидазном цикле)). NO может восстанавливать любую из вышеперечисленных форм цитохром оксидазы ($P \rightarrow F$, $F \rightarrow Fe(a_3)^{3+}$, $Cu_B^{2+} \rightarrow Cu_B^+$), изменяя, тем самым, ход реакции [127, 130].

Пытаясь выяснить механизм ингибирования цитохром *c* оксидазы оксидом азота, интересное наблюдение сделал Сарти [106]. Известно, что нитрозильный комплекс цитохром *c* оксидазы (сyt a_3^{2+} -NO), в отличие от других комплексов, обладает фоточувствительностью и распадается под действием видимого света [62]. Т.о., если решающую роль в механизме ингибирования играет образование сyt a_3^{2+} -NO, то активность фермента и дыхание должны быть чувствительны к присутствию NO, а облучение должно снимать ингибирующее

действие NO. Действительно, оказалось, что видимый свет практически полностью восстанавливает активность фермента. Но это происходит только в присутствии избытка восстановителя. Если концентрация восстановителя низка, то потребление кислорода цитохром *c* оксидазой на свету оказывалось таким же низким, как и в темноте. Иными словами, когда восстанавливающая способность среды высока, то ключевым этапом ингибирования является образование $\text{cyt } a_3^{2+}\text{-NO}$, если восстанавливающая способность среды низка, то основным механизмом ингибирования является или восстановление компонентов цитохрома оксидом азота или образование нечувствительных к свету комплексов $\text{cyt } a_3^{3+}\text{-NO}_2^-$ [106]. Можно предположить, что *in vivo*, на фоне сравнительно высокой концентрации восстановителей, реализуется первый механизм. В то же время, в патологических условиях, когда уровень восстановителей низок, может быть реализован второй механизм. Это может иметь место, например, при воспалении.

Комплекс I митохондрий также может выступать в качестве акцептора NO. На культуре клеток макрофагов мышей J774 показано, что комплекс I транспортной цепи электронов может быть заингибирован в присутствии одного из доноров NO – DETA-NO [107]. В отличие от цитохром *c* оксидазы ингибирование оксидом азота комплекса I развивается сравнительно медленно (90% снижение активности наблюдается лишь после 3-х часовой инкубации с NO) и носит необратимый характер. Механизм ингибирования заключается, по-видимому, в S-нитрозилировании одной из функционально важных тиоловых групп белка. Справедливость этого предположения подтверждается двумя фактами. Во-первых, эстрифицированный глутатион (аналог глутатиона, свободно проникающий через клеточную мембрану) восстанавливает дыхание клеток. Во-вторых, фермент реактивируется после интенсивного облучения белым светом. Поскольку глутатион может участвовать в реакции транснаитрозилирования и, таким образом, восстанавливать SH-группы белков, а ближнее УФ излучение может вызывать гомолитический разрыв связи RS-NO, можно полагать, что именно S-нитрозилирование ответственно за деактивацию белка.

Таким образом, и цитохром *c* оксидаза и соединение I инактивируются оксидом азота. Механизмы инактивации принципиально различны. В одном случае, это образование нитрозильного комплекса с гемом, в другом – нитрозилирование тиоловой группы белка. Однако белый свет разрушает оба производных оксида азота и в обоих случаях восстанавливается активность ферментов и дыхание.

Механизм реакций цитохрома *c* и оксида азота достаточно сложен и до конца не изучен. Однако, как отмечалось выше, восстановленная и окисленная формы цитохрома *c* образуют нитрозильные комплексы [133, 134]. Кроме того, ферроцитохром *c* катализирует восстановление NO до NO⁻ [117], а феррицитохром *c* – окисление NO до нитрита [90]. Таким образом, обе формы цитохрома *c* участвуют в метаболизме NO. Более того, в присутствии анионных фосфолипидов (кардиолипина и фосфатидилсерина) реакция образования нитрозильных комплексов ускоряется в десятки раз. Образовавшиеся нитрозильные комплексы цитохрома *c* обладают фоточувствительностью и могут распадаться под действием видимого света. Описанные выше фотохимические реакции (фотолиз комплексов или изменение каталитической активности цитохрома *c*) могут иметь большое значение как в регуляции активности электрон-транспортной цепи митохондрий (следовательно, и клеточного дыхания), так и в процессах развития апоптоза.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные в обзоре результаты исследований однозначно говорят о важной биологической роли нитрозильных комплексов гемопротеинов. Очевидно также и то, что во многом роль нитрозильных комплексов связана с тем, что они являются местом депонирования оксида азота. Часто условием высвобождения оксида азота является облучение. С помощью лазерного облучения можно улучшить мозговое кровообращение. Лазерная терапия оказывает положительный эффект при шоковых состояниях. Так, на модели геморрагического шока у собак показано, что облучение лазером в остром периоде шока и после реанимации улучшает состояние животных [135]. Установлено также, что лазерное излучение видимого диапазона усиливает пролиферацию клеток и ускоряет процессы регенерации тканей. Например, при терапии сердечно-сосудистых заболеваний используется трансмуральная лазерная реваскуляризация [136]. Этот метод заметно улучшает стенокардический статус, относительное эндокардиальное кровоснабжение и восстанавливает сердечные функции. Показано, что излучение He-Ne лазера способствует заживанию плохо заживающих ран и трофических язв [137]. Активация пролиферации под действием лазерных излучений от различных источников (He-Cd (441,6 нм), аргоновый (488 нм), Nd:YAG (760–830 нм), He-Ne (632,8 нм), рубиновый (694,3 нм) лазеры) продемонстрирована на культурах клеток лимфобластов, фибробластов

и эпителия [116]. Полагают, что сложная картина действия видимого света объясняется существованием в клетках нескольких хромофоров. В первую очередь, к ним относятся ферменты дыхательной цепи [116, 137]. Таким образом, фотоактивация дыхания и синтеза АТФ могут играть важную роль в механизме активации пролиферации, индуцированной светом.

Наконец, показано, что лазерное излучение может вызывать увеличение продукции NO. Клебанов с соавт. обнаружили явление прайминга при облучении нейтрофилов, которое заключается в том, что после облучения ИК лазером клетки демонстрируют значительно более сильную активацию и более высокий уровень продукции NO в ответ на активатор [138]. Излучение He-Ne лазера вызывает активацию Т-лимфоцитов, причем клетки проходят все стадии, вплоть до увеличения синтеза РНК. Этот эффект, наряду с высоким синтезом NO, может играть важную роль, например, при регуляции воспалительного процесса лазерным излучением [139, 140]. Таким образом, очевидно, что излучение видимого диапазона может быть эффективно использовано в терапевтических целях в тех случаях, когда предполагается, что в тканях существуют нитрозильные комплексы гемопротеинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980) *Blood Vessels*, **17**, 151.
2. Furchgott, R.F. (1988) in *Vasodilatation, Vascular smooth muscle, peptides and endothelium*. Raven Press, New York, pp. 401–414.
3. Ignarro, L., Lippson, H., Edwards, J.C., Baricos, W.H., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., and Gruetter, C.A. (1981) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **218**, 739–749.
4. Wink, D.A., and Mitchell, J.B. (1998) *Free Radical Biology & Medicine*, **25**, 434–456.
5. Zweier, J.L., Wang, P., Samouilov, A., and Kuppusamy, P. (1995) *Nat. Med.*, **1**, 1103–1104.
6. Zweier, J.L., Samouilov, A., and Kuppusamy, P. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**, 250–262.
7. Kozlov, A.V., Staniek, K., and Nohl, H. (1999) *FEBS Lett.*, **454**, 127–130.
8. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. (1998) *Биохимия*, **63**, 874–884.
9. Реутов В.П., Ажгина Я.И., Каюшин Л.П. (1983) *Известия Академии наук СССР, Сер. Биол.*, **3**, 408–418.
10. Bredt, D.S., Hwang, P.M., and Lowenstein, C. (1991) *Nature*, **351**, 714–718.
11. Stuehr, D.J., and Ikeda, S.M. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 20547–20550.
12. Leone, A.M., Palmer, R.M., and Knowles, R.J. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 23790–23795.
13. Gross, C.S., Jaffe, E.A., and Levi, R. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 823–829.
14. Nathan, C. (1992) *FASEB J.*, **6**, 3051–3064.
15. Vincent, S.R. (1994) *Prog. Neurobiol.*, **42**, 129–160.

16. Kelm, M., Feelish, M., and Deussen, A. (1991) *Cardiovasc. Res.*, **25**, 831–836.
17. Kelm, M., Feelish, M., and Spahr, R. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 236–244.
18. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., and Marshall, P.A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1620–1624.
19. Beckman, J.S. (1991) *J. Dev. Physiol.*, **15**, 53–59.
20. Hogg, N., Kalyanaraman, B., Joseph, J., Struck, A., and Parthasarathy, S. (1993) *FEBS Lett.*, **334**, 170–174.
21. Hogg, N., and Kalyanaraman, B. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**, 378–384.
22. Goodwin, D.C., Gunther, M.R., Hsi, L.C., Crews, B.C., Eling, T.E., Mason, R.P., and Marnett, L.J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8903–8909.
23. Gorbunov, N.V., Osipov, A.N., Day, B.W., Betriz, Z., Kagan, V.E., and Elsayed, N.M. (1995) *Biochemistry*, **34**, 6689–6699.
24. Clancy, R.M., Levartovsky, D., Leszczynska-Piziak, J., Yegudin, J., and Abramson, S.B. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3680–3684.
25. Stamler, J.S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D.I., Keaney, J., Vita, J., Singel, D., Valery, R., and Loscalzo, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7674–7677.
26. Dicks, A.P., Swift, H.R., Williams, D.L.H., Butler, A.R., AlSadoni, H.H., and Cox, B.G. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Transactions II*, **4**, 481–487.
27. Vanin, A.F., Malenkova, I.V., and Serezhenkov, V.A. (1997) *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, **1**, 191–203.
28. Arnelle, D.R., and Stamler, J.S. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 279–285.
29. Ванин А.Ф. (1972) Канд. Дисс.: ИХФ АН СССР, Москва.
30. Храпова Н.В., Маленкова И.В., Ванин А.Ф. (1995) *Биофизика*, **40**, 117–121.
31. Butler, A.R., Megson, I.L., and Wright, P.G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1425**, 168–176.
32. Kelm, M., and Schrader, J. (1990) *Circ. Res.*, **66**, 1561–1575.
33. Vanin, A.F., Mordvintcev, P.I., Hauschildt, S., and Mulsch, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1177**, 37–42.
34. Vanin, A.F. (1991) *FEBS Lett.*, **289**, 1–3.
35. Mulsch, A., Mordvintcev, P.I., Vanin, A.F., and Busse, R. (1991) *FEBS Lett.* **294**, 252–256.
36. Gaston, B., Reilly, J., and Drazen, J.M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10957–10961.
37. Bonaventura, J.L., Bonaventura, C.J., and Stamler, J.S. (1996) *Nature*, **380**, 221–226.
38. Stamler, J.S., Jia, L., Eu, J.P., McMahon, T.J., Demchenko, I.T., Bonaventura, J., Gernert, K., and Piantadosi, C.A. (1997) *Science*, **276**, 2034–2037.
39. Kumura, E., Yoshimine, T., Tanaka, S., Hayakawa, T., Shiga, T., and Kosaka, H. (1994) *Neurosci. Lett.*, **177**, 165–167.
40. Symons, M.C., Rowland, I.J., Deighton, N., Shorrocks, K., and West, K.P. (1994) *Free. Radic. Res.*, **21**, 197–202.
41. Hall, D.M., Buettner, G.R., Matthes, R.D., and Gisolfi, C.V. (1994) *J. Appl. Physiol.*, **77**, 548–553.
42. Stamler, J.S., Singel, D.J., and Loscalzo, J. (1992) *Science*, **258**, 1898–1902.
43. Yoshida, K., Kasama, K., Kitabatake, M., and Imai, M. (1980) *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, **46**, 71–77.
44. Kelm, M., and Yoshida, K. (1996) in *Methods in NO research* (Feelish, M., Stamler, J.S., and England, L., Eds.), Wiley & Sons Ltd., London, UK.
45. Gow, A.J., Luchsinger, B.P., Pawloski, J.R., Singel, D.J., and Stamler, J.S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9027–9032.

46. Gow, A.J., and Stamler, J.S. (1998) *Nature*, **391**, 169–173.
47. Stone, J.R., Sands, R.H., Dunham, W.R., and Marletta, M.A. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 572–575.
48. Zhao, X.J., Sampath, V., and Caughey, W.S. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 537–543.
49. Brown, G.C., and Cooper, C.E. (1994) *FEBS Lett.*, **356**, 295–298.
50. Fujimori, H., and Pan Hou, H. (1991) *Brain. Res.*, **554**, 355–357.
51. Mannick, J.B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D.T., Zeng, M., Miao, Q.X., Kane, L.S., Gow, A.J., and Stamler, J.S. (1999) *Science*, **284**, 651–654.
52. Rossig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A.M., Mulsch, A., and Dimmeler, S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 6823–6826.
53. Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B., and Gitlin, J.D. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 23469–23472.
54. Pufhal, R.A., Singer, C.P., Peariso, K.L., Lin, S.-J., Schmidt, P.J., Fahrni, C.J., Culotta, V., Penner-Hahn, J.E., and O'Halloran, T.V. (1997) *Science*, **278**, 853–856.
55. Liu, S., Fabisiak, J., Tyurin, V., Borisenko, G., Pitt, B., Lazo, J., and Kagan, V. (2000) *The Toxicologist*, **54**, 167.
56. Kawai, K., Liu, S.-X., Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Borisenko, G.G., Fabisiak, J.P., Pitt, B.R., and Kagan, V.E. (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, **13** (12), 1275–1286.
57. Liu, S.-X., Fabisiak, J.P., Tyurin, V.A., Borisenko, G.G., Pitt, B.R., Lazo, J.S., and Kagan, V.E. (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 922–931.
58. Zhang, F., White, J.G., and Iadecola, C. (1994) *J. Cereb. blood flow metab.*, **14**, 217–226.
59. Frostell, C., Fratacci, M., and Wain, J.C. (1991) *Circulation*, **83**, 2038–2047.
60. Koshland, D.E., and Culotta, E. (1992) *Science*, **258**, 1862–1865.
61. Brown, G.C. (1997) *Mol. Cell. Biochem.*, **174**, 189–192.
62. Boelens, R., Rademaker, H., Pel, R., and Wever, R. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **679**, 84–94.
63. Hill, R., Olson, J.S., and Palmer, G. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 12110–12120.
64. Kon, H.J. (1968) *J. Biol. Chem.*, **242**, 485.
65. Taylor, T.G., and Sharma, V.S. (1992) *Biochemistry*, **31**, 2847–2849.
66. Sharma, V.S., Taylor, T.G., and Gardiner, R. (1987) *Biochemistry*, **26**, 3837–3843.
67. Ascenzi, P., Coletta, M., Santucci, R., Polizio, F., and Desideri, A. (1994) *J. Inorg. Biochem.*, **53**, 273–280.
68. Hori, H., Ikeda-Saito, M., Lang, G., and Yonetani, T. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 15028–15033.
69. Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J.S. (1992) *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 834–842.
70. Hill, R., Olson, J.S., and Palmer, G. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 12110–12120.
71. Yonetani, T., Tsuneshige, A., Zhou, Y., and Chen, X. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 20323–20333.
72. Cassoly, R., and Gibson, Q.H. (1975) *J. Mol. Biol.*, **91**, 301–313.
73. Moore, E.G., and Gibson, Q.H. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2788–2794.
74. Pepke-Zaba, J., Higenbottam, T.W., Dinh-Xuan, A.T., Stone, D., and Wallwork, J. (1991) *Lancet*, **338**, 1173–1174.
75. Doyle, M.P., Pickering, R.A., and Cook, B.R. (1983) *J. Inorg. Biochem.*, **19**, 329–338.
76. Pietraforte, D., Mallozzi, C., Scorza, G., and Minetti, M. (1995) *Biochemistry*, **34**, 7177–7185.

77. Kosaka, H., and Seiyama, A. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 749–752.
78. Szabo, A., and Peruts, M.F. (1976) *Biochemistry*, **15**, 4427–4428.
79. Maxwell, J.C., and Caughey, W.S. (1976) *Biochemistry*, **15**, 388–396.
80. Vincent, J.S., Kon, H., and Levin, I.W. (1987) *Biochemistry*, **26**, 2312–2314.
81. Vincent, J.S., and Levin, I.W. (1988) *Biochemistry*, **27**, 3438–3446.
82. Spooner, P.J., and Watts, A. (1991) *Biochemistry*, **30** (16), 3880–3885.
83. Choi, S., and Swanson, J.M. (1995) *Biophys Chem.*, **54**, 271–278.
84. Spooner, P.J., and Watts, A. (1992) *Biochemistry*, **31**, 10129–10138.
85. Osipov, A.N., Stepanov, G.O., Vladimirov, Y.A., Kozlov, A.V., and Kagan, V.E. (2006) *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 1128–1132.
86. Vlasova, I.I., Tyurin, V.A., Kapralov, A.A., Kurnikov, I.V., Osipov, A.N., Potapovich, M.V., Stoyanovsky, D.A., and Kagan, V.E. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 14554–14562.
87. Hoshino, M., Ozawa, K., Seki, H., and Ford, P.C. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9568–9575.
88. Rose, E.J., and Hoffman, B.M. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 2866–2873.
89. Sharpe, M.A., and Cooper, C.E. (1998) *Biochem. J.*, **332**, 9–19.
90. Orii, Y., and Shimada, H. (1978) *J. Biochem. (Tokyo)*, **84**, 1542–1552.
91. Holdane, S., and Lorrain, J. (1896) *Physiol. (London)*, **20**, 497–520.
92. Keilin, D., and Hartree, E.F. (1955) *Biochem. J.*, **16**, 153–171.
93. Gibson, Q.H., and Ainsworth, S. (1957) *Nature*, **180**, 1416–1417.
94. Владимиров Ю.А. (1957) Канд. дисс., МГУ, Москва.
95. Antonini, E., and Brunori, M. (1971) *Noth-Holland publish. Corp.*, Amsterdam.
96. Saffran, W.A., and Gibson, Q.H. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 7955–7962.
97. Hofrichter, J., Sommer, J.H., Henry, E.R., and Eaton, W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2235–2241.
98. Petrich, J.W., Martin, J.L., Houde, D., and Poyart, C. (1987) *Biochemistry*, **26**, 7914–7920.
99. Petrich, J.W., Poyart, C., and Martin, J.L. (1988) *Biochemistry*, **49**, 4049–4060.
100. Zhu, L., Sage, J.T., and Champion, P.M. (1994) *Science*, **266**, 629–632.
101. Тарасьев М.Ю., Рьльков В.В. (1991) *Биохимия*, **56**, 273–279.
102. Vladimirov, Y.A., Borisenko, G.G., Kazarinov, K.D., and Osipov, A.N. (2000) *J. Photochem. Photobiol.*, **59** (1–3), 115–122.
103. Venturini, C.M., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**, 1497–1500.
104. Mittermayr, R., Osipov, A., Piskernik, C., Haindl, S., Dungal, P., Weber, C., Vladimirov, Y.A., Redl, H., and Kozlov, A.V. (2007) *Mol. Med.*, **13**, 22–29.
105. Poderoso, J.J., Lisdero, C., Schopfer, F., Riobo, N., Carreras, M.C., Cadenas, E., and Boveris, A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 37709–37716.
106. Sarti, P., Giuffre, A., Forte, E., Mastronicola, D., Barone, M.C., and Brunori, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **274**, 183–187.
107. Clementi, E., Brown, G.C., Feilisch, M., and Moncada, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7631–7636.
108. Furchgott, R.F. (1955) *Pharmacol. rev.*, **7**, 183–265.
109. Furchgott, R.F., Martin, W., Cherry, P.D., Jothianandan, D., and Villani, G. (1985) in *Vascular neuroeffector mechanisms*. (Bevan, J.A., and Godfraind, T., Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 105–114.

110. Chaudhry, H., Lynch, M., Schomacker, K., Birngruber, R., Gregory, K., and Kochevar, I. (1993) Photochem. Photobiol., **58**, 661–669.
111. Furchgott, R.F., and Jothianandan, D. (1991) Blood. Vessels, **28**, 52–61.
112. Williams, D.L.H. (1985) Chem. Soc. Rev., **14**, 171–196.
113. Борисенко Г.Г., Осипов А.Н., Казаринов К.Д., Владимиров Ю.А. (1997) Биохимия, **62**, 774–780.
114. Passarella, S., Casamassima, F., Molinari, S., Pastore, D., Quagliarriello, E., Catalano, I.M., and Cingolani, A. (1984) FEBS Lett., **175**, 95–99.
115. Karu, T., Pyatibrat, L., and Kalendo, G. (1995) J. Photochem. Photobiol. B., **27**, 219–223.
116. Karu, T. (1999) J. Photochem. Photobiol. B., **49**, 1–17.
117. Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Lisdero, C., Riobo, N., Schopfer, F., and Boveris, A. (1996) Arch. Biochem. Biophys., **328**, 8592.
118. Culotta, E., and Koshland, D.E. (1992) Science, **258**, 862–1865.
119. Brown, G.C., Foxwell, N., and Moncada, S. (1998) FEBS Lett., **439**, 321–324.
120. Ghafourifar, P., and Richter, C. (1997) FEBS Lett., **418**, 291–296.
121. Tatoyan, A., and Giulivi, C. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 11044–11048.
122. Giulivi, C. (1998) Biochem J., **32**, 673–679.
123. Ghafourifar, P., Schenk, U., Klein, S.D., and Richter, C. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 31185–31188.
124. Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Schopfer, F., Lisdero, C.L., Riobo, N.A., Giulivi, C., Boveris, A.D., Boveris, A., and Cadenas, E. (1999) Free. Radic. Biol. Med., **7–8**, 925–935.
125. Borutaite, V., Morkuniene, R., and Brown, G.C. (2000) FEBS Lett., **467**, 155–159.
126. Hortelano, S., Dallaporta, B., Zamzami, N., Hirsch, T., Susin, S.A., Marzo, I., Bosca, L., and Kroemer, G. (1997) FEBS Lett., **410**, 373–377.
127. Torres, J., Darley-Usmar, V.M., and Wilson, M.T. (1995) Biochem. J., **312**, 169–173.
128. Brunori, M., Giuffre, A., Sarti, P., Stubauer, G., and Wilson, M.T. (1999) Cell. Mol. Life Sci., **56**, 549–557.
129. Stevens, T.H., Brudwig, G.W., Bocian, D.F., and Chan, S.I. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 3320–3325.
130. Torres, J., Cooper, C.E., and Wilson, M.T. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 8756–8766.
131. Giuffre, A., Sarti, P., D'Itri, E., Buse, G., Soulimane, T., and Brunori, M. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 33404–33408.
132. Sharpe, M.A., and Cooper, C.E. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 30961–30972.
133. Kon, H. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun., **35**, 423–427.
134. Yoshimura, T., and Suzuki, S. (1988) Inorg. Chim. Acta, **152**, 241–249.
135. Кожура В.Л., Дворецкий С.Б. Новодержкина И.С. (1993) Анестезиол. Реаниматол., **4**, 43–48.
136. Frasier, O.H., Cooly, D.A., and Kadipasaoglu, K.A. (1995) Circulation, **92**, 1158–1165.
137. Кару Т.И. (1989) Итоги науки и техники., ВИНТИ, Москва, т. **4**, pp. 44–84.
138. Klebanov, G.I., Teselkin, Y.O., Babenkova, I.V., Bashkujeva, T.Y., Chichuk, T.V., and Vladimirov, Y.A. (1998) Gen. Physiol. Biophys., **17**, 365–376.
139. Delian, M., Abels, C., Kuhle, G.E., and Goets, A.E. (1995) Br. J. Cancer, **72**, 1125–1130.
140. Karu, T. (1992) Laser Therapy, **4**, 5–24.