

## ДВОЙСТВЕННАЯ РОЛЬ ПЕРОКСИНИТРИТА В ОРГАНИЗМЕ

М. Н. Стародубцева

Гомельский государственный медицинский университет

Пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$  и  $\text{HOONO}$ ) является важным интермедиатом процессов с участием  $\text{O}_2^-$  и  $\text{NO}$ . Его способность эффективно модифицировать структуру молекул обусловлена, в основном, образованием в этих реакциях свободных радикалов  $\text{OH}$ ,  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2$ . В организме пероксинитрит играет двойственную роль: положительную (участие в процессах клеточного иммунитета, а также в регулировании активности ферментов системы клеточной сигнализации) и отрицательную (участие в развитии окислительного стресса клеток и тканей). Цитотоксическое и цитопротекторное действия пероксинитрита рассматриваются на моделях реперфузии кратковременно ишемизированного сердца.

Ключевые слова: пероксинитрит, монооксид азота, окислительный стресс, пероксинитрит-индуцированная патология, реперфузия, ишемия.

## DUAL ROLE OF PEROXYNITRITE IN ORGANISM

M.N. Starodubtseva

Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$  and  $\text{HOONO}$ ) is an important intermediate in processes with simultaneous generation  $\text{O}_2^-$  and  $\text{NO}$ . Peroxynitrite ability to efficiently modify molecule structure is due to free radical formation ( $\text{OH}$ ,  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2$ ) in its reactions. In an organism the peroxynitrite plays a dual role: positive (the participation in cellular immunity processes, and in the regulation of the activity of cell signal transduction enzymes) and negative (the participation in the development of cell and tissue oxidative stress). Cytotoxic and cytoprotective effects of peroxynitrite are considered on the models of myocardial ischaemia-reperfusion.

Key words: peroxynitrite, nitric oxide, oxidative stress, peroxynitrite-induced pathology, ischaemia-reperfusion.

В последние годы выявлены активное участие и существенная роль  $\text{NO}_x$ -соединений во многих физиологических и патологических процессах [1—4]. Особо реакционно-способные кислородсодержащие формы азота выделены в группу под названием «активные формы азота» — АФА (по аналогии с активными формами кислорода — АФК). К таким соединениям относят монооксид азота ( $\text{NO}$ ), пероксинитрит ( $\text{HOONO}$ ,  $\text{ONOO}^-$ ), диоксид азота ( $\text{NO}_2$ ).

Молекула  $\text{NO}$  является одним из важных интермедиатов во многих физиологических процессах [3, 4, 20].  $\text{NO}$  участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов, тормозит агрегацию тромбоцитов.  $\text{NO}$  вызывает расслабление гладких мышц не только стенок кровеносных сосудов, но и стенок желудочно-кишечного тракта, участвует в функционировании центральной

и вегетативной нервных систем [4]. Кроме того,  $\text{NO}$  участвует в развитии патологических процессов организма [2, 7, 16].  $\text{NO}$  обуславливает активность макрофагов, нейтрофилов и лейкоцитов, вызывает выход железа из ферритина, способствуя активации перекисного окисления липидов [19].

Некоторые клетки, такие как клетки эндотелия, нервные клетки, нейтрофилы, клетки гладких мышц, могут производить одновременно  $\text{NO}$  и супероксид-анион радикал ( $\text{O}_2^-$ ) [19]. Эти свободные радикалы рекомбинируют со скоростью, близкой к скорости диффузионно-контролируемой реакции ( $k = 6,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) с образованием оксопероксонитрат-аниона (пероксинитрит-анион,  $\text{ONOO}^-$ ). Протонированной формой этого соединения является оксопероксонитрат водорода (пероксиазотистая кислота,  $\text{HOONO}$ ). Многие

исследователи обе формы ( $\text{HOONO}$  и  $\text{ONOO}^-$ ) называют одним термином — пероксинитрит.

Пероксинитрит является сильным модификатором структуры большинства биологически важных молекул [18]. Пероксинитрит отличается более высокой реакционной способностью, чем у  $\text{NO}$  и  $\text{O}_2^-$ . Он способен разрушать клеточные структуры и вызывать смерть клеток. Пероксинитрит инактивирует некоторые ферменты (аконитазу, глутатион-пероксидазу) [9, 17, 28], электрон-транспортные белки [8] и активирует другие ферменты (проколлагеназу нейтрофилов человека, тирозинкиназу эритроцитов человека) [27, 23, 24]. Пероксинитрит инициирует перекисное окисление липидов, а также выход кальция из митохондрий и деполяризацию митохондриальных мембран [29]. Пероксинитрит рассматривают в качестве важного агента, участвующего в развитии таких болезней человека, как диабет, атеросклероз, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сепсис и др. [12, 32, 33]. Целью нашего обзора является выяснение роли пероксинитрита в организме.

#### ***Почему реакционная способность пероксинитрита выше, чем у $\text{NO}$ и $\text{O}_2^-$ , продуктом реакции которых он и является?***

Химия пероксинитрита сложна и разнообразна. Однако большинство реакций пероксинитрита с биологически важными молекулами проходят через стадию образования свободных радикалов  $\text{OH}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}_3^-$  (рис. 1) [5, 6, 25]. Константы скорости реакций этих активных форм кислорода и азота с биомолекулами выше констант скорости  $\text{NO}$  и  $\text{O}_2^-$  в такого рода реакциях. Карбоксильный радикал ( $\text{CO}_3^-$ ) проявляет сильные окисляющие свойства. Менее сильным окислителем, но сильным нитрующим агентом является  $\text{NO}_2$ . Гидроксильный радикал ( $\text{OH}$ ) характеризуется наибольшей окислительной способностью, но меньшей селективностью при выборе мишеней. Именно образованию этих активных соединений пероксинитрит обязан своей высокой способностью модифицировать структуры биомолекул [30].

Выделяют три основных механизма реакции пероксинитрита с биомолекулами, связанных с основными формами пероксинитрита:  $\text{HOONO}$ ,  $\text{ONOO}^-$  и  $\text{ONOOCO}_2^-$  (рис. 1) [5, 6]. Очевидно, что результат реакции должен зависеть от

факторов, влияющих на соотношение этих форм: величины pH и концентрации  $\text{CO}_2$  в растворе. Кроме того, ионы переходных металлов, их комплексы и белки, в структуру которых включены ионы переходных металлов, не только катализируют процессы с участием пероксинитрита, но и расширяют круг его реакций. Так, гемоглобин, основной белок эритроцитов, существенно меняет ход процессов, инициированных действием пероксинитрита на эритроциты. Именно гемоглобин ускоряет пероксинитрит-индуцированный окислительный стресс эритроцитов, благодаря образованию внутри эритроцитов феррилгемоглобина и дополнительных  $\text{NO}_2$ -радикалов [5, 6].

#### ***Двойственная роль пероксинитрита в организме***

Последние исследования путей образования и нейтрализации АФК и АФА в организме привело к концепции их двойственной роли: как факторов повреждения клетки и как стимулов к мобилизации метаболических реакций для адаптации клетки к неблагоприятным условиям и борьбы с ними [1]. Как одни и те же соединения могут выполнять двойную функцию? Решающую роль в выборе клеточного ответа играет величина сигнала — низкие концентрации АФК и АФА стимулируют защитные системы клетки, а высокие приводят к разрушению клеточных структур и вызывают клеточную смерть. Пероксинитрит не является исключением. Он может выполнять регулирующие функции в организме, модифицировать структуры биомолекул, вовлеченных в процессы клеточной сигнализации. Так, пероксинитрит активирует фактор ядерной транскрипции (NF- $\kappa$ B), увеличивая экспрессию белков, в том числе NO-синтазы [11], и подавляет активность простаглицинсинтетазы в клетках эндотелия. Это является одним из возможных путей регуляции вазодилатации. Кроме того, пероксинитрит может активизировать тирозинкиназу, что влияет на уровень фосфорилирования белков в клетке [13]. В высоких концентрациях пероксинитрит способствует развитию окислительного стресса клетки или ткани, т. е. такого их состояния, которое характеризуется избыточным уровнем АФК, а судя по последним данным, и АФА. Окислительный стресс играет важную роль в развитии различных патологических состояний (диабет, атеросклероз, хроническое воспаление,

нервнодегенеративные болезни и др.) [13, 32]. Токсическое действие пероксинитрита на клетки и ткани происходит, как было отмечено выше, благодаря производству большого количества свободных радикалов  $\text{OH}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}_3^-$ . Радикальные процессы приносят не только вред организму. Ярким примером положительной роли этих соединений является клеточная система иммунитета. И нейтрофилы, и макрофаги производят пероксинитрит в быстрой реакции  $\text{NO}$  с  $\text{O}_2^-$ , которые в свою очередь генерируются этими клетками одновременно [34]. Таким образом, пероксинитрит наряду с другими активными агентами способствует ликвидации инфекции.

Ключевым регулятором производства пероксинитрита является уровень  $\text{NO}$  в клетке. Концентрация пероксинитрита в клетке повышается при увеличении уровня  $\text{NO}$ . Концентрация  $\text{NO}$  в клетке может достигать нескольких микромолей, например, при взрывном увеличении уровня  $\text{NO}$  во время реперфузии после кратковременной ишемии или в результате деятельности цитокин-стимулированной индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазы [22].

#### **Цитотоксическое действие пероксинитрита на миокард**

Рядом авторов экспериментально показано образование пероксинитрита во время реперфузии кратковременно ишемизированного сердца [10, 35]. Кроме того, использование ингибиторов образования пероксинитрита (ингибитора  $\text{NO}$ -синтазы —  $\text{N}^G$ -мометил-L-аргинина (L-NMMA) или фермента, подобного супероксиддисмутазе (MnTBAP)) предотвращает повреждение сердца во время реперфузии [35].

Одним из патологических процессов в сердце, вызванных следующей за кратковременной ишемией реперфузией, является повреждение эндотелия. Это повреждение проявляется уменьшением эндотелий-зависимого вазодилаторного ответа в первые минуты реперфузии. Предполагается, что оно непосредственно связано со взрывным образованием эндогенного пероксинитрита непосредственно при реперфузии [14]. Это, по-видимому, вызывает повышенную восприимчивость поверхности эндотелия к адгезии нейтрофилов и тромбоцитов, агрегацию тромбоцитов и активацию

нейтрофилов, т.е. процессы, которые обычно подавляются при физиологическом эндотелий-управляемом производстве  $\text{NO}$ . Инъекция раствора пероксинитрита в изолированные сердца крыс ингибировала эндотелий-зависимую коронарную вазодилатацию. Кроме того, образование пероксинитрита в миокарде показано в течение 5 часов после реперфузии («нейтрофил-зависимая фаза») [14].

Многие работы подтверждают цитотоксическое действие пероксинитрита на ткани сердца, например, во время реперфузии после кратковременной ишемии изолированных сердец крыс и анестезированных крыс, при воспалении миокарда человека, а также в различных других экспериментальных моделях дисфункции миокарда *in vivo* [15, 21, 35]. В большинстве этих работ указывается на корреляцию уровня эндогенного пероксинитрита и нарушений функций сердца. На рис. 2 представлена схема основных эффектов пероксинитрита и  $\text{NO}$  на ткани сердца [14]. Только при определенных экспериментальных условиях, когда пероксинитрит реагирует с тиолами с образованием донора  $\text{NO}$  (например, нитрозоглутатиона), была отмечена защитная роль пероксинитрита для тканей сердца [26].

#### **Заключение**

- Пероксинитрит (пероксинитрит-анион и пероксиазотистая кислота) является сильным модификатором структур биологически важных молекул, в основном, благодаря образованию в этих реакциях свободных радикалов  $\text{OH}$ ,  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2$ .

- Роль пероксинитрита в организме не однозначна. Положительную роль пероксинитрит играет в процессах клеточного иммунитета, а также как регулятор некоторых клеточных процессов. В основном, пероксинитрит оказывает на организм отрицательное воздействие, участвуя в развитии патологических состояний клеток и тканей.

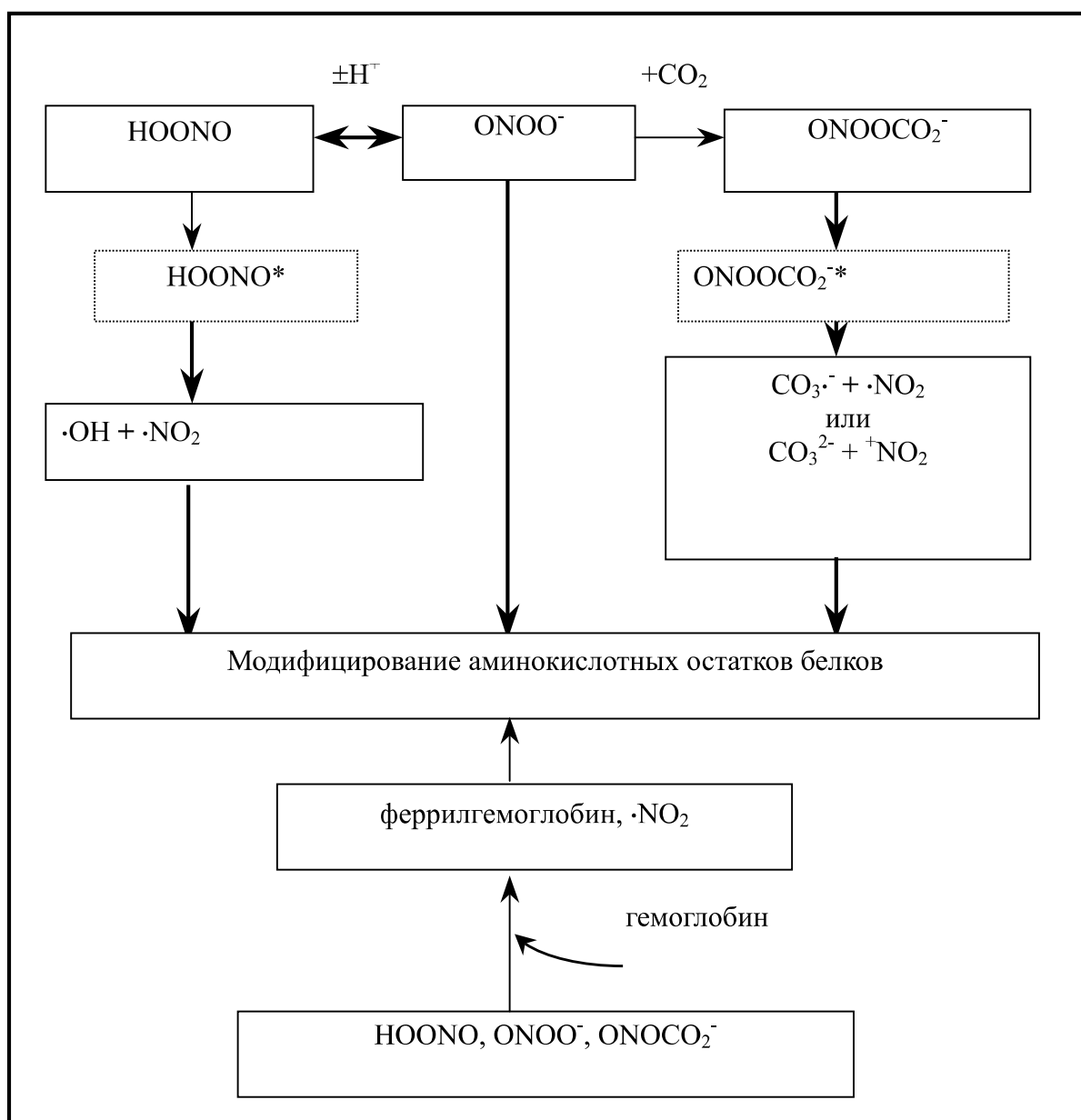


Рис. 1. Схема возможных механизмов взаимодействия форм пероксинитрита с аминокислотными остатками белков (SH-содержащими и ароматическими).

$\text{ONOOCO}_2^-$  — продукт реакции пероксинитрит-аниона с  $\text{CO}_2$ ;  $\text{HOONO}^*$  и  $\text{ONOOCO}_2^{*-}$  — высокоэнергетические состояния форм пероксинитрита, распадающихся с образованием свободных радикалов  $\text{OH}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}_3^-$ .

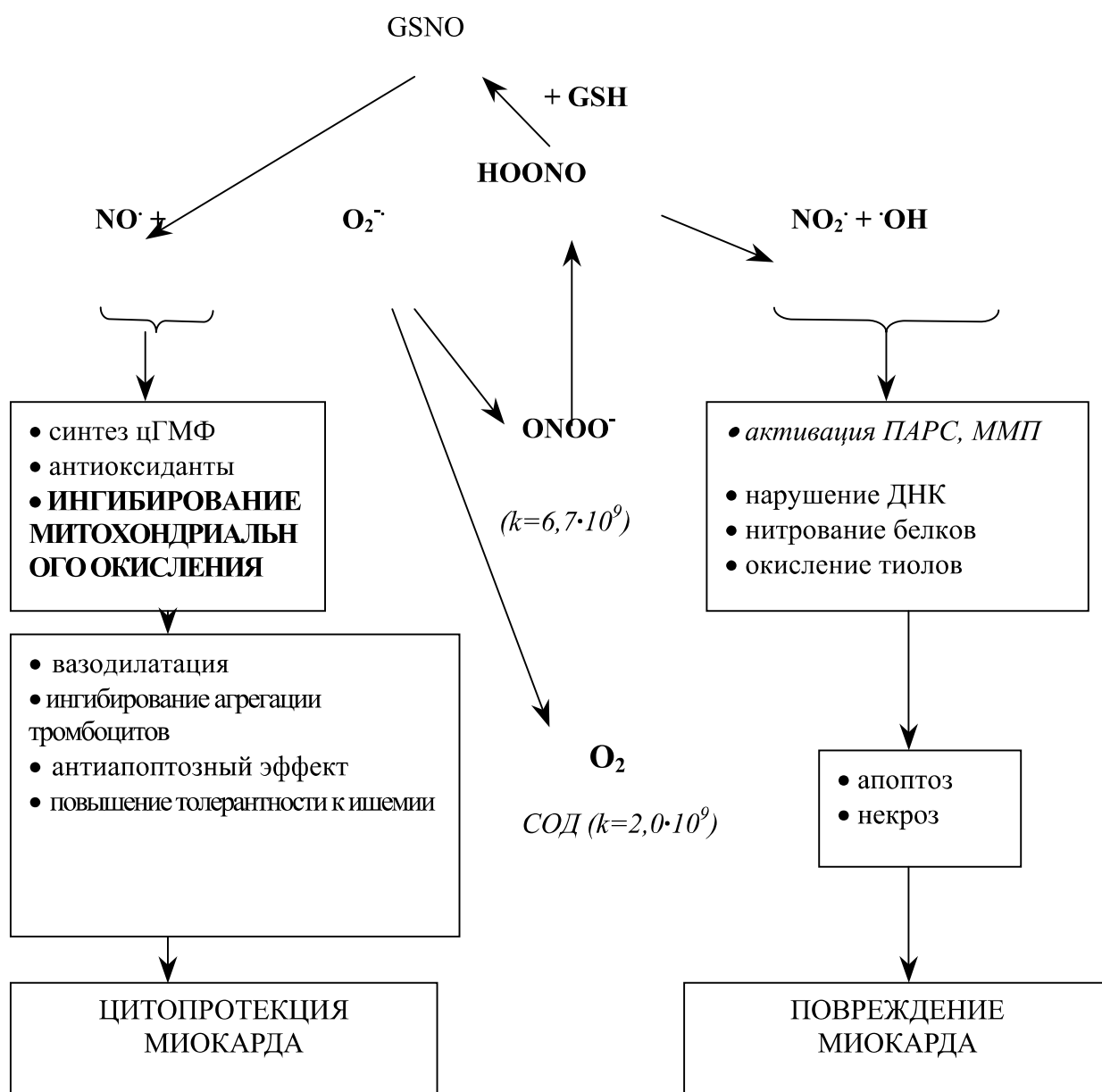


Рис. 2. Основные эффекты NO и пероксинитрита на ткани сердца [14].

ПАРС — поли-АДФ-рибозосинтетаза, ММП — матрикс-металлопротеиназа, СОД — супероксиддисмутаза, GSH — глутатион, GSNO — нитроглютацион.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А.А. Окислительный мозг и стресс // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — Т. 7, № 4. — С. 21—28.
2. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // «Биохимия». — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 1007—1019.
3. Недоспасов А.А. Биогенный NO в конкурентных отношениях // «Биохимия». — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 881—904.

4. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин И.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих — М., «Наука», 1997. — 156 с.

5. Стародубцева М.Н., Черенкевич С.Н. Роль гемоглобина в окислительном стрессе эритроцитов, вызванном пероксиазотистой кислотой / Пурины и монооксид азота: регуляторная функция в организме. Сб. статей / Под ред. В.Н. Гурина, В.А. Кульчицкого, А.Г. Чумака — Мн., УП «Технопринт», 2003. — С. 136—141.

6. Стародубцева М.Н., Черенкевич С.Н. Механизмы реакций гемоглобина с пероксинитритом в растворе // Весті НАН Беларусі (News of Biomedical Sciences), — 2003, № 2, С. 86—90.
7. Стокле Ж.К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Р., Клещев А. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов // «Биохимия». — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 976—983.
8. Cassina A., Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport // Arch. Biochem. Biophys. — 1996. — Vol. 328, № 2. — P. 309—316.
9. Castro L., Rodriguez M., Radi R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269, № 47. — P. 29409—29415.
10. Cheung P.Y., Wang W., Schulz R. Glutathione protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury by detoxifying peroxynitrite // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2000. — Vol. 32. — P. 1669—1678.
11. Cooke Ch. L.M., Davidge S.T. Peroxynitrite increases iNOS through NF- $\kappa$ B and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. — 2002. — Vol. 282. — P. C. 395—402.
12. Cross A.H., Manning P.T., Keeling R.M., Schmidt R.E. Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis // J. Neuroimmunol. — 1998. — Vol. 88, № 1—2. — P. 45—56.
13. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. — 2002. — Vol. 82. — P. 47—95.
14. Ferdinandy P., Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning // British J. Pharm. — 2003. — Vol. 138. — P. 532—543.
15. Ferdinandy P., Danial H., Ambrus I., Bothery R.A., Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial failure // Circ. Res. — 2000. — Vol. 87. — P. 241—247.
16. Freeman B.A., Gutierrez H., Rubbo H. Nitric oxide: a central regulatory species in pulmonary oxidant reactions // Am. J. Physiol. — 1995. — Vol. 268, № 5, pt. 1. — P. L697—L698.
17. Grzelak A., Soszynski M., Bartosz G. Inactivation of antioxidant enzymes by peroxynitrite // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 2000. — Vol. 60. — P. 253—258.
18. Ischiropoulos H., Al-Mehdi A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications // FEBS Letters. — 1995. — Vol. 364, № 3. — P. 279—282.
19. Ischiropoulos H., Zhu L., Beckman J.S. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitrite oxide // Arch. Biochem. Biophys. — 1992. — Vol. 298, № 2. — P. 446—451.
20. Kosaka H. Nitric oxide and hemoglobin interactions in the vasculature // Biochim. Biophys. Acta. — 1999. — Vol. 1411. — P. 370—377.
21. Kooy N.W., Lewis S.J., Royall J.A., Ye Y.Z., Kelly D.R., Beckman J.A. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation and evidence for the presence of peroxynitrite // Crit. Care Med. — 1997. — Vol. 25. — P. 812—819.
22. Li Ch., Jackson R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. — 2002. — Vol. 282. — P. C227—C241.
23. Mallozzi C., Di Stasi A.M. Peroxynitrite activates kinases of the SRC family and upregulates tyrosine phosphorylation signaling // Free Rad. Biol. Med. — 2002. — Vol. 33, № 6. — P. 744—754.
24. Mallozzi C., Di Stasi A.M., Minetti M. Peroxynitrite modulates tyrosin-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3 / FASEB J. — 1997. — Vol. 11, № 14. — P. 1281—1290.
25. Minetti M., Scorza G., Pietraforte D. Peroxynitrite induced long-lived tyrosyl radical(s) in oxyhemoglobin of red blood cells through a reaction involving CO<sub>2</sub> and a ferryl species. // Biochemistry. — 1999. — Vol. 38. — P. 2078—2087.
26. Nossuli T. O., Hayward R., Jensen D., Scalia R., Lefer A. M. Mechanisms of cardioprotection by peroxynitrite in myocardial ischaemia and reperfusion injury // Am. J. Physiol. — 1998. — Vol. 275. — P. H509—H519.
27. Okamoto T., Akaike T., Nagano T. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide // Arch. Biochem. Biophys. — 1997. — Vol. 342, № 2. — P. 261—274.
28. Padmaja S., Squadrito G.L., Pryor W.A. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite // Arch. Biochem. Biophys. — 1998. — Vol. 349, № 1. — P. 1—6.
29. Packer M.A., Murphy M.P. Peroxynitrite formed by simultaneous nitric oxide and superoxide generation causes cycloporin-A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarization // Eur. J. Biochem. — 1995. — Vol. 234. — P. 231—239.
30. Pryor W.A., Squadrito G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide // Am. J. Physiol. — 1995. — Vol. 268, № 5 (pt. 1), P. 699—722.
31. Radi R., Peluffo G., Alvarez M.N., Naviliat M., Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems // Free Rad. Biol. Med. — 2001. — Vol. 30, № 5. — P. 463—488.
32. Szabo C., Mabley J.G., Moeller S.M., Shimanovich R., Pacher P., Virag L., Soriano F.G., Van Duzer J.H., Williams W., Salzman A.L., Groves J.T. Part 1: Pathogenetic role of peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: studies with FP15, a novel potential peroxynitrite decomposition

catalyst // *Molecular Medicine*. — 2002. — Vol. 8 (10). — P. 571—580.

33. *Torreilles F., Sulman-Tabcheh S., Guerin M., Torreilles J.* Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite // *Brain Res. Rev.* — 1999. — Vol. 2. — P. 153—163.

34. *Vinten-Johansen J.* Physiological effects of peroxynitrite: potential products of the environment // *Circ. Res.* — 2000. — Vol. 87. — P. 170—172.

35. *Yasmin W., Strynadka K.D., Schulz R.* Generation of peroxynitrite contributes to ischaemia-reperfusion injury in isolated rat hearts // *Cardiovasc.* — 1997. — Vol. 33. — P. 422—432.

## КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

### ABNORMAL FOLIC ACID HOMOCYSTEINE METABOLISM AS MATERNAL RISK FACTORS FOR DOWN SYNDROME IN JAPAN

**Noboru Takamura, Tatsuro Kondoh, Syohei Ohgi, Kokichi Arisawa, Mariko Mine, Shunichi Yamashita, and Kiyoshi Aoyagi**

**Department of Public Health, Department of Pediatrics, Department of Molecular Epidemiology, Biostatistics Section and Department of Molecular Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan**

**Background:** Japan has been considered as «a folate sufficient area», since traditional Japanese food contains an adequate amount of folic acid. However, the recent westernized food style of young Japanese mothers may affect the intake of folic acid among them. This food style may contribute to the occurrence of Down syndrome, which has proved to be linked to abnormal folate and homocysteine metabolisms.

**Aim of the study:** To preliminary evaluate the levels of folic acid, homocysteine and other relevant factors which are associated with folate metabolism, among Japanese women who had pregnancies affected by Down syndrome.

**Methods:** Blood samples from 31 women who had pregnancies affected by Down syndrome (DS) were obtained. 60 age-matched control blood samples were also obtained from mothers who had not experienced miscarriages or abnormal pregnancies (CONT). Plasma homocysteine and serum folic acid, vitamin B12, and B6 were measured and compared between DS and CONT. Furthermore, the frequency of MTHFR polymorphism (C677T) was also investigated.

**Results:** Plasma levels of homocysteine were significantly increased in DS mothers ( $p=0.004$ ). In contrast, serum levels of folic acid were significantly decreased in DS mothers ( $p=0.0001$ ). There were no significant differences in the vitamin B12 and B6 levels between DS and CONT. Also, the frequency of 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) homozygous polymorphism showed no differences between DS and CONT.

**Conclusion:** Different levels of serum folic acid and plasma homocysteine between both groups may suggest the difference of food style may contribute the occurrence of Down syndrome even in Japan. Although there was no significant difference in the frequency of MTHFR polymorphism between the groups, probably because of inadequate number of samples, further studies may contribute to the understanding of the occurrence of Down syndrome in Japan.

**Key words:** folic acid, Down syndrome, homocysteine, 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR)