

УДК 547.82:615.31:546.172

НОВАЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЗАМКНУТОГО ЦИКЛА ОКСИДА АЗОТА

Лохова С.С.

Горский государственный аграрный университет, Владикавказ

Подробная информация об авторах размещена на сайте

«Учёные России» - <http://www.famous-scientists.ru>

Экспериментально обосновывается концепция, что в основе так называемого цикла оксида азота лежит не механизм регенерации NO при восстановлении ионов NO_2^- / NO_3^- нитрат/нитрит редуктазными системами, а диспропорционирование радикала NO, генерируемая NO-синтазами по механизму $NO^\circ \rightarrow NO + NO_2^- / NO_3^-$.

Впервые показано, что в организме животных пиридин (Py) в комплексе состава $2Py \cdot ZnSO_4$ неожиданно, в отличие от самого пиридинового основания, легко подвергаются фрагментации до α -кетоглутаровой кислоты и далее последний под действием аланинаминотрансферазы восстанавливается *in vivo* до L-глутаминовой кислоты – одного из основных субстратов цикла лимонной кислоты. Это позволяет понять механизм функционирования замкнутой цепочки запуска каскада метоболических и физиологических процессов в клетках живых организмов.

Оксид азота (NO) назван журналом «Science» молекулой 1992 года [1]. Это низкомолекулярное соединение, являющееся очень важным звеном в организме при запуске широкого спектра метоболических процессов, и сегодня, в начале XXI века, привлекает к себе большое внимание.

К настоящему времени накопилось такое огромное количество экспериментальных данных по метаболизму NO в организме [2,3], что они уже плохо вписываются в известные медико-биологические

модели, в частности, в концепцию Реутова с колл.[3].

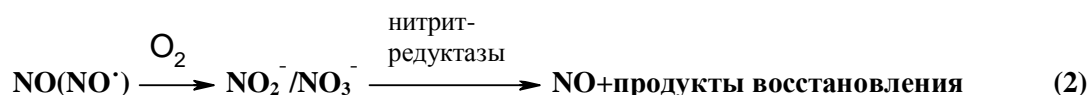
В настоящей работе приводится экспериментальное обоснование концепции, согласно которой в основе так называемого цикла оксида азота лежит не механизм регенерации NO при восстановлении ионов NO_2^- / NO_3^- нитритредуктазными системами, а реакция диспропорционирования радикала NO $^\circ$, генерируемая NO-синтазами, по механизму (1).



Результаты и обсуждение

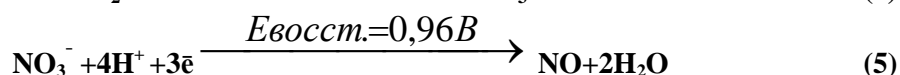
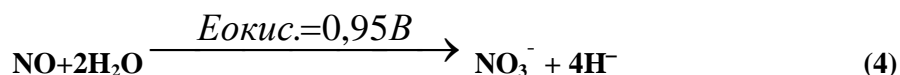
За последние годы концепция цикличности эндогенного оксида азота (NO) находит общебиологическое признание [4]. В соответствии с концепцией Реутова с колл. [3,4] под цикличностью NO подразумевается наличие в клетках животных NO-синтазного эндогенного пути синтеза

NO, ионов NO_2^- и NO_3^- ферментным окислением L-аргинина (или другого субстрата) в присутствии супероксид-анион радикала $\bullet O_2^-$ и превращение указанных ионов (NO_2^- , NO_3^-) в NO с замыканием цикла при их восстановлении нитритредуктазными системами по цепочке метаболизма (2).



Механизм замкнутости циклического пути метаболизма оксида азота (NO) по (2) требует определённых уточнений. Например, если принять NO-синтазный путь синтеза NO[•] окислительным, а нитритре-

дуктазный-восстановительным, то оксид азота должен находиться в динамическом равновесии (3) вследствие эквивалентности их окислительных и восстановительных потенциалов (5,6).



Имеется в виду, что цепочка метаболических превращений по (2) замыкается в цикл восстановлением нитрит-/нитратредуктазными ферментами ионов NO₂⁻ и NO₃⁻.

В то же время известно, что количество нитритов и нитратов, выводимых из

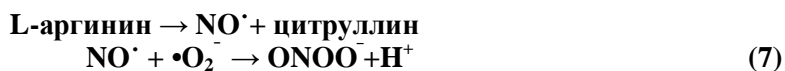
организма, заметно больше, чем их число, поступившее в организм с пищей [7]. При низких концентрациях в газовой фазе NO практически не реагирует с O₂. В условиях *in vivo* константа скорости убыли NO в реакции с кислородом составляет всего K=0,124 с⁻¹ [2].



Стационарные концентрации NO(NO[•]), продуцируемые *in vivo* NO-синтазами, крайне низкие 10-100 нм (10⁻¹⁰-10⁻⁹ моль) [2]. Из-за низких концентраций взаимодействие *in vivo* NO(NO[•]) с O₂ по (6) практически не играет заметной физиологической роли.

С другой стороны, радикал оксида азота NO[•] (продукт генерации NO-

синтазных ферментов) необратимо взаимодействует с супероксид-анион радикалом •O₂ с образованием в основном цис-пероксинитрита с огромной скоростью 6,7·10⁹ M⁻¹ с⁻¹, что в три раза превышает скорость реакции супероксиддисмутазы с супероксидом.

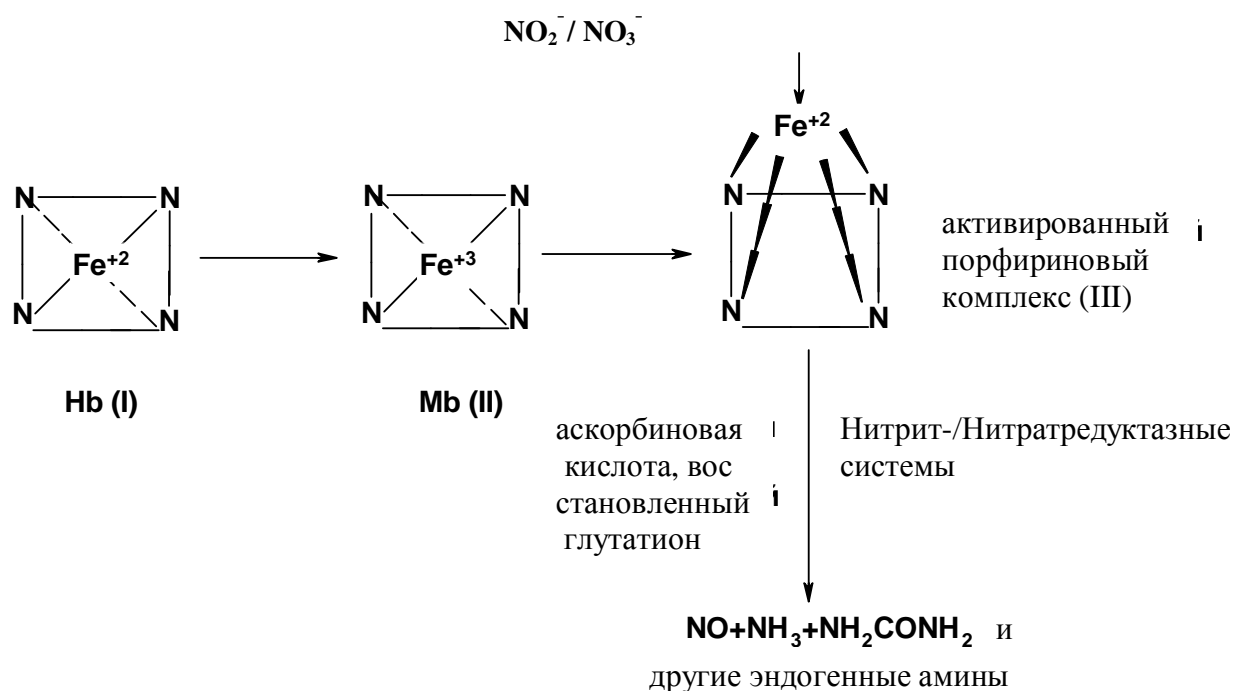


Образующаяся в реакции (7) молекула цис-пероксинитрит иона (ONOO⁻) достаточно стабильная и не может служить источником генерации *in vivo* NO₂⁻ / NO₃⁻. Вследствие устойчивости этой молекулы она способна диффундировать на расстояния в несколько диаметров клеточных тел.

Важную роль в соответствии с концепцией [7] в генерации NO по (1) при восстановлении в крови NO₂⁻ / NO₃⁻ нитрит-/нитратредуктазными системами играет дезоксигемоглобин (дезокси-НЬ), в миокарде и скелетных мышцах-

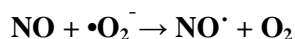
(миоглобин МЬ), в тканях, в митохондриях (цитохромоксидазами), микросомах (цитохромом P-450) [7,8].

Однако с учётом того, что при окислении дезоксигемоглобина (I) в миоглобин (II) генерируется супероксид-анион радикал, а в митохондриальной дыхательной цепи генерируется значительное количество •O₂ как в норме, так и в патологии, происходит запуск неферментативной реакции (9), а это ставит под сомнение утверждение ингибирования NO-синтазного механизма запуска метаболизма NO-цикла при ишемии/гипоксии.



При введении цыплятам-бройлерам пер os значительных доз азотнокислого натрия (NaNO_2 или NaNO_3) в условиях формирования хронической ише-

мии/гипоксии содержание компонентов красной крови обычно уменьшается, а содержание метгемоглобина сильно возрастает [Л.С.].



Однако из экспериментальных результатов по влиянию комплексных соединений соли цинка с пиридином или никотинамидом в различных модификациях с витамином С на гематологические показатели цыплят-бройлеров следует, что концентрация эритроцитов и гемоглобина возрастает относительно нормы, а концентрация метгемоглобина существенно снижается [Л.С.].

Подобное разнохарактерное влияние ионов цинка на гематологические показатели опытных и контрольных групп цыплят-бройлеров можно объяснить окислением пиридина в комплексе с сульфатом цинка до α -кетоглутаровой кислоты (рис.1).

В литературе [3] известны только несколько примеров деградации пиридина микроорганизмами, что свидетельствует о

высокой химической инертности пиридиновых оснований. Окисление пиридина в животном организме ферментативными системами протекает с незначительной скоростью.

Нами впервые обнаружено окисление пиридина в животном организме (цыплята-бройлеры) до нетоксичного и биологически активного 3-оксипиридина.

Вскармливание цыплят комплексом состава $2\text{C}_5\text{H}_5\text{N} \cdot \text{ZnSO}_4$ с дозой 0,3 г на 1 кг комбикорма до 60 дневного возраста показало (табл. 1), что к убойному сроку средняя живая масса бройлеров опытной группы на 11,1% выше, чем в группе вскормленных только сульфатом цинка (1921 г против 1728 г в контроле).

Поглощение в спиртовом экстракте мяса опытных цыплят в УФ области λ_{max} 218-220 и 277-278 нм свидетельствует о

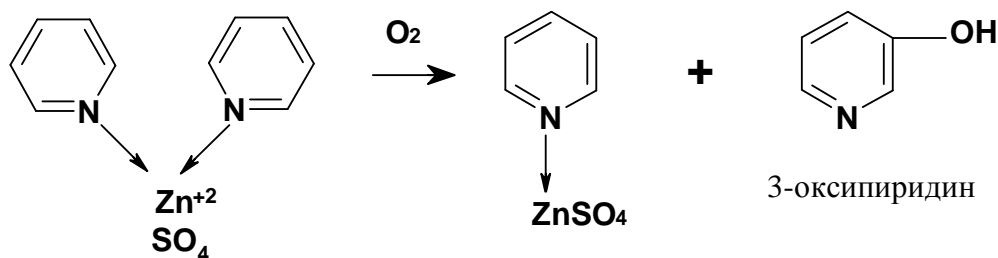
наличии в экстракте окисленной формы пиридина. Эта область поглощения обычно приписывается 3-оксипиридину. Методом ТСХ обнаружено, в сравнении со свидетелем, наличие 3-оксипиридина в спиртовом растворе мяса животных, хотя возможно наличие и других окисленных производных пиридина. Усиление интенсивности роста массы цыплят II опытной группы относительно массы цыплят контрольной группы, очевидно, объясняется способностью 3-оксипиридина усиливать обменные процессы в организме.

Дегградация пиридина в животном организме, по-видимому, протекает по следующей схеме (рис.1).

В организме животных аланинотрансфераза (АлАТ) катализирует обратимую реакцию переноса аминогруппы с аланина на α-кетоглутаровую кислоту [10].

Накопление в организме α-кетоглутаровой кислоты вследствие окисления пиридина в комплексе с сульфатом цинка (2Рy·ZnSO₄) сопровождается возрастанием концентрации L-глутаминовой кислоты-важного субстрата цикла лимонной кислоты.

A.



B.

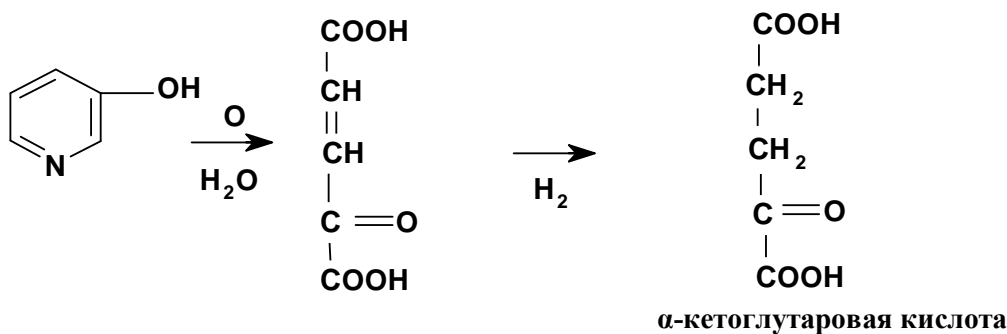
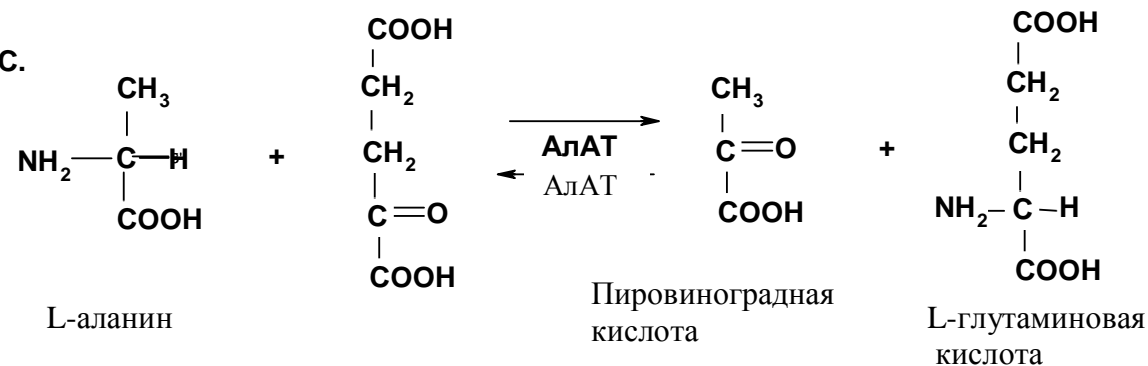


Рис. 1. Схема фрагментации пиридина в комплексе

C.



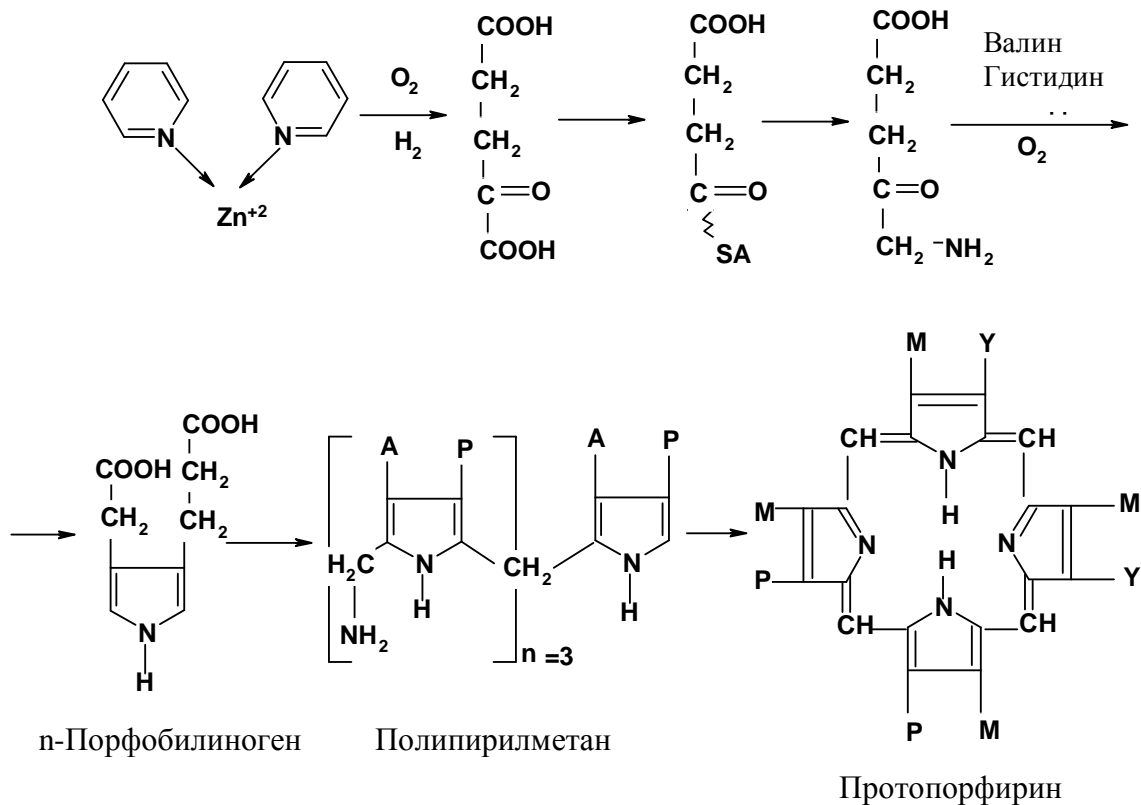
Увеличение концентрации этого субстрата сопровождается возрастанием в

цикле лимонной кислоты синтеза АТР и

значительным усилением метаболических процессов соответственно (рис. 1, табл. 1).

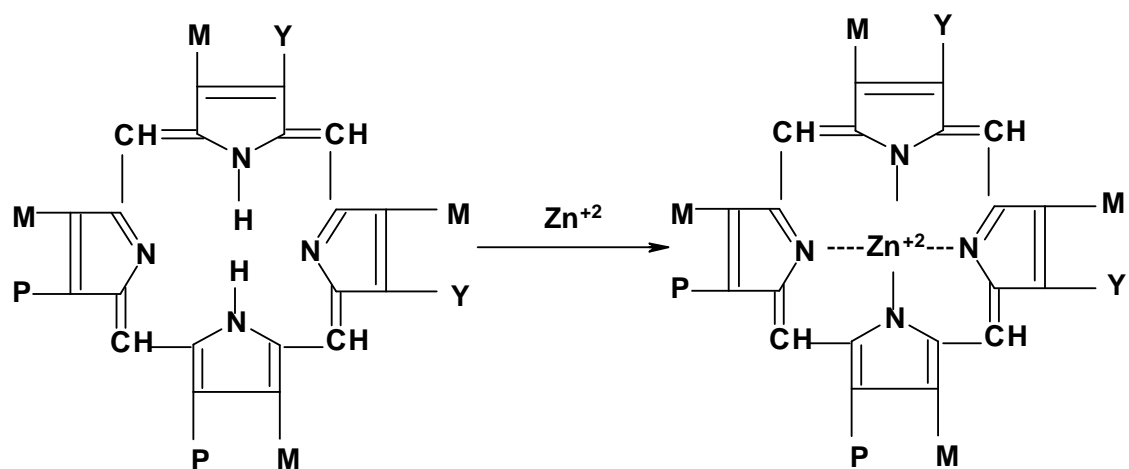
С другой стороны, α -кетоглутаровая кислота может служить исходным суб-

стратом для генерации на этой структурной основе δ -аминолевулиновой кислоты, участвующей в синтезе протопорфирина.



В свою очередь протопорфирин, по-видимому, взаимодействует с ионом цинка (Zn^{+2}) с образованием цинкосодержащего порфирина, на поверхности которого

(Zn^{+2}) происходит фиксирование и восстановление нитрит- и нитратредуктазами оксида азота NO по известной схеме [7,8].



M, P, Y- различные функциональные заместители

Выше указывалось что, NO -короткоживущая молекула, она стабили-

зируется посредством включения в динитрозольные комплексы железа с тиоловыми

лигандами или в S-нитрозотиолы, которые в дальнейшем могут высвободить NO[•] в зависимости от места локализации. По-видимому, этим и объясняется разный ха-

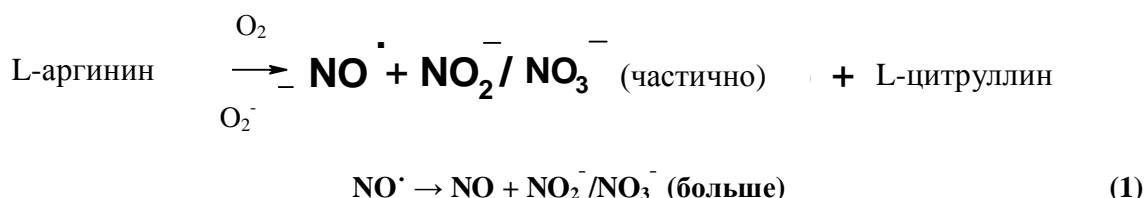
рактер локализации нитратов и нитритов в органах и тканях подопытных цыплят (табл. 1).

Таблица 1. Влияние пиридина, комплекса пиридина с сульфатом цинка, сульфата цинка на сохранность (б) и прирост живой массы цыплят-бройлеров, г (P < 0,001)

Группы цыплят	Возраст цыплят (в днях) M±m						
	1	13	30	40	48	58	70
I сред- нее G%	42,0±2,3 –	150,0±4,3 98	500,0±17,5 89	740,0±15,2 78	847,2±17,5 76	1161,0±19,6 76	1736,0±22,1 74
II сред- нее G%	40,0±3,1 –	150,0±4,5 98	506,0±16,4 93	840,0±18,3 76	875,9±16,8 77	122,0±18,5 73	1920,7±23,0 70
III сред- нее G%	41,0±2,1 –	147,0±5,0 98	508,0±5,0 93	805,0±18,2 79	865,1±18,3 76	1179,8±19,5 76	1745,3±21,7 74
IV сред- нее G%	40,0±3,4 –	147,0±4,7 98	475,0±15,0 90	757,0±16,5 83	815,9±18,8 82	1120,3±17,6 78	1373,7±22,3 78
V сред- нее G%	40,0±2,5 –	138,0±4,4 100	500,0±16,3 96	773,0±17,6 84	941,4±17,1 84	1174,0±18,4 80	1728,3±21,5 80
VI сред- нее G%	40,0±2,8 –	115,0±4,5 90	430,0±15,4 75	721,0±18,0 65	822,3±16,9 65	1050,0±19,5 60	1386,7±21,7 60

Обозначения: I группа-контрольная, II-VI группы- опытные. Животные вскармливались на обычном корме. Отличие составило то, что II группе в корм вводилось 0,3 г комплекса 2Py·ZnSO₄ на 1 кг корма, III группе- 0,6 г 2Py·ZnSO₄, IVгруппе- 0,9 г 2Py·ZnSO₄, V группе-0,6 г ZnSO₄ и VI груп-пе-0,3 г пиридина (Py) на 1 кг корма. Количество цыплят в каждом опыте около 1000.

Тогда из приведённого выше экспериментального материала можно заключить, что ключевым моментом запуска по замкнутому циклу NO[•] является реакция диспропорционирования эндогенного NO[•] по цепочке.



Таким образом, наличие NO-синтазного механизма эндогенного синтеза NO[•] и частично ионов NO₂⁻ / NO₃⁻, а также нитрат -/нитритредуктазных систем и других низкомолекулярных соединений:

витамина С и других, обеспечивающих восстановление NO₂⁻ / NO₃⁻ как в норме, так и в патологии в ферро-дезокси-и цинк-гемосодержащих биоструктурных едини-

пах создаёт условия для функционирования цепочки (1) по замкнутому циклу.

Материал и методы

Нами проведена серия научно-хозяйственных, физиологических и производственных экспериментов на цыплятах-бройлерах проса «Смена», «Белый леггорн», курах-несушках проса «Смена-2» и ремонтном молодняке в условиях птицефабрик «Северо-Осетинская» и «Владикавказская» РСО-Алании. В ходе эксперимента были поставлены 4 научно-хозяйственных, 2 физиологических и 1 производственный опыты. Были сформированы по 5 групп по 100 голов в каждой 43 цыплят-бройлеров, и ремонтного молодняка по 5 групп по 80 голов кур-несушек. Контрольная 1 группа получала основной рацион (ОР). Экспериментальные группы получали:

- 1 опытная ОР+0,5% цинкового комплекса пиридина
- 2 опытная ОР+0,5% никотината цинка
- 3 опытная ОР+0,5% цинкового комплекса пиридина +0,5% витамина С
- 4 опытная ОР+0,5% никотината цинка +0,5% витамина С.

В ходе эксперимента изучали следующие показатели: сохранность и оплату корма приростом, морфологический и биохимический состав крови, перевариваемость и использование питательных веществ рациона, морфологические и биохимические показатели яиц, морфологические и биохимические показатели органов и тканей, эколого-биохимические характеристики органов и тканей, экономическую эффективность.

Всего в I эксперименте 1400 голов.

Показатели крови по И. Кондрахи-ну.

Щелочную фосфатазу по О. Bessey et.al. (1966).

ПОЛ и состояние антиоксидантной защиты в крови по Л.М. Двинской и Л.И. Никифоровой (1975).

Активность каталазы (М. А. Королук и др. 1988).

Активность глутатионредуктазы (Д. Naferman et. al. 1974).

Активность трансаминаз (аспаргат-и аланин-трансфераз по В.В. Меньшикову 1987).

Баланс азота, азотистых веществ по М.И. Дьякову (1959).

Глутаматдегидрогеназную активность по М. Balazs (1965).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Koshland D.E.//Science. 1992.vol. 258. с.1861
2. Роль оксида азота в норме и патологии. В журнале: Вестник Российской АМН, №4, 3-52 (2000)
3. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С.//Усп. Современной биологии. 2005. 125. №1. с.41-65
4. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. - М., 1997
5. Ванин А.Ф.//Вестник РАМН. 2000. №4. с.3-5
6. Викторов И.В.//Вестник РАМН. 2000. №4. с.5-10
7. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands.- Amsterdam, 1991. с.5-10
8. Северина И.С., Буссыгина О.Г., Пятакова Н.В.//Вестник РАМН. 2000. №4. с.25-30
9. Коростелева Л.А., Кост А.Н., Воробьева Л.И., Модянова Л.В., Терентьев П.В., Куликов Н.С.//Прикладная биохимия и микробиология. 1981. 17(вып.3). с.380-388
10. Лохова С.С., Лохов А.Р. Материалы III Междунар. конф. «Экологически безопасные технологии в сельскохозяйственном производстве XXI века». Владикавказ. 2000. с.449
11. Лохов А.Р. «Использование комплексных соединений цинка с пиридином и никотиновой кислотой и витамина С для утоксикации нитратов в организме цыплят-бройлеров». Дисс. канд. биол. наук. Владикавказ. 2002.

**NEW METHODIC-BIOLOGICAL MODEL OF NITROGEN OXIDE CLOSED
CIRCUIT FUNCTIONING**

Lokhova S.S.

Gorsky state agrarian university, Vladikavkaz

The concept that so-called nitrogen oxide closed circuit is based not on the mechanism of NO regeneration in the process of NO_2^- / NO_3^- ions reduction by nitrate/nitrite reductase systems, but on the disproportionation of radical NO° generated by NO-synthases on the basis of the mechanism $NO^\circ \rightarrow NO + NO_2^- / NO_3^-$ is being experimentally grounded

For the first time it has been shown that in animals' organisms pyridine (Py) in the complex formula of $2Py \cdot ZnSO_4$ unexpectedly, as distinct from the pyridine bases, easily oxidates to α -ketoglutaric acid, and further, the latter under the influence alanineaminotransferase regenerates, *in vivo*, to L-glutamic acid – one of the substrates of the citric acid cycle. This allows understanding the mechanism of functioning of the closed circuit of initiation of metabolic and physiological processes in the cells of living organisms