



УДК 577.152.

**БИОГЕННЫЙ ОКСИД АЗОТА: ДЕСЯТЬ ЛЕТ ВТОРОГО ПРИШЕСТВИЯ.
ПРЕДЫСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ
АРГИНИНЗАВИСИМОГО БИОСИНТЕЗА NO**© 1999 г. А. А. Недоспасов[#]

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова

Поступила в редакцию 12.11.98 г. Принята к печати 23.12.98 г.

Каждый мнит себя стратегом, видя бой со стороны.

Ш. Руставели

Обзор посвящен десятилетию открытия аргинин-оксигеназного пути биосинтеза оксида азота (NO) – одного из крупнейших и наиболее неожиданных открытий биохимии последнего времени, отмеченного в 1998 г. Нобелевской премией. Прослежены основные этапы ранних исследований. Показано, что многие факты указывали на существование биогенного NO задолго до 1987 г., но не принимались во внимание из-за психологических причин – признание NO неслучайным метаболитом требовало пересмотра многих положений, казавшихся незыблемыми.

Ключевые слова: оксид азота (NO); аргинин; глицерина тринитрат; EDRF; гуанилатциклаза; нитрат; нитрит; цитруллин.

12 октября 1998 г. Нобелевский комитет постановил присудить Нобелевскую премию за 1998 г. по физиологии или медицине совместно Роберту Фарчготту, Луису Игнарро и Фериду Мураду за их открытие “Оксид азота как сигнальная молекула в сердечно-сосудистой системе” (цитировано по архиву Нобелевского комитета в Интернете, web site: www.almaz.com).

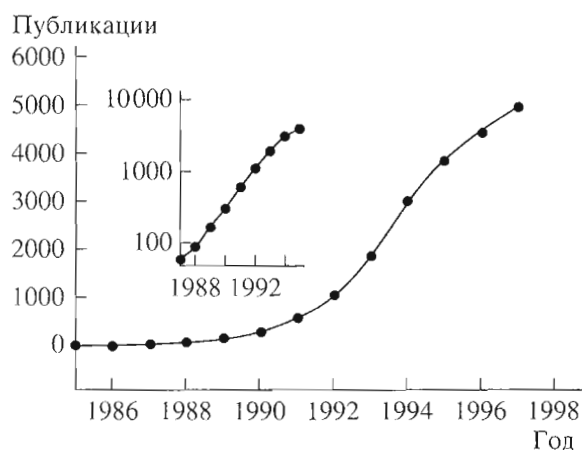
Оксид азота (NO) – бесцветный, реакционно-способный газ, образующийся из азота и кислорода воздуха при грозах и ядерных взрывах в атмосфере и синтезируемый в крупнотоннажном производстве азотной кислоты каталитическим окислением аммиака. Будучи одним из немногих стабильных свободных радикалов, NO долгое время рассматривался как ядовитое, опасное для здоровья вещество, диаметрально противоположное чему-либо связанному с жизнью. Традиционные программы химического образования весьма способствовали выработке подсознательного неприятия биогенного NO как любой молекулы с нечетным числом электронов. Ставшая общеизвестной канцерогенность нитрозаминов, присутствие оксидов азота в табачном дыме и в

выхлопных газах, контроль содержания нитратов и нитритов в овощах, обоснованно пропагандируемый экологами и реально осуществляемый в большинстве цивилизованных стран, действительно, создают NO незавидную репутацию.

Одним из наиболее неожиданных открытий биохимии в последнее время было обнаружение синтеза NO клетками млекопитающих в 1987 г. [2–4]. Открытие это настолько противоречило сложившимся представлениям, что первоначально многими воспринималось скептически, и даже после подтверждения независимыми исследователями группами [5, 6] термины “гуанилилциклаза-активирующий фактор” (guanylyl cyclase-activating-factor, GAF) и “эндотелиальный фактор релаксации” (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) применительно к биогенному NO встречались в публикациях и пять лет спустя [7–9]. В результате бума, последовавшего за осознанием значения открытия, счет числа публикаций пошел на сотни и тысячи, биосинтез NO был обнаружен у беспозвоночных [10] и, видимо, имеется у большинства представителей животного царства. В 1992 г. NO был назван “молекулой года” [11], что еще более увеличило престиж работ по биогенному NO и добавило в них элементы спортивного соперничества. Сообщение, что некоторые бактерии также синтезируют NO [12], было воспринято уже как констатация давно предсказанного явления, однако у растений аргининзависимый биосинтез NO до сих пор не обнаружен. Следствиями быстрого роста числа публикаций (рисунок) оказываются получение одних и тех же

Сокращения: NOS – NO-синтазы; ГЦ – гуанилатциклаза; EDRF, GAF – эпителиальный фактор релаксации, гуанилатциклаза-активирующий фактор (синонимы) – в ранних исследованиях – неохарактеризованное вещество, вызывающее релаксацию аорты и активацию гуанилатциклазы, позже – NO или “NO-эквивалент” – продукт превращения NO, вызывающий те же реакции, подробнее см. [1]; Hb – гемоглобин.

[#] Факс: (095) 196-02-21; e-mail: nedospas@img.ras.ru; тел.: (095) 196-18-52.



Число публикаций по биохимии NO за календарный год (база данных MedLine). На интервале 1987–1994 зависимость экспоненциальная с периодом удвоения 14 мес (на вставке – та же зависимость в логарифмическом масштабе по оси ординат).

результатов несколькими независимыми группами, быстрое старение обзорных статей и, зачастую, существенные уточнения, вплоть до полного отрицания, ранее установленных фактов в ходе более поздних детальных исследований.

Экспоненциальный рост числа публикаций с рекордно высоким (14 мес) периодом удвоения в течение *семи* лет вывел NO в число наиболее популярных объектов биохимических исследований. Замечательно, что всплеск числа публикаций сменился не спадом, а последующим линейным ростом в 1995–1997 гг. Более того, открытие нескольких ключевых функций NO в эти годы позволяло предсказать начало нового периода ускорения роста в 1998 г. – линейная экстраполяция на 1998 г. дает значение 5600, прогноз автора – более 6200*. По-видимому, присуждение Нобелевской премии также отразится на числе публикаций.

Статья Митчелла, Шонли и Гриндлея 1916 г. [13] была, видимо, первой публикацией, неопровержимо доказавшей биогенное происхождение нитрата в моче млекопитающих. (Питер Митчелл – отец биоэнергетики – родился 4 года спустя.) В многодневных опытах на крысах и самих авторах было показано, что количество нитратов, выводимых с мочой (у людей – 100–200 мг/л), заведомо больше, чем поступает с пищей. Указав во введении, что “проблема имеет исключительный теоретический интерес...” (“The problem is of peculiar theoretical interest, since the production of an oxidized nitrogenous radicle by animal tissues would be unique”), авторы сделали вывод, что “... ткани тела способны синтезировать нитраты из неокисленных соединений азота (“...the body tissues are able to produce nitrates from unoxidized nitrogenous

radicles”, – под последними подразумевались аминокислоты и другие производные аммиака). Принципиальность полученного результата ярко проявлялась на фоне обзора литературы с многочисленными примерами *восстановления in vivo* искусственно вводимых нитратов и нитросоединений. Авторы работы [13] не обсуждают вероятные пути окисления, ведущие к нитратам, указав лишь, что это будет темой дальнейших поисков (знать бы им, на сколько они растянутся – статья вышла в год рождения Р. Фарчготта!). По тем временам ничего крамольного в идее биохимического окисления аммиака в NO и далее в нитрат не было бы – процесс Оствальда (окисление аммиака в NO на металлических катализаторах) был только что освоен промышленностью, а о неспаренных электронах химии еще не задумывались.

Каких-либо ранних публикаций о целенаправленном поиске биогенного NO найти не удалось. Поскольку было известно, что вводимый искусственно нитрат способен восстанавливаться в нитрит, а восстановление нитрита соединениями Fe^{2+} с образованием различных продуктов, включая NO, можно провести в мягких условиях даже в пробирке, работа Митчелла и соавт. [13] фактически дала право на существование *in vivo* всем известным тогда оксидам азота, включая NO. Заметим, методов определения свободного NO, чувствительность которых была бы достаточной для обнаружения его при реальных концентрациях *in vivo* (порядка 1 мкМ в тканях, 1 нМ в выдыхаемом воздухе), в начале века не существовало, но по крайней мере к концу сороковых годов анализ мог бы быть выполнен лабораториями большинства крупных университетов. С середины 50-х годов стали доступны изотопно-меченые соединения с редким стабильным изотопом ^{15}N (содержание в природной смеси – 0.36%) и появилась возможность использовать метод меченых атомов с масс-спектрометрической детекцией, позволявший обнаружить продукты превращений вводимого меченого метаболита даже при тысячекратном разбавлении немечеными. (Для разделения стабильных изотопов азота применялся обмен газообразного NO с жидкой HNO_2 в проточной системе [14]. Удивительная простота метода – в сравнении с разделением изотопов урана или лития – позволяла собрать установку на лабораторном столе.)

По мере развития химии NO все более терял привлекательность как вероятный метаболит, что ограничивало рамки разумных гипотез биогенного синтеза нитратов, но отнюдь не исключало возможности их образования, минуя NO. Одновременно NO активно применялся в биохимических исследованиях как легкодоступный реактив. Значительное число работ было посвящено действию примеси NO в закиси азота (N_2O), используемой для наркоза, и следов NO в промышленных загрязнениях воздуха (см., например, сборник сообщений о биологическом действии оксидов азо-

* На 3 апреля 1999 г. в базу MedLine введено 5936 публикаций по биохимии NO за 1998 г. Учитывая задержку с вводом, и прогноз 6200 будет превышен.

та в Br. J. Anaesth., 1967, 39(5); среди них исследование по химии реакций оксидов азота с гемоглобином *in vivo* [15], исключительная важность которых для регуляции гемостаза *in vivo* осознана лишь в последние годы, подробно см. [16, 17]). Возможность детекции NO и его комплексов методом ЭПР делала NO излюбленным объектом химфизиков. Так, в 1970 г. Бурбоев и Ванин [18] предложили использовать комплекс железа с NO и цистеином в качестве модельного соединения, сходного по спектру ЭПР с комплексами железа в животных тканях. (Строение и состав полученного комплекса не были определены; в свете современных данных, это была смесь нескольких комплексов – см. [19].) О том, что сходные комплексы реально образуются *in vivo*, возможно, выполняют ключевую роль в регуляции метаболизма и четверть века спустя станут популярнейшим объектом исследования мог бы догадаться разве что пророк. (Статья [18] была представлена к публикации в Доклады Академии наук академиком Эммануэлем.) Год спустя нитрозильные комплексы железа в тканях животных были прямо названы эндогенными [20].

В 1975 г. появилась статья Ода и соавт. [21] о судьбе NO, поступающего в организм при дыхании загрязненным NO воздухом (во введении статьи красочно описано, как опасны оксиды азота в воздухе крупных городов). В крови мышей, дышащих воздухом с примесью NO (1 : 100000 по объему), через 10 мин после начала ингаляции (первая экспериментальная точка) методом ЭПР обнаружен сигнал комплекса NO-гем, многократно превышающий экспериментальную ошибку. К 20 минуте (вторая точка) содержание его вышло на плато и далее оставалось неизменным. Перенос мышей в чистый (без NO) воздух приводил к быстрому (<10 мин) падению уровня комплекса, однако какое-то его количество сохранялось до завершения эксперимента (!). Работа является яркой иллюстрацией степени подсознательного неприятия биогенного NO – измерения количества комплекса до начала вдыхания NO не были проведены, более того, приведенная в статье кривая зависимости [NO-гем] = $f(t)$ выходит из начала координат (0,0), хотя будучи построенной по экспериментальным точкам, приведенным на том же графике, она с большим основанием могла бы начинаться как раз на уровне, достигнутом к концу эксперимента.

Два года спустя Бурбон, Бомпарт и Леви показали, что добавка NO к воздуху, содержащему следы CO, не приводит к изменению содержания комплекса CO-Hb в крови, хотя сродство NO к гемоглобину значительно выше [22], что также указывало на высокую скорость утилизации NO.

Через год (1978) Ванин и сотр. обнаружили по спектрам ЭПР динитрозильные комплексы железа в печени крыс, получавших сульфат железа, цитрат и нитрит с питьевой водой [23]. (Богатый опыт общения советских ученых с овощными ба-

зами в те времена не мог не привлечь их внимание к экологическим проблемам сельского хозяйства.) По-видимому, образование NO из нитрита *in vivo* представлялось авторам самоочевидным; оказалось, однако, что количество комплексов растет при одновременном введении Fe²⁺. В работе был сделан вывод о существовании прочно- и слабосвязанного железа, причем только последнее способно образовывать динитрозильные комплексы. Вопросы возможного участия вводимого железа в восстановлении нитрита, судьбы нитрита и NO в отсутствие железа и дальнейших превращений комплексов не обсуждались.

Одновременно группа американских исследователей, изучая биохимические механизмы вреда курения, определила содержание NO в крови курящих и некурящих добровольцев, а также обезьян и крыс, используя высокочувствительный метод изотопного разбавления с масс-спектрометрической детекцией ¹⁴NO/¹⁵NO [24]. Постановка задачи логично вытекала из данных о заметном содержании NO в табачном дыме, многократно превышающем безопасную концентрацию, установленную стандартом США, и связывании его в легких. К полной неожиданности исследователей (судя по описанию результатов и дискуссии в статье), концентрация NO в крови как курильщиков, так и некурящих оказалась практически одинаковой и составила в среднем у людей – 21, обезьян – 17, крыс – 7 мкМ с небольшими вариациями. У одного из испытуемых, однако, концентрация NO была в несколько раз ниже. Повторные измерения спустя несколько месяцев показали, что она практически не меняется.

Авторы сделали вывод, что одним из побочных продуктов метаболизма азота является NO и уровень его в крови предопределен генетически. В принципе, масс-спектрометрия биологических объектов знает немало примеров обнаружения “метаболитов”, образовавшихся в процессе исследования при ионизации лабильного предшественника, однако использованный в работе “мягкий” метод ионизации (FIMS) давал достаточно оснований считать, что возможный предшественник, столь легко распадающийся с образованием NO⁺, может быть только лабильным комплексом NO. Авторы не обсуждают этой возможности. В свете современных данных по крайней мере некоторые органические нитриты и тионитриты, как и комплексы NO с переходными металлами, могли быть альтернативными предшественниками иона NO⁺. Интересно, что из известной в то время скорости окисления NO комплексом Hb-O₂ в нитрат и данных Ода и соавт. [21] о скоростях образования и исчезновения комплекса NO-Hb можно было оценить общее количество NO, образующееся и окисляющееся за сутки. Если бы такая оценка была сделана, назвать NO “побочным продуктом метаболизма” было бы нельзя и работа вряд ли осталась незамеченной. Увы, Фриман и соавт.

[24] ссылаются на [21], но до сопоставления результатов дело не дошло.

Через год стали известны результаты Йошида и соавт. [25] (на английском опубликованы в 1980 г., на японском излагались несколько раньше), показавших, что вводимый при ингаляции NO превращается в смесь нитрата и нитрита, обнаруживаемых в плазме крови и далее в моче.

Сейчас кажется удивительным, что ни работа японских исследователей [21], наблюдавших комплекс NO-Hb (в т. ч. и в норме, до введения эндогенного NO, пусть даже и не обративших на него внимания) и оценивших скорость включения NO в метаболизм, ни работа Фримана и соавт. [24], в которой был количественно определен уровень NO в крови (пусть даже завышенно) и сделан однозначный вывод о существовании значительных количеств биогенного NO, практически никак не повлияли на ход дальнейших исследований, предшествовавших признанию оксида азота в качестве важнейшего метаболита. Увы, даже в науке мы слишком зависим от общественного мнения.

Техника лабораторных работ конца XIX века, общепринятые способы описания новых веществ (цвет, вкус, запах...) и обычаи химиков-синтетиков того времени практически гарантировали, что способность органических нитритов (RONO) при вдыхании их паров расширять кровеносные сосуды (покраснение кожи лица, головная боль...) будет замечена сразу после их открытия. С 1867 г. эфиры азотистой кислоты известны как фармацевтические препараты, снимающие сердечные приступы.

Органические нитраты (RONO₂), в т. ч. высокомолекулярные*, особенно, "нитроглицерин"

* А. Нобель – открыватель динамита (диатомит, импрегнированный тринитратом глицерина) и учредитель высшей научной награды в свое время отказался принимать нитроглицерин, назначенный ему врачом в связи с болезнью сердца. Век спустя присуждение премии его имени в значительной степени связано с объяснением биохимического действия нитроглицерина...

Имен первооткрывателей сосудорасширяющего действия нитратов высокомолекулярных соединений установить не удалось: вероятно, широкое появление производных нитроцеллюлозы (в качестве взрывчатых веществ и порохов) в действующих армейских частях способствовало многократному открытию возможности их медицинского использования. В 1969 г. в заенсейской тайге автор встретил безнозогого (на протезах) охотника, на вид – семидесяти лет. В юности на охоте он зимой провалился под лед и добрался до жилья лишь через сутки с сильно обмороженными ногами. Старожилы предлагали в качестве лечения народные средства, но оказавшийся в поселке врач (фельдшер?), бывший ранее хирургом в полевом госпитале, посоветовал "натереть ноги пироксилином – мы всегда так делали – очень согревает". Совет был принят... – через некоторое время ноги пришлось ампутировать из-за начавшейся гангрены. По единодушному мнению старожил, причиной гангрены было не обморожение, а избранный метод лечения – в свете современных представлений, видимо, искусственно вызванный NO-зависимый шок, роль макрофагов как суперпродуцентов NO сыграл пироксилин.

(тринитрат глицерина), более 100 лет применяются как сосудорасширяющие средства. Несмотря на серьезные усилия, механизм их действия оставался неизвестным, хотя участие их в метаболизме и по крайней мере частичное превращение в неорганические нитрит и нитрат были надежно доказаны. Сходные свойства были найдены у некоторых других соединений азота, химически весьма отдаленных, среди них нитропруссид – [Fe(CN)₅NO]²⁻ – популярный аналитический реагент, содержащий NO во внутренней сфере комплекса, и сам NO. В 1977 г. [26, 27] Арнольдом, Мурадом и соавт. была показана способность нитроглицерина, нитропруссиды и NO активировать гуанилатциклазу – ключевая роль cGMP в регуляции метаболизма была уже известна. Более того, авторы пришли к выводу, что именно NO является истинным активатором, остальные – лишь его предшественники. При исследовании активации гуанилатциклазы табачным дымом [27] логическая цепь была именно такой – NO активирует фермент; в табачном дыме есть NO; значит, табачный дым тоже будет его активировать, что полностью подтвердилось.

Размышляя об истории открытия биогенного NO, невозможно избавиться от ощущения, что Господь вознамерился проверить мыслительные способности человека и проводил своеобразную олимпиаду, подчас подыгрывая испытуемым: в то же самое время (год в год! 1977 г.) Дегучи обнаружил в тканях мозга низкомолекулярный лабильный фактор, активирующий гуанилатциклазу (GAF), не идентичный ни одному из испытанных им метаболитов, участие которых в регуляции ферментов мозга было известно ранее, устойчивый к действию нескольких гидролаз, инактивируемый гидроксиламином, N-метилгидроксиламином и гемоглобином (! – на олимпиадах школьников так подсказывают только безнадежно слабым участникам) и по свойствам поразительно схожий с ...метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином [28] (канцерогенность нитрозаминов и родственных соединений была уже достаточно изучена, продуктам метаболизма аргинина среди них придавали большое значение).

Подсказка осталась не востребованной – никто за 10 лет (!!) не связал эти два факта, хотя возможность существования у NO, как активатора гуанилатциклазы, различных метаболических предшественников была очевидна. Так, годом позже Арнольд, Мурад и соавт. серией исключительно красивых экспериментов доказали [29, 30], что активация гуанилатциклазы под действием азида натрия (NaN₃), открытая ранее, но не находившая объяснения, связана с превращением N₃⁻ в NO *in vivo*. Рационально объяснить выбор в качестве объекта изучения азида – популярного лабораторного консерванта, метаболизм которо-

го *in homo* представлял практический интерес разве что для судебной медицины и спецслужб, но не аргинина, – можно лишь подсознательно принять установку, что у *искусственного* (как тогда казалось) активатора гуанилатциклазы не может быть естественных предшественников. Видимо, мысль о естественности NO представлялась совершенно абсурдной – “этого не может быть, потому что не может быть никогда”.

В то же время Кравен и Де Рубертис установили, что активация связана с образованием парамагнитного комплекса NO-гем [31] (аналогично наблюдавшемуся японскими исследователями три года ранее [21]). Игнарро и соавт. была высказана мысль, что действующим началом во всех случаях являются нитрозотиолы (RSNO), образующиеся *in vivo* из любого из этих соединений [32, 33]. В качестве курьеза заметим, что способ получения нитрозотиолов действием NO на тиол в бескислородной среде, изложенный в экспериментальной части работ [32, 33], в принципе неосуществим – то ли следы кислорода, то ли каталитические количества переходных металлов должны были присутствовать (подробно обсуждается в [1, 19]). Поскольку полученные “нитрозотиолы” не были охарактеризованы, установить, что имело место в действительности, теперь невозможно. Во всяком случае был установлен замечательный факт: “нитроглицерин” активирует гуанилатциклазу в присутствии цистеина, а нитрит – в присутствии любого тиола и даже аскорбиновой кислоты (исследования проводили с неочищенной белковой фракцией и катализаторов окислительно-восстановительных реакций в системе хватало).

“Нерадивому ученику урок повторится” – через три года после публикаций Арнольда и Дегучи Фарчготтом и Завадским [34] описана секреция эпителиальными клетками аорты низкомолекулярного вещества, способствовавшего релаксации гладких мышц артерий под действием ацетилхолина. Структура вещества, названного “эндотелиальным фактором релаксации” (endothelium-derived relaxing factor, EDRF), не была установлена, однако было показано, что он не относится ни к одному из классов известных мессенджеров (пептиды, нуклеотиды, простагландины), требует для своего образования кислорода (!) и действует точно так же, как нитрит и “нитроглицерин”^{*}.

В 1981 г. Грин и соавт. повторили работу Митчелла 1916 г. на современном уровне [36]. В трехмесячных опытах на студентах-добровольцах Массачусетского института технологии (MIT – американский аналог нашего Физтеха) были подтверждены результаты Митчелла о выделении нитрата с мочой в количествах, превышающих

поступающие с пищей и воздухом (данные о содержании оксидов азота в воздухе на территории MIT были учтены при расчетах, вклад их был ничтожен). С использованием ¹⁵N-меченого NaNO₃ было показано, что более половины искусственно вводимого нитрата выводится в течение суток. Более того, потребление нитрата с пищей не уменьшает его биосинтез. Суточное выделение нитрата обычно постоянно, но иногда (отмечена положительная корреляция с расстройством пищеварения и диареей) резко возрастает и за несколько дней плавно возвращается к норме. Вместе с ранее полученными данными тех же авторов [37], показавших в опытах на крысах, что флора кишечника не имеет отношения к появлению нитратов, результат явно указывал на окисление азотсодержащего предшественника клетками млекопитающих. Интересно, что полностью баланс нитратов свести не удалось, а 2–4% меченого азота обнаружилось в составе аммония и мочевины (данные не приведены).

Два года спустя та же лаборатория сообщила, что в опытах на крысах ¹⁵N-меченый ацетат аммония окислялся в ¹⁵N-нитрат и инъекция липополисахаридов многократно усиливала этот процесс [38]. Стьюер и Марлетта [39] в 1985 г. показали, что за образование нитрата ответственны макрофаги – как и в исследовании Вагнера и соавт. [38] липополисахариды (клеточные оболочки *E. coli*) резко активировали синтез NO₃⁻ из ¹⁵N-меченого NH₄⁺. Принципиально, что одновременно с нитратом был обнаружен нитрит. Наконец, в 1987 г. Гиббс, Таинтор и Ваврин доказали, что в нитрит и нитрат окисляется именно азот гуанидиногруппы аргинина [40]. Другие аминокислоты и аналоги аргинина не только не обладали этой способностью, но конкурентно тормозили секрецию нитрита и цитотоксичность макрофагов.

Таким образом, исследования, приведшие к открытию биосинтеза NO, велись по двум основным направлениям. Первое направление берет свое начало с попыток объяснить действие азотсодержащих вазодилаторов типа нитроглицерина и должно было ответить на вопрос “КАК?” и по отбору методов исследования было более физиологическим. Второе, начавшееся с желания найти источник появления биогенных нитратов, одновременно с КАК? требовало ответа на вопрос “ЗАЧЕМ?”, а ясная химическая постановка задачи привела к химическому уклону в методах ее решения. Оба направления развивались практически независимо одно от другого (и NO, и аргинин активируют гуанилатциклазу; аргинин окисляется в смесь нитрита и нитрата). Чрезвычайной важности результаты, получаемые случайно в ходе решения посторонних задач (например, открытия NO в крови Фриманом или нитрозокомплекс-

^{*} В автобиографической статье [35] Фарчготт годом рождения EDRF называет 1978 г.

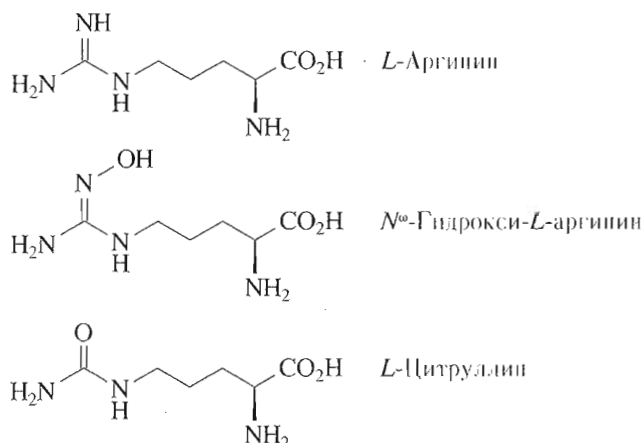
сов в печени Ваниным), не принимались во внимание представителями ни одного из направлений. К началу восьмидесятых годов мировая наука в целом накопила более чем достаточно фактов, указывающих на существование биогенного NO или очень сходного соединения, но в каждом из независимо развивавшихся направлений критический порог осмысленных фактов не был превышен – высказывание, тем более публикация о возможности образования биогенного NO представлялись слишком еретичными и требовали известного мужества и от авторов, и от редакторов. Полная неясность с механизмом образования также не располагала к выступлениям. Более того, в 1982 г. Боннер и Пирсалл в двух блестящих статьях описали кинетику восстановления нитрита в NO и далее в N₂O двухвалентным железом в ацетатном буфере при 25°C и pH 6 [41, 42]. Работа была выполнена в классическом стиле физической неорганической химии и опубликована в журнале *Inorganic Chemistry*. По-видимому, для химиков – участников исследований – знакомство с работой оказалось “отягчающим фактором”. Наличие нитрита в качестве предшественника и железа в самых разных формах *in vivo* и ясный модельный механизм генерации NO одноэлектронным восстановлением с их участием никак не располагали к поиску альтернативного биосинтеза NO реакцией окисления.

Любой школьник-старшеклассник, в глаза не видевший ни одного научного журнала, на вопрос: “Какое вещество способно окисляться при комнатной температуре кислородом в присутствии воды с образованием смеси нитрата и нитрита?” – ответит “NO”. Для мировой науки применительно к происхождению биогенных нитрата и нитрита этот ответ представлялся невозможным в течение многих лет, стоил колоссального труда и справедливо считается выдающимся научным достижением.

История умалчивает, кто первым уверенно сказал “NO!” во “втором пришествии” – непосвященным остается изучать мемуары участников (да существует ли объективный критерий установления первенства в ситуации, когда ссылки на работы предшественников, наблюдавших NO *in vivo* десятью годами раньше, может найти по указателям Chemical Abstracts любой желающий? – видимо, критерием должны являться не буквы NO, а величина восклицательного знака после них). Ясно, что от первого “NO!” до выхода статей прошел не один месяц, и круг посвященных был достаточно широк до первых публикаций – это была сенсация. Общеизвестна статья Пальмера, Ферриджа и Монкадо в *Nature* [3] (поступила 28 января, опубликована 11 июня 1987 г.). Авторы указывают, что Фарчготт предположил, что EDRF – это NO, и они это проверили, открыв NO высокочувствительной реакцией хими-

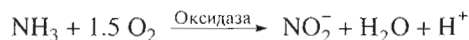
люминесценции при взаимодействии с озоном и сравнив скорости дезактивации (“периоды полураспада”) и спектры активности EDRF и NO. (Тезисы самого Фарчготта [2] были опубликованы практически одновременно.) Статья Игнаро и соавт. [4], весьма близкая по содержанию, вышла в конце года и содержит ссылку на статью Пальмера. Ни в той, ни в другой публикации ни слова нет о том, откуда появляется биогенный NO.

Между тем представители второго (“нитратного”) направления, зная к началу года, что источником нитрита и нитрата является L-аргинин [40], исследовали продукт его превращения, сопряженный с образованием нитрита/нитрата. Две независимых группы установили, что одновременно образуется цитруллин [43, 44], т. е. только один атом азота аргинина подвергается окислению. Поразительно, что Йенгар, Стьюер и Марлетта [44] точно предсказали, не имея никаких экспериментальных доказательств, только из химической интуиции, структуру интермедиата в реакции окисления N-гидроксиаргинина



(экспериментально их правота была подтверждена несколько лет спустя [45]), но “NO” так и не было произнесено даже в виде гипотезы: табу на NO для химиков все еще было в силе.

В высшей степени драматично развивались исследования в группе Гиббса. Первооткрыватели аргинина в качестве предшественника нитрита и нитрата и цитруллина – в качестве второго продукта предположили [43], что существует аргининдезиминаяза, под действием которой образуются цитруллин и аммиак, окисляющийся далее в нитрит и нитрат.



Система уравнений из статьи [43].

Действительно, L-аргинин превращался в L-цитруллин, нитрит и нитрат, гомоаргинин (лишняя CH₂-группа) вел себя аналогично, D-изомеры бы-

Хронология открытия аргинин-оксигеназного пути биосинтеза NO

Год		Авторы
1867	Ингаляция паров изоамилнитрита снимает сердечные приступы	Брантон [47]
1879	Нитроглицерин – кардиологическое средство	Маррелл [48]
Конец XIX века	Полимерные органические нитраты обладают сосудорасширяющим действием	Неизвестны (возможно, случайное открытие военно-полевой хирургии). Обзоры по медицинскому применению NO-доноров см. [49, 50]
1916	С мочой у млекопитающих выводится больше нитрата, чем поступает с пищей	Митчелл, Шонли, Гриндлей [13]
1975	Ингаляция NO вызывает образование детектируемого ЭПР комплекса с гемом, который быстро исчезает при прекращении ингаляции	Ода, Кусумото, Накаима [21]
1977	Механизм сосудорасширяющего действия органических нитратов: образующийся <i>in situ</i> NO вызывает активацию гуанилатциклазы	Арнольд, Миттал, Кацуки, Мурад [26]
1977	В тканях мозга синтезируется низкомолекулярный фактор (GAF), активирующий гуанилатциклазу. Вероятным предшественником GAF является аргинин	Дегучи [28]
1978	В крови людей постоянно присутствует NO	Фриман, Диер, Юхос, Джон, Анбар [24]
1978	Эндогенный нитрит образует Fe-нитрозокомплексы в печени. Введение Fe ⁺² увеличивает их выход	Ванин, Киладзе, Кубрина [23]
1978	Активация гуанилатциклазы связана с образованием комплекса NO-гем	Кравен, де Рубертис [31]
1979	Ингаляция NO вызывает появление нитрата и нитрита в плазме и моче	Йошида, Касама, Китабатаке, Окуда, Имаи [25]
1980	Эпителиальные клетки аорты образуют активный фактор (EDRF), вызывающий релаксацию, по действию идентичный NO. Для образования EDRF необходим кислород	Фарчготт, Завадский [34]
1981	Биосинтез нитрата не прекращается даже при приеме нитрата с пищей	Грин и др. [36]
1983	Аммоний пищи может быть предшественником нитрата. Липополисахариды увеличивают синтез нитрата	Вагнер, Юнг, Танненбаум [38]
1985	Нитрат и нитрит синтезируют макрофаги	Стьюер, Марлетта [39]
1987	Макрофаги синтезируют нитрат из аргинина	Гиббс, Ваврин, Таинтор [40]
1987	Действие EDRF связано с синтезом NO	Пальмер и др. [3], Игнаро и др. [4]
1988	Макрофаги синтезируют нитрит и нитрат окислением аргинина в NO	Гиббс, Таинтор, Ваврин, Рачлин [5]
1988	NO (EDRF) образуется из аргинина	Пальмер, Аштон, Монкада [46]

ли неактивны, а N^ε-метиларгинин оказался ингибитором процесса. С использованием двух независимых высокочувствительных методов в системе был обнаружен аммиак, однако количество его никак не коррелировало с наличием аргинина. Гипотеза явно расходилась с экспериментом, однако дезимидаза так и осталась дезимидазой, а аммиак – промежуточным продуктом. (Это сейчас совершенно очевидно, что обнаружение аммиака независимо от аргинина является доказательством, что не он окисляется, и достаточно было добавить его специально, чтобы убедиться – к превращению аргинина в нитрит он не имеет отношения. Видимо, в то время уж лучше было назвать интермедиат аммиаком, пусть и вопреки экспериментальным фактам, чем заподозрить в нем NO – абсолютную ересь в понимании любого (?) биохими-

ка начала 1987 г., включая рецензентов и редакторов Science, где была опубликована статья.)

Замечателен последний абзац статьи – “Нитрит или промежуточные продукты окисления азота в нитрит и нитрат могли бы участвовать в потере железа аконитазой и другими ферментами, содержащими Fe-S-кластеры в мишенях клеток САМ (активированные макрофаги), в дополнение к индукции других внутриклеточных эффектов” (“Nitrite or oxygenated nitrogen intermediates in the pathway of nitrite and nitrate synthesis could participate in causing iron loss from aconitase and other enzymes containing Fe-S clusters in target cells of CAM in addition to inducing other intracellular effects”) – редкий пример предельно лаконичной формулировки точного научного прогноза развития огромной области исследований, заложенной авторами.

Лишь в 1988 г., более чем через год после выхода статьи Пальмера, обе группы сообщили: нитрит и нитрат макрофагов образуются из NO – продукта окисления аргинина [5, 6]. В то же время группа Пальмера установила, что предшественником EDRF-NO также является аргинин [46].

Противоречивая, двойственная природа самого NO, как химического вещества, и отбор его в качестве метаболита для выполнения многих, подчас прямо противоположных функций (яд и детоксикант, предшественник канцерогенных нитрозаминов и онкопротектор, активатор и ингибитор гем-зависимых ферментов и т. д.) постоянно ставят перед исследователями задачи, методы решения которых неизвестны или абсолютно неожиданны, а результаты не только непредсказуемы, но, даже будучи логически безупречными, часто необычайно трудны психологически для восприятия и первоначально выглядят заведомым артефактом (история открытия биогенного NO – яркая тому иллюстрация). Более того, сама постановка задачи – интуитивно предугадать и исследовать связь известных уже, но кажущихся независимыми фактов и явлений – оказывается скоростьюопределяющей стадией. По-видимому, широта мышления и “свежий взгляд” в подходе к такого рода проблемам являются не менее важными, чем опыт и эрудиция*. Проявив эти качества в полной мере, авторы открытия биосинтеза и биологических функций NO имели не только смелость формулировать утверждения, столь явно противоречащие здравому смыслу, но и упорство при убеждении научной общественности в своей правоте. Благодаря уникальному сочетанию этих качеств биогенный NO получил наконец признание фундаментальной науки, медицина – новые методы профилактики и лечения в самых разных областях, а авторы – десять лет спустя – благодарность человечества.

* Несколько ключевых проблем биохимии NO были предложены автором в качестве задач Соросовской и других химических олимпиад школьников (допускались участники государств бывшего СССР). В условиях излагались факты, доступные мировой науке до решения проблемы ученым сообществом. На основании этих фактов и опираясь на здравый смысл и известную школьнику “общенаучную” информацию необходимо было выдвинуть гипотезу, спланировать эксперимент или предсказать результаты описанного эксперимента... На каждую из проблем, бывших неприступными для мировой науки – подчас годами, – нашлось несколько своих Фарчготтов. Эффективность решений имела статистически достоверную отрицательную корреляцию с возрастом участников [51]. Воистину, “В тот час возрадовался духом Иисус, и сказал: славлю Тебя, Отче, Господь неба и земли, что ты утаил сие от мудрых и разумных и открыл младенцам” [52]. Если NO и не неисчерпаем как атом, предсказать перспективы биохимии NO можно с уверенностью – большинство наиболее сложных задач “олимпиады NO” еще впереди и число их огромно – сегодняшние “младенцы” успеют внести свою лепту в их решение. Призами этой олимпиады будут развитие фундаментальной науки и здоровье человека.

В таблице представлена хронология открытия аргинин-оксигеназного пути биосинтеза NO.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Недоспасов А.А. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 881–904.
2. Furchgott R.F., Kham M.T., Jothiandan D. // *Thromb. Res.* 1987. Suppl. VII. P. 5.
3. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. // *Nature.* 1987. V. 327. P. 524–526.
4. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrnes R.E., Chaudhuri G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 9265–9269.
5. Hibbs J.B., Jr., Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 157. P. 87–94.
6. Marletta M.A., Yoon P.S., Iyengar R., Leaf C.D., Wishnok J.S. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 8706–8711.
7. Schmidt K., Werner E.R., Mayer B., Wachter H., Kukovetz W.R. // *Biochem. J.* 1992. V. 281. P. 297–300.
8. Pollock J.S., Forstermann U., Mitchell J.A., Warner T.D., Schmidt H.H., Nakane M., Murad F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 10480–10484.
9. Schmidt H.H., Murad F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. V. 181. P. 1372–1377.
10. Elphick M.R., Green I.C., O’Shea M. // *Brain Res.* 1993. V. 619. P. 344–346.
11. Koshland D.E., Jr. // *Science.* 1992. V. 258. P. 1861.
12. Chen Y., Rosazza J.P.N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. V. 203. P. 1251–1258.
13. Mitchell H.H., Shonle H.A., Grindley H.S. // *J. Biol. Chem.* 1916. V. 24. P. 461–490.
14. Spindel W., Taylor T.I. // *J. Chem. Phys.* 1956. V. 24. P. 626–627.
15. Toothill C. // *Br. J. Anaesth.* 1967. V. 39. P. 405–412.
16. Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C.A. // *Science.* 1997. V. 276. P. 2034–2037.
17. Gow A.J., Stamler J.S. // *Nature.* 1998. V. 391. P. 169–173.
18. Бурбоев Д.Ш., Ванин А.Ф. // Докл. АН СССР. 1970. Т. 190. С. 1348–1351.
19. Ванин А.Ф. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 924–938.
20. Ванин А.Ф., Кубрина И.Н., Лисовская И.Л., Маленкова И.В., Четвериков А.Г. // Биофизика. 1971. Т. 16. С. 650–656.
21. Oda H., Kusumoto S., Nakajima T. // *Arch. Environ. Health.* 1975. V. 30. С. 453–456.
22. Bourbon P., Bompart G., Levy P. // *Toxicol. Eur. Res.* 1979. V. 2. P. 283–285.
23. Ванин А.Ф., Куладзе С., Кубрина Л.Н. // Биофизика. 1978. Т. 23. С. 474–478.
24. Freeman G., Dyer R.L., Juhos L.T., St. John G.M.A., Anbar M. // *Arch. Environ. Health.* 1978. V. 33. P. 19–23.
25. Yoshida K., Kasama K., Kitabatake M., Okuda M., Imai M. // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1980. V. 46. P. 71–77.

26. Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 3203–3207.
27. Arnold W.P., Aldred R., Murad F. // Science. 1977. V. 198. P. 934–936.
28. Deguchi T. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 7617–7619.
29. Mittal C.K., Arnold W.P., Murad F. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 1266–1271.
30. Murad F., Mittal C.K., Arnold W.P., Katsuki S., Kumura H. // Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1978. V. 9. P. 145–158.
31. Craven P.A., DeRubertis F.R. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 8433–8443.
32. Ignarro L., Gruetter C.A. // Biophys. Biochim. Acta. 1980. V. 631. P. 221–231.
33. Ignarro L., Edwards J.C., Gruetter D.Y., Barry B.K., Gruetter C.A. // FEBS Letters. 1980. V. 110. P. 275–278.
34. Furchgott R.F., Zawadski J.V. // Nature. 1980. V. 288. P. 373–376.
35. Furchgott R.F. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1995. V. 35. P. 1–27.
36. Green L.G., deLuzuriaga K.R., Wagner D.A., Rand W., Istfan N., Young V.R., Tannenbaum S.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 7764–7768.
37. Tannenbaum S.R., Fett D., Young V.R., Land P.D., Bruce W.R. // Science. 1978. V. 200. P. 1487–1489.
38. Wagner D.A., Young V.R., Tannenbaum S.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 4518–4521.
39. Stuehr D.J., Marletta M.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 7738–7742.
40. Hibbs J.B., Jr., Vavrin Z., Taintor R.R. // J. Immunol. 1987. V. 138. P. 550–565.
41. Bouner F.T., Pearsall R.F. // Inorg. Chem. 1982. V. 21. P. 1973–1978.
42. Pearsall R.F., Bouner F.T. // Inorg. Chem. 1982. V. 21. P. 1978–1983.
43. Hibbs J.B., Jr., Taintor R.R., Vavrin Z. // Science. 1987. V. 235. P. 473–476.
44. Iyengar R., Stuehr D.J., Marletta M.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 6369–6373.
45. Stuehr D.J., Kwon N.S., Nathan C.F., Griffith O.W., Feldman P.L., Wiseman J. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 6259–6263.
46. Palmer R.M.J., Ashton D., Moncada S. // Nature. 1988. V. 333. P. 664–666.
47. Brunton T.L. // Lancet. 1867. V. 2. P. 97–98.
48. Murrell W. // Lancet. 1879. V. 1. P. 80.
49. Bauer J.A., Booth B.P., Fung H.L. // Adv. Pharmacol. 1995. V. 34. P. 361–381.
50. Gasco A., Fruttero R., Sorba G. // Farmaco. 1996. V. 51. P. 617–635.
51. Nedospasov A.A. // Nature. 1996. V. 382. P. 573.
52. Лк. 10: 21.

Biogenic Nitric Oxide: Ten Years of the Second Coming, the Prehistory of Discovery of the Arginine-dependent NO Biosynthesis

A. A. Nedospasov[#]

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,
pl. Akademika Kurchatova 46, D-182 Moscow, 123182 Russia*

This review has been written on the occasion of the decennial anniversary of the discovery of the arginine–oxygenase pathway for nitric oxide (NO) biosynthesis. This was one of the greatest and the most surprising discoveries in modern biochemistry and won the Nobel prize in 1998. The main steps of early studies are tracked. Many facts had pointed to the existence of biogenic NO long before 1987 but had been disregarded for reasons of psychology: it was hard to accept that NO is an assignable metabolite, since too many “inviolable” views had to be revised in this case.

Key words: arginine, citrulline, EDRF, glycerol trinitrate, guanylyl cyclase, nitrate, nitrite, nitric oxide (NO)

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 196-1852; fax +7 (095) 196-0221; e-mail: nedospas@img.ras.ru.