

КОНФЕРЕНЦИИ И СИМПОЗИУМЫ

**Научная сессия Отделения общей физики и астрономии
Российской академии наук**

(22 декабря 1999 г.)

22 декабря 1999 г. в Институте физических проблем им. П.Л. Капицы РАН состоялась научная сессия Отделения общей физики и астрономии Российской академии наук. На сессии были заслушаны доклады:

1. **Ванин А.Ф.** (Институт химической физики РАН, Москва). *Оксид азота и его обнаружение в биосистемах методом электронного парамагнитного резонанса.*

2. **Степанов Е.В., Миляев В.А.** (Институт общей физики РАН, Москва), **Селванов Ю.Г.** (Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва). *Лазерная ортомолекулярная медицинская диагностика.*

3. **Розанов Н.Н.** (Институт лазерной физики Государственного оптического института им. С.И. Вавилова, Санкт-Петербург). *Диссипативные оптические солитоны.*

Краткое изложение представленных докладов публикуется ниже.

PACS numbers: 87.64. - t, 87.64.Hd, 87.80. + s, 87.90. + y

**Оксид азота и его обнаружение
в биосистемах методом электронного
парамагнитного резонанса**

А.Ф. Ванин

В настоящее время биологи, биохимики, биофизики столкнулись с весьма неожиданным фактом. Оказалось, что в клетках и тканях животных и человека в качестве эндогенного регулятора метаболических и физиологических процессов наряду с достаточно большими молекулами, в том числе белками, может функционировать и простейшее соединение — двухатомная молекула оксида азота (NO). До этого представлялось очевидным, что высокоизбирательный характер процессов биорегуляции может быть достигнут только путем специфического взаимодействия молекул-регуляторов, или, как их сейчас называют, — сигнальных молекул — с соответствующими рецепторами на клеточной поверхности. Это избирательное взаимодействие, необходимое для передачи сигнала внутрь клетки, может обеспечиваться спецификой пространственной структуры сигнальной

молекулы, комплементарной молекулярной структуре рецептора, специфичным распределением электронной плотности на сигнальной молекуле, ее способностью изменять эти параметры при контакте с рецептором и т.п.

Оксид азота как сигнальная молекула оказывает влияние на внутриклеточные процессы без участия клеточных рецепторов. Этот агент способен диффундировать сквозь клеточную мембрану и взаимодействовать с мишенями непосредственно внутри клеток. Каким образом это простейшее соединение с жесткой пространственной и электронной структурой способно внутри клетки избирательно инициировать метаболические процессы? Этот вопрос только начинает изучаться. С общей точки зрения ясно, что избирательность действия NO может достигаться за счет высокого химического сродства этой молекулы к его мишени — активному центру фермента или его другой функциональной группы. Прочное связывание с ними NO может либо активировать, либо подавлять активность этого фермента и тем самым модулировать протекание соответствующих биохимических процессов. Что касается возможного неспецифического влияния NO как высокорекреационного агента на другие внутриклеточные системы, оно может устраняться быстрым окислением NO, например анионом супероксида, с образованием биологически малоактивных продуктов, — в основном, нитритов и нитратов.

Оксид азота функционирует как сигнальная молекула практически во всех органах и тканях животных и человека. Он непрерывно продуцируется в этих объектах ферментативным путем при участии ферментов, называемых NO-синтазами, использующих в качестве единственного субстрата аминокислоту — L-аргинин. Катализируемое NO-синтазами окисление кислородом аминокислоты в гуанидиновом остатке L-аргинина приводит к высвобождению из него молекулы NO в свободной форме с превращением L-аргинина в другую аминокислоту — L-цитруллин.

К настоящему времени наиболее изучена способность NO вызывать расслабление кровеносных сосудов, ослабляющее действие агентов, например адреналина, ответственных за сокращение сосудов. При недостаточной генерации NO в сосудах их тонус сдвинут в сторону сокращения, что приводит к явлениям спазма сосудов, слабой их проходимости, повышению кровяного давле-

ния и сопутствующим им другим патологиям. Эти явления могут быть сняты такими лекарственными средствами, как органические нитраты, с наиболее известным среди них — нитроглицерином. Оказалось, что его положительное действие, как и других органических нитратов, обусловлено способностью продуцировать в организме оксид азота и тем самым расслаблять сосуды, снимая их спазм. Эта способность стала известной только в последнее время, т.е. примерно через 150 лет с начала использования нитроглицерина как сердечно-сосудистого средства.

Спазмолитическое действие эндогенного оксида азота и продуцирующих его лекарств — результат цепи биохимических процессов, на конечной стадии которой происходит выброс ионов кальция из гладкомышечных клеток сосудов, что и вызывает их расслабление. NO запускает эти процессы, активируя важнейший внутриклеточный фермент — гуанилатциклазу. Высокое сродство NO к гемовой группе этого фермента обеспечивает прочное связывание NO с атомом железа в этой группе, приводящее к изменению конформации этого фермента и тем самым к его резкой активации. Продукт каталитической активности гуанилатциклазы — циклический гуанизинмонофосфат и запускает цепь биохимических процессов, вызывающих расслабление сосудов.

Синтез NO из L-аргинина непрерывно происходит в центральной и вегетативной нервной системах. В центральной нервной системе этот агент необходим, в частности, для формирования длительно функционирующих связей между нейронами, лежащих в основе памяти, обучения, наконец, творческой деятельности человека. Синтез NO в вегетативной нервной системе обеспечивает регулирующее действие этой системы на желудочно-кишечный тракт и мочеполовую систему. В качестве сигнальной молекулы NO функционирует в секреторных тканях и органах дыхания. Показана важная роль NO в жизнедеятельности кожной ткани.

Регуляторные функции оксид азота проявляет при стационарной концентрации в тканях порядка нескольких микромолей на один килограмм ткани. При его генерации в более высоком количестве (при стационарной концентрации до 100 мкМ кг^{-1}) оксид азота обнаруживает цитостатическую/цитотоксическую активности, благодаря чему он может выступать в качестве одного из эффекторов системы клеточного иммунитета — системы, обеспечивающей защиту организма от бактериального поражения и развития злокачественных опухолей.

Вместе с тем усиленная продукция NO, которая может иметь место не только в иммунокомпетентных клетках, но и в гладкой мускулатуре сосудов, миокарде, нервной ткани или тканях секреторных органов, может вызывать различные патологии. Так, например, усиленный синтез NO в сосудах может заканчиваться для организма эндосептическим шоком, при котором происходит резкое снижение периферического сопротивления кровеносных сосудов вследствие их значительного расслабления с быстрым необратимым снижением кровяного давления. Этот процесс инициируется биологически активными веществами, генерируемыми в организме бактериями, или продуцируемыми самим организмом при бактериальной инфекции. Другой пример — развитие мозгового инсульта при активации

синтеза NO в нейронах, вызванной ослаблением их снабжения кислородом и питательными веществами. NO, поступающий в большом количестве от этих нейронов к соседним нервным клеткам, вызывает их гибель из-за цитотоксического действия на них NO и продуктов его окисления. Оба типа патологий — эндосептический шок и инсульт мозга можно в значительной степени предотвратить, если вовремя ослабить синтез NO в клетках, используя специфические ингибиторы NO-синтаз.

Бурное развитие проблемы NO в биологии началось не более 10 лет назад. До этого большинство биологов рассматривали оксид азота как агент, "вредный" с биологической и экологической точек зрения. Существенный прорыв в этой позиции был сделан в работах американского физиолога и фармаколога Фериды Мьюррэда с сотрудниками. В 70-х годах они показали, что NO способен оказывать положительное биологическое действие — активировать один из важнейших регуляторных ферментов — гуанилатциклазу. О механизме этой активации сказано выше. Проведенные этой группой исследования и позволили понять причину гипотензивного, спазмолитического и противотромбозного действия различных нитрозо- и нитросоединений, в том числе нитроглицерина. В основе этого действия лежит их способность продуцировать NO. Интерес к биологической роли NO резко возрос после открытия в 80-м году американским физиологом Робертом Форчготтом так называемого фактора релаксации сосудов (ЭФР) — агента, выделяемого эндотелиальными клетками сосудов под влиянием гормонов и других биологически активных веществ. Оказалось, — и это впервые было показано Р. Форчготтом и другим американским физиологом и фармакологом Луисом Игнарро, — что активным компонентом ЭФР является оксид азота. Он и ответствен за расслабляющее действие ЭФР на сосуды.

В 1998 году Ф. Мьюррэду, Р. Форчготту и Л. Игнарро за эти исследования была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

Наряду с этими исследованиями существенный вклад в постановку проблемы NO внесли работы американских исследователей Д. Гиббса, М. Марлетты, Д. Стьюэра, обнаруживших в 80-е годы генерацию оксида азота активированными макрофагами, ответственного за их цитостатическое/цитотоксическое действие. Изучение роли NO в жизнедеятельности нервной ткани было начато в конце 80-х годов Д. Гэрсвэйтом (Великобритания), С. Снайдером, О. Бредтом (США). Наконец, российские исследователи (А. Ванин, А. Саприн) еще в 60-е годы обнаружили в организме животных и человека методом ЭПР парамагнитные нитрозильные комплексы негемового и гемового железа. Это открытие можно рассматривать как первое свидетельство образования и существования NO в живых системах.

Обнаружение NO в биообъектах было задержано из-за отсутствия надежных прямых методов его детекции в этих системах. Высокая реакционная способность NO, его практически "безбарьерное" взаимодействие с ионами супероксида определяют быструю гибель NO, в результате чего его стационарный уровень в живых системах поддерживается на сравнительно низком (микромолярном) уровне. Выход был найден в нашей лаборатории в 80-е годы: были предложены эффективные ловушки NO, способные накапливать его в орга-

низме животных и клеточных культур в течение 1–2 часов с последующей надежной регистрацией. Такими ловушками оказались комплексы двухвалентного железа с производными дитиокарбамата. Связываясь с ними, NO образует парамагнитные мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ), регистрируемые методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В зависимости от состава производных дитиокарбамата эти комплексы могли локализоваться либо в мембранной фазе клеток (гидрофобные МНКЖ), либо в водной фазе клеток (гидрофильные МНКЖ). В качестве гидрофобных МНКЖ наиболее широкоиспользуемыми стали МНКЖ с диэтилдитиокарбаматом (МНКЖ–ДЭТК), тогда как в качестве водорастворимых — МНКЖ с N-метил-D-глюкамин-дитиокарбаматом (МНКЖ–МГД). Неспаренный электрон, поставляемый в эти комплексы молекулой NO, переходит на атом железа, в результате на его d орбитали локализуется 7 электронов (электронная конфигурация d^7), тогда как NO переходит в состояние NO^+ . Неспаренный электрон локализуется, в основном, на d_z^2 орбитали железа. Общая формула этих комплексов — $Fe^+(NO^+)(S_2CNR_2)_2$.

В принципе, связывать NO могут и комплексы производных дитиокарбамата с трехвалентным железом. Образующиеся при этом МНКЖ диамагнитны, т.е. не могут регистрироваться методом ЭПР. Однако достаточно быстро, особенно в гидрофобных средах, эти диамагнитные МНКЖ переходят в парамагнитную форму. Происходит это по механизму восстановительного нитрозирования, суть которого состоит в одноэлектронном восстановлении оксидом азота Fe^{3+} до Fe^{2+} . Появляющийся ион NO^+ связывается с молекулами растворителя, тогда как координационное место этого иона в МНКЖ занимает другая нейтральная молекула NO.

Сигналы ЭПР МНКЖ–ДЭТК и МНКЖ–МГД идентичны по форме и параметрам. Они характеризуются примерно аксиально-симметричным тензором g-фактора со значениями $g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,02$ и разрешенной триплетной сверхтонкой структурой (СТС) при g_{\perp} . При комнатной температуре регистрации усреднение анизотропии g-фактора и СТС приводит к регистрации изотропного сигнала ЭПР с центром при $g = 2,04$ и изотропной триплетной СТС с расщеплением $12G$. Эта СТС возникает в результате взаимодействия неспаренной электронной плотности с ядром азота ^{14}N , характеризующимся спином $I = 1$. При замене ^{14}NO на ^{15}NO (ядерный спин ^{15}N равен $1/2$) СТС становится дублетной. Дополнительное дублетное расщепление в СТС сигнала ЭПР МНКЖ появляется и при замене ^{56}Fe ($I = 0$) на ^{57}Fe ($I = 1/2$).

Применение изотопа азота ^{15}N позволило, используя предложенные ловушки NO, идентифицировать источник этого агента в организме животных. Оказалось, что при введении в организм животных L-аргинина, меченого ^{15}N по аминогруппе гуанидинового остатка, образующиеся в тканях животных МНКЖ характеризовались дублетной СТС без примеси триплета, что однозначно свидетельствовало о генерации NO только из L-аргинина. Опыты с использованием изотопного кислорода ^{17}O , обнаружившие изменение СТС за счет СТ взаимодействия с ядром этого изотопа, показали, что кислород воздуха участвует в окислении аминогруппы гуанидинового остатка в L-аргinine до NO. Включение

^{57}Fe в МНКЖ–МГД позволило проследить превращение этого комплекса в организме мышей. Оказалось, что основная часть этих комплексов в течение часа практически полностью экстректируется в мочу. Что касается МНКЖ–ДЭТК, то они в силу своей гидрофобности сохраняются в тканях органов.

В настоящее время предложенный нами метод обнаружения и количественной оценки NO с использованием ЭПР спектроскопии нашел широкое применение в изучении этого агента в биосистемах во всем мире. Более того, он явился основой для разработки ЭПР томографического анализа NO в тканях животных в лабораториях США (Д. Звайер, Университет Д. Гопкинса, Балтимор) и Японии (Т. Йошимура, Институт технологического поддержания жизни, Ямагата).

Наряду с включением NO в экзогенные железо-содержащие ловушки он может образовывать в клетках и тканях парамагнитные динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), включающие в себя эндогенное железо и тиоловые (серосодержащие) группы белков и низкомолекулярных соединений. Этот тип комплексов был обнаружен нами сначала в дрожжевых клетках (1963 г.), а позже — в тканях животных (1967 г.). Исходной точкой в обнаружении данных комплексов явилась регистрация в этих объектах сигнала ЭПР, характеризующегося аксиально-симметричным тензором g-фактора со значениями $g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,014$, $g_{cp} = 2,03$ (сигнала 2,03). Природа центров, ответственных за этот сигнал, была идентифицирована после того, как удалось найти парамагнитное соединение, сигнал ЭПР которого по своим параметрам и форме оказался идентичным сигналу 2,03. Такой сигнал был зарегистрирован в замороженном растворе ДНКЖ с тиол-содержащей аминокислотой — цистеином. Последующий сравнительный физико-химический анализ этих комплексов и центров, характеризующихся сигналом 2,03, продемонстрировал идентичность природы этих соединений. Своеобразие ДНКЖ, образующихся в биообъектах, состоит в белковой природе их лигандов: железо в этих комплексах координируется с остатками цистеина, входящими в состав белков. Доля ДНКЖ с низкомолекулярными тиол-содержащими лигандами в живых системах, как правило, незначительна.

Анализ электронной и пространственной структуры обнаруженных ДНКЖ показал, что, как и в МНКЖ с производными дитиокарбамата, в этих низкоспиновых комплексах неспаренный электрон локализован, в основном, на d_z^2 орбитали атома железа. Геометрическая структура комплексов — октаэдр или квадрат с цис-расположением лигандов в плоскости квадрата. Железо находится в состоянии Fe^+ (электронная конфигурация d^7), а NO лиганды — в состоянии NO^+ .

Параллельно нашим исследованиям группой Б. Коммонера в США ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами были открыты и идентифицированы у крыс при развитии у них гепатомы, индуцированной различными гепатоканцерогенами (1965–1970 гг.). Комплексы возникали на начальной стадии опухолевого процесса при отсутствии заметных морфологических изменений в печени, а затем исчезали. Эти исследования были прерваны до 90-х годов и возобновились после обнаружения феномена образования NO в тканях и клетках животных по L-аргинин-зависимому пути (Д. Гиббс, Р. Бастиан, США). В настоящее время эндогенно продуцируемые ДНКЖ

обнаружены в разнообразных культурах клеток животных, продуцирующих оксид азота.

Вопрос о функциональной роли этих комплексов остается открытым. Есть основание полагать, что в организме животных и человека наряду с S-нитрозотиолами они могут действовать как депо и транспортная форма NO.

Синтезированные химическим путем эти комплексы при введении в организм животных (как доноры NO) оказывают различное физиологическое действие — ослабляют агрегацию тромбоцитов, снижают кровяное давление, вызывают расслабление сосудов, т.е. могут быть использованы как основа для создания нового класса сердечно-сосудистых лекарств. Интересным свойством этих комплексов является их способность индуцировать синтез стрессорных белков, так называемых белков теплового шока, защищающих организм от различных стрессорных воздействий.

Таким образом, в настоящее время создано новое биологическое направление — биология NO — новый материк в биологической науке. Его исследование даст и даст в будущем новые фундаментальные сведения, которые могут быть использованы в медицине. Это потребует усилий не только биологов, биохимиков, физиологов, биофизиков, но и химиков и физиков.

PACS numbers: 42.62.Bc, 87.80.+s, 87.90.+y

Лазерная ортомолекулярная медицинская диагностика

Е.В. Степанов, В.А. Миляев, Ю.Г. Селиванов

Одной из перспективных областей применения лазерной молекулярной спектроскопии высокого разрешения является высокочувствительный анализ газообмена биологических объектов. Применительно к человеку речь идет о детектировании микроконцентраций достаточно легких газообразных молекул, образующихся в организме в процессе его жизнедеятельности (так называемых эндогенных) и использовании получаемых данных для целей определения состояния здоровья и выявления заболеваний. Данный способ исследования организма в медицине принято называть ортомолекулярной диагностикой.

По ряду причин одним из наиболее привлекательных способов реализации ортомолекулярной диагностики является микроанализ состава выдыхаемого воздуха. За счет респираторного дыхания происходит наиболее интенсивный газообмен человека с окружающей средой. Благодаря большой площади диффузионной мембраны легких (более 100 м²), последние являются чрезвычайно эффективной системой газообмена, которая обеспечивает потребление кислорода из воздуха и выделение в окружающую среду конечных продуктов метаболизма. Помимо CO₂, основного метаболита, в выдыхаемом воздухе содержится около 600 других летучих соединений, образующихся в ходе многочисленных биохимических реакций и подлежащих выведению из организма. Механизмы и закономерности образования и транспорта некоторых из них обладают высокой специфичностью, и потому такие молекулярные соединения могут

быть использованы как естественные биомаркеры процессов, происходящих в организме. Кроме того, непрерывность и цикличность процесса дыхания позволяет проводить непрерывный и долговременный мониторинг исследуемых процессов в режиме близком к детектированию в реальном времени. Наконец, для медицинских применений в реальных клинических условиях важна неинвазивность данного диагностического подхода, т.е. возможность исследования без вторжения в организм.

Развитие методов ортомолекулярной диагностики непосредственно связано с применением современных физических методов обнаружения следов веществ как в жидкой, так и в газообразной среде. При исследовании микрогазообмена в процессе дыхания желательнее, чтобы применяемые методы анализа удовлетворяли ряду требований. Они должны обеспечивать возможность детектирования следовых концентраций эндогенных веществ в диапазоне 10⁻⁶–10⁻⁸ объемных процентов (об.%) при постоянной времени анализа 1–5 с, сравнимой со временем между последовательными выдохами. Предпочтительно прямое детектирование веществ в пробе выдыхаемого воздуха без его предварительного концентрирования или обогащения, которые могут стать источниками методических погрешностей и не позволяют реализовать режим непрерывного мониторинга. Метод должен обладать высокой селективностью и быть нечувствительным к содержанию в анализируемой пробе доминирующих атмосферных компонентов типа H₂O, O₂, N₂ и CO₂. Желательно, чтобы используемый физический подход был достаточно универсален и применим для детектирования различных молекулярных соединений.

Для высокочувствительного анализа газового состава выдыхаемого воздуха могут использоваться различные физические методы, среди которых можно выделить масс-спектрометрию, газовую хроматографию и оптические методы, включая спектральные. Применение каждого из них оптимально и целесообразно для решения определенного круга аналитических задач. Масс-спектрометрия и газовая хроматография используются, как правило, для анализа качественного состава выдыхаемого воздуха и позволяют детектировать и идентифицировать в выдохе следы летучих молекулярных соединений средней и высокой массы (50–300 а.е.м.). Однако скорость анализа невелика (от долей до десятков минут) и зачастую требуется обогащение пробы или предварительное концентрирование. Оптические же методы обладают высокими концентрационной чувствительностью, селективностью и быстродействием применительно к детектированию достаточно легких молекул. Среди оптических методов газоанализа лидируют лазерные методы, в частности, основанные на молекулярной спектроскопии высокого разрешения с применением перестраиваемых диодных (полупроводниковых) лазеров (ПДЛ).

Высокие аналитические характеристики ПДЛ вне зависимости от области их применения обусловлены целым рядом факторов. ПДЛ характеризуются широким спектральным диапазоном, перекрываемым за счет вариации химического состава полупроводниковых лазерных структур и простирающимся от ближнего УФ до дальнего ИК (0,3–40 мкм). За счет вариации ширины запрещенной зоны полупроводника и длины резонатора осуществляется плавная температурная перестройка