

МОНО- И БИЯДЕРНЫЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ В РАЗЛИЧНЫХ БИОСИСТЕМАХ

© 2015 г. А.Ф. Ванин, В.Д. Микоян, Л.Н. Кубрина, Р.Р. Бородулин, Е.Н. Бургова

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 11991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 29.04.15 г.

Показано, что динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, возникающие в сывороточном альбумине быка с высоким содержанием тиоловых групп, в пекарских дрожжах или в тканях животных, обработанных монооксидом азота соответственно экзогенного или эндогенного происхождения, представлены в подавляющей своей части ЭПР-неактивной биядерной формой. Эта форма может переходить в ЭПР-активную моноядерную форму при подщелачивании окружающей среды, в ЭПР-активную форму моноядерных нитрозильных комплексов железа при двухэлектронном восстановлении биядерной формы динитрозильных комплексов железа или при воздействии на них производных дитиокарбаматов, приводящем к образованию соответствующих ЭПР-активных моноснитрозильных комплексов железа с дитиокарбаматами. Значительное содержание биядерной формы динитрозильных комплексов железа в живых системах и идентичность биологического действия этих комплексов и системы эндогенного монооксида азота позволяют предполагать, что эндогенные биядерные динитрозильные комплексы железа представляют собой «рабочую форму» эндогенного монооксида азота как универсального регулятора биологических процессов.

Ключевые слова: монооксид азота, моно- и биядерные динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами.

В этом году исполняется 50 лет со времени публикации в журнале «Биофизика» статьи А.Ф. Ванина и Р.М. Налбандяна о регистрации в пекарских дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae* ненаблюдавшегося ранее в живых объектах сигнала ЭПР с $g_{\text{ср}} = 2,03$ (сигнал 2,03) [1], обусловленного, как было показано последующими исследованиями, моноядерными белок-связанными динитрозильными комплексами железа (М-ДНКЖ) с тиолсодержащими (RS^-) лигандами (формула – $[(RS^-)_2Fe(NO)_2]$) [2–4]. Через два года в журнале «Биофизика» была опубликована статья А.Ф. Ванина с соавторами, в которой было показано, что сигнал 2,03 можно зарегистрировать и в тканях животных [5].

Описание g -тензора сигнала 2,03 только двумя разными значениями – $g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,014$ (рис. 1а,в) – свидетельствует о сравнительно

высокой аксиальной симметрии М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [6–9]. Есть основание полагать, что такая симметрия определяется наличием в лигандной сфере М-ДНКЖ пары нитрозильных и пары тиоловых лигандов, взаимодействие которых в *цис*-положении с центральным атомом приводит к аксиальной симметрии распределения электронной плотности [6], что и определяет наличие лишь двух разных главных значений тензора g -фактора сигнала 2,03 [7–9]. Поскольку форма сигнала 2,03 не изменялась при повышении температуры его регистрации от 77 К до комнатной температуры, был сделан вывод о белковой природе М-ДНКЖ в биосистемах, т.е. о включении в эти комплексы тиолсодержащих остатков белков (рис. 1б,г). Что касается наличия низкомолекулярных аналогов этих комплексов в биосистемах, то при регистрации при комнатной температуре они обнаруживались бы по узкому симметричному сигналу с полушириной 0,7 мТл с центром при $g = 2,03$ [3,10]. Такого рода слабый сигнал присутствует в спектре ЭПР, приведенном на рис. 1б. В спектре, приведенном на рис. 1г, он отсутствует. Отсюда следует, что в биообъектах М-ДНКЖ с тиолсодержа-

Сокращения: М-ДНКЖ – моноядерные динитрозильные комплексы железа, NO – монооксид азота, Б-ДНКЖ – биядерные динитрозильные комплексы железа, МНКЖ – моноснитрозильные моноядерные комплексы железа, ДТТ – дитиотреитол, САБ – сывороточный альбумин быка, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат натрия, МГД – N-метил-D-глутамин-дитиокарбамат.

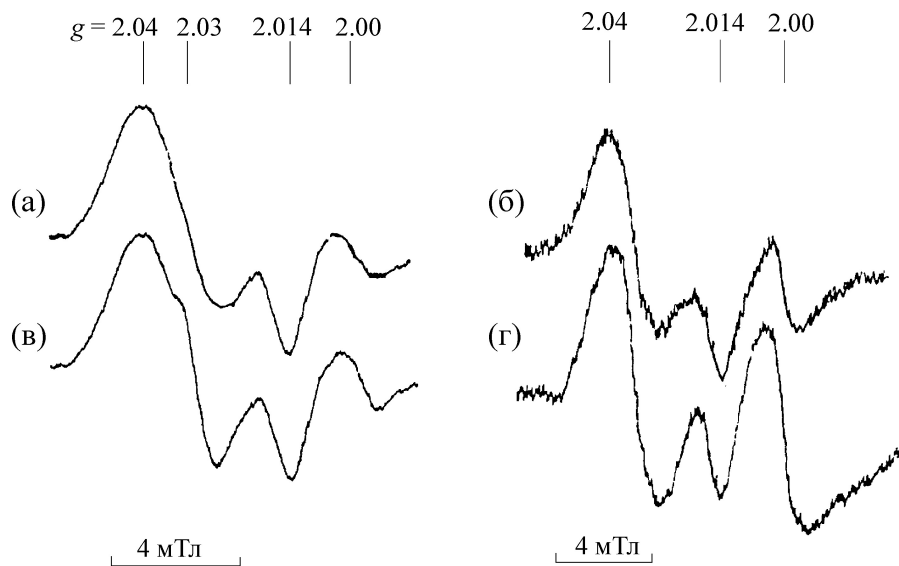


Рис. 1. Сигналы 2,03, зарегистрированные в дрожжах (а,в) и печени кролика (б,г) при 77 К (а,в) или при комнатной температуре (б,г). На фоне анизотропного широкого сигнала 2,03, обусловленного белок-связанным М-ДНКЖ (рис. 1б), наблюдается слабый узкий сигнал 2,03, обусловленный низкомолекулярными М-ДНКЖ [10].

щими лигандами представлены в подавляющей своей части белок-связанными комплексами.

Через три десятилетия после наблюдения сигнала 2,03 в дрожжах и тканях животных, когда было установлено, что в микроорганизмах и в организме животных может постоянно продуцироваться монооксид азота (NO), причем в качестве одного из универсальных регуляторов разнообразных метаболических процессов [11–14], стало ясно, что обнаружение методом ЭПР образования в биообъектах М-ДНКЖ явилось первым шагом в становлении нового раздела биологии – биологии монооксида азота. Было показано, что образование ЭПР-активного М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами происходит при участии эндогенно синтезируемого NO, связывание которого с негемовым железом при участии тиолов и приводит к появлению указанных комплексов [15–24].

Начавшиеся в 80–90-е годы прошлого столетия интенсивные исследования биологической роли NO показали, что эта простейшая молекула при микромолярной стационарной концентрации функционирует в организме всех представителей живого мира (бактерии, растения, животные, человек) в качестве одного из универсальных регуляторов разнообразных метаболических процессов. При более высокой стационарной концентрации – 100 мкМ и более – NO проявляет цитотоксические свойства, обеспечивающие его функционирование в организме животных и человека в качестве одного из основных эффекторов системы клеточного им-

мунитета, уничтожающего раковые клетки и чужеродные организму бактерии [14].

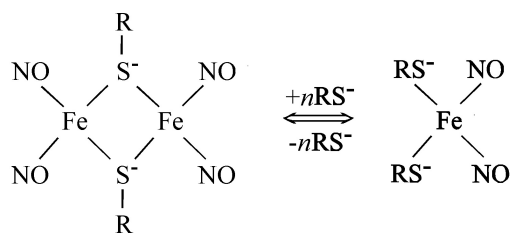
Вместе с тем было установлено, что молекулы NO неспособны в свободном состоянии эффективно достигать биологические мишени их действия, поскольку как свободнорадикальные агенты они быстро окисляются до пероксинитрита другими внутриклеточными свободнорадикальными агентами – ионами супероксида [14]. Защита NO от губительного действия супероксида может обеспечиваться его включением в эндогенные соединения, способные переносить молекулы NO в клетках и тканях на значительные расстояния с последующей передачей NO на соответствующие мишени его действия. В качестве таких переносчиков NO в клетках и тканях животных и человека и могут выступать упомянутые выше ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, а также S-нитрозотиолы (формула – RS–NO), возникающие в реакции окисленной формы NO – ионов нитрозония (NO⁺) с тиоловой серой [25].

Проведенная проверка биологического действия ДНКЖ с природными тиолсодержащими лигандами – глутатионом или цистеином – показала, что эти комплексы характеризуются тем же спектром биологической активности, что и монооксид азота [3,26]. Более того, в дозовом отношении они оказывают более эффективное биологическое действие, чем свободные молекулы NO, – факт, свидетельствующий о защитном действии ДНКЖ на включенные в них молекулы NO. Кроме того, оказалось, что ДНКЖ могут выступать не только в качестве

доноров NO, но и ионов нитрозония [3,27,28]. Все это делает весьма вероятным функционирование эндогенных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в качестве одной из форм NO, обеспечивающей его функционирование как одного из универсальных регуляторов метаболических процессов в живых системах.

В связи с этим встает вопрос, какая часть продуцируемого в клетках и тканях NO может включаться в эти комплексы. Проведенная в работе [29] оценка концентрации ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, а именно их моноядерной формы, возникающей в культурах клеток животного происхождения при участии как экзогенного, так и эндогенного NO (по интенсивности характерного для М-ДНКЖ сигнала 2,03), показала, что эта концентрация не менее чем на порядок превосходит уровень другой эндогенной формы NO – внутриклеточных RS-NO, достигая значения 900 пикомолей М-ДНКЖ/мг белка, т.е. примерно 130 наномолей М-ДНКЖ/г влажных клеток. Если же учесть, что в М-ДНКЖ представлены по две молекулы NO, то это различие становится существенно большим. Таким образом, если NO и функционирует в клетках и тканях в связанном состоянии, то преимущественно в форме М-ДНКЖ, а не RS-NO.

Следует отметить, что в последние годы было показано, что при распаде активных центров железосерных белков под действием NO возникающие при этом ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами представлены в основном не в форме парамагнитных М-ДНКЖ, а в форме диамагнитных биядерных ДНКЖ (Б-ДНКЖ), представляющих собой тиоэферы соответствующих тиолов и красной соли Руссена (формула последней $[(S)_2Fe_2(NO)_4]$, где S – неорганический сульфид, формула соответствующего тиоэфира $[(RS)_2Fe_2(NO)_4]$, где RS^- – тиолсодержащее соединение) [30–36]. Б-ДНКЖ находятся в химическом равновесии с М-ДНКЖ, определяемом наличием ионизованных по тиоловой сере тиолов (nRS^-): при их избытке в этой системе ДНКЖ представлены в основном М-ДНКЖ, при их недостатке – Б-ДНКЖ (схема) [4]:



В связи с этим не исключено, что в различных биосистемах (и не только в железосер-

ных белках) кроме М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут возникать их биядерные аналоги. Их учет может существенно повысить содержание ДНКЖ в биообъектах, что может быть важным аргументом в пользу нашего предположения о том, что эти комплексы могут в значительной степени обеспечивать функционирование NO в качестве универсального регулятора биологических процессов.

Цель настоящего исследования состояла в проверке возможности образования такого рода ЭПР-неактивных форм ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в микроорганизмах и тканях животных. Для обнаружения этих комплексов и оценки их содержания в биообъектах была использована способность Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами переходить в ЭПР-активные М-ДНКЖ при повышении pH среды (схема), а также превращаться в ЭПР-активные моноядерные нитрозильные комплексы железа при двухэлектронном восстановлении [37,38] или при воздействии на них производных дитиокарбаматов, приводящем к образованию ЭПР-детектируемых моонитрозильных моноядерных комплексов железа (МНКЖ) с производными дитиокарбаматов [39–42].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. При синтезе препаратов ДНКЖ с глутатионом использовали серноокисное железо ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион и нитрит (Sigma, США). Дитиотреитол (ДТТ), дитионит натрия, NH_4-N -метил-D-глюкаминдитиокарбамат, Na-диэтилдитиокарбамат (ДЭТК) и бактериальный липополисахарид (*Escherichia coli*, Serotype 055:85) также были приобретены у фирмы Sigma, США, сывороточный альбумин быка (САБ) – у фирмы Acros, США. Газообразный NO получали в реакции серноокислого железа с нитритом натрия в 0,1 М растворе HCl с последующей очисткой NO методом низкотемпературной сублимации в вакуумированной стеклянной установке [4].

Синтез Б-ДНКЖ с глутатионом. Синтез проводили по методике, описанной в работе [43]. Суть его состояла в получении сначала S-нитрозоглутатиона (синтезируемого в реакции нитрита и глутатиона, протекавшей в водном растворе, содержащем двухвалентное железо, при pH 3,8) с последующим повышением pH раствора до нейтральных значений. В результате в реакции S-нитрозоглутатиона, Fe^{2+} и глутатиона возникал Б-ДНКЖ с глутатионом с небольшой примесью (несколько процентов) М-ДНКЖ с тем же лигандом.

Эксперименты с водным раствором альбумина. Эксперименты проводили в 1 мМ растворе альбумина в 15 мМ HEPES-буфере при исходном значении pH 7,4. Для восстановления дисульфидных сшивок в альбумине его инкубировали в течение 2–3 ч при комнатной температуре с 50 мМ ДТТ в присутствии в качестве денатуранта 1 М мочевины. Затем раствор пропускали через колонку с сефадексом G-25. Концентрацию белка в получаемых элюатах оценивали по интенсивности полосы поглощения альбумина на 280 нм ($\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). В последующих экспериментах использовали полученную таким образом фракцию альбумина, обработанного ДТТ (САБ-ДТТ), с концентрацией белка, равной 0,3 мМ. Образование ДНКЖ в этой фракции происходило при ее обработке газообразным NO под давлением 100–150 мм рт. ст. в присутствии ионов Fe^{2+} в аппарате Тунберга, как описано в работе [4].

Эксперименты на дрожжах и на животных. Эксперименты по изучению образования М- и Б-ДНКЖ в дрожжевых клетках проводили на суспензии коммерческих пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (1 г влажных дрожжей в 5 мл 15 мМ HEPES-буфера, pH 7,4). Для получения в них ДНКЖ суспензию обрабатывали в течение 30 мин газообразным NO под давлением 100–150 мм рт. ст. с последующей регистрацией в этой суспензии сигнала 2,03 при 77 К (в замороженном препарате) или при комнатной температуре. После процедуры однократного замораживания дрожжей в жидком азоте и последующего размораживания препарата он подвергался следующим воздействиям – повышению pH до 11–12, обработке дитионитом натрия (2 мг) или обработке диэтилдитиокарбаматом натрия (20 мг на г дрожжей) в течение 30 мин. Затем эти препараты замораживали в жидком азоте для ЭПР-измерений.

В экспериментах на животных использовали белых беспородных мышей самцов весом 15–18 г, воспалительное состояние у которых, а тем самым усиленный синтез NO с участием индуцибельной NO-синтазы [14], инициировали внутрибрюшинным введением указанного выше бактериального липополисахарида в дозе 1 мг/кг. Через 4 ч после этого животным на полчаса внутрибрюшинно вводили: ДЭТК (500 мг/кг) и цитратный комплекс Fe^{2+} (50 мг/кг сернокислого железа + 250 мг/кг цитрата натрия) (животные 1-й группы), только железоцитрат (животные 2-й группы), только ДЭТК (животные 3-й группы); животные 4-й группы, которым ничего не вводилось, служили контролем. После забоя животных этих групп на препаратах их печени проводили ЭПР-измере-

ния. Кроме того, печень, взятую у животных 2-й и 4-й групп, перфузировали раствором ДЭТК (10 мл 200 мМ раствора ДЭТК в 15 мМ HEPES-буфере, pH 7,4) с тем, чтобы трансформировать в МНКЖ-ДЭТК комплексы М- и Б-ДНКЖ, которые могли образоваться в печени этих животных при участии эндогенно продуцируемого NO. После этого препараты печени замораживали в жидком азоте для ЭПР-измерений. В другой серии экспериментов одним животным вводили на 30 мин только ДЭТК без предварительного введения липополисахарида, а у других (контрольных) животных брали печень и перфузировали ее раствором ДЭТК. Опыты с перфузией печени мышей раствором ДЭТК проводили и на животных, которым на полчаса внутрибрюшинно вводили 0,5 мл 5 мМ раствора Б-ДНКЖ.

ЭПР и оптические измерения. ЭПР-измерения растворов альбумина, дрожжевой суспензии и тканей мышей проводили на модифицированном ЭПР-спектрометре X-диапазона Радио-Пан (Польша) при 77 К. Концентрацию парамагнитных центров по их сигналу ЭПР оценивали методом двойного интегрирования этих сигналов с использованием в качестве эталонного образца раствора М-ДНКЖ с глутатионом при соотношении свободного глутатиона и М-ДНКЖ, равном 100:1, и pH раствора 11–12.

Оптические измерения проводили на спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu Europa GmbH, Германия), используя плоские кварцевые кюветы с длиной оптического пути 2 мм.

Статистическая обработка данных. Данные представляли в виде средних величин \pm среднее отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Образование Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в сывороточном альбумине быка, обработанном дитиотреитолом. В соответствии с ранее опубликованными данными [7], обработка водного раствора коммерческого препарата альбумина при pH 7,4 смесью Fe^{2+} + NO приводила к образованию в этом препарате белок-связанных М-ДНКЖ в количестве менее одного комплекса на молекулу белка (не более 20% от мольного количества альбумина). ЭПР-сигнал от этих комплексов также характеризовался величиной g_{cp} , равной 2,03, однако по форме отличался от ранее выявленного сигнала 2,03 и описывался не двумя ($g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,014$), а тремя разными величинами g -фактора – $g_1 = 2,05$, $g_2 = 2,03$, $g_3 = 2,014$ (рис. 2а). Последнее соответствовало более низкой (ромбической) симметрии М-ДНКЖ, связанных с

альбумином, по сравнению с симметрией комплексов (аксиальной), ответственных в биообъектах за сигнал 2,03 (в связи с этим назовем последний «классическим» сигналом 2,03). Как показано в работе [7], это снижение симметрии М-ДНКЖ было обусловлено наличием в исходном препарате альбумина не более одной тиоловой группы на одну молекулу. Эта группа (в составе цистеинового остатка альбумина) включается в М-ДНКЖ, тогда как в качестве второго анионного лиганда включается не тиолсодержащий аминокислотный остаток этого белка, по-видимому гистидин) [7].

Обработка альбумина дитиотреитолом при рН 7,4 при молярном соотношении САБ : ДТТ = 1 : 50 приводила к значительному (в пересчете на одну молекулу белка) повышению интенсивности сигнала ЭПР, регистрируемого в этом препарате после его обработки при рН 7,4 смесью 1 мМ Fe²⁺ + NO. При этом форма сигнала становилась идентичной форме «классического» сигнала 2,03 (рис. 2б). Оба изменения (усиление сигнала ЭПР и его трансформация) были, очевидно, обусловлены повышением в САБ-ДТТ количества тиоловых групп (в результате восстановления дисульфидных групп в этом белке под действием ДТТ). В итоге гистидиновый остаток в исходном М-ДНКЖ замещался на белковый тиолсодержащий лиганд, и в М-ДНКЖ попарно включались как нитрозильные, так и тиолсодержащие лиганды.

Кроме М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, в препарате САБ-ДТТ возникали и связанные с белком Б-ДНКЖ. Их появление в препарате обнаруживалось по резкому повышению содержания М-ДНКЖ (8–10-кратному усилению сигнала 2,03 этих комплексов) при повышении рН раствора альбумина с 7,4 до 10,5–11,0, обусловленному, в соответствии со схемой, увеличением содержания в белке ионизованных по сере тиоловых групп.

О появлении Б-ДНКЖ в САБ-ДТТ свидетельствовал и спектр оптического поглощения этого препарата (рис. 2, верхняя панель, линия 1) с характерной для Б-ДНКЖ полосой поглощения на 360 нм [37,38]. Используя значение коэффициента экстинкции (ϵ) для полосы поглощения Б-ДНКЖ с глутатионом на 360 нм ($\epsilon = 3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в пересчете на одну молекулу Fe(NO)₂ в комплексе) [4], можно было по спектру поглощения белок-связанного Б-ДНКЖ оценить его концентрацию. Она оказалась равной двум молекулам Б-ДНКЖ в пересчете на одну молекулу белка.

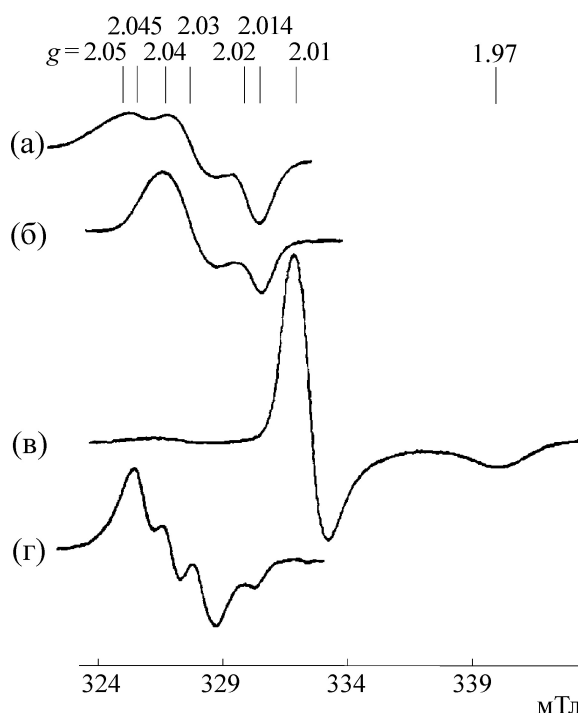
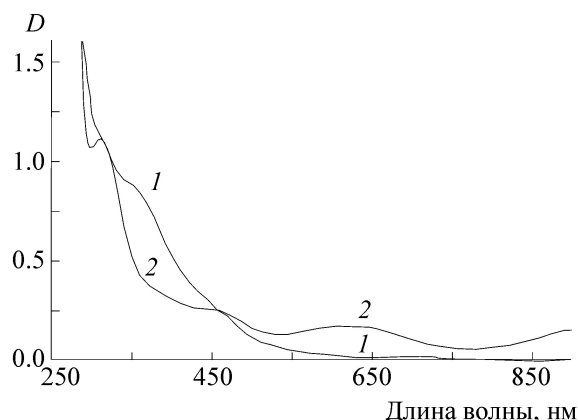


Рис. 2. Спектры поглощения и спектры ЭПР, зарегистрированные в препаратах альбумина. Кривая 1 (верхняя панель) – спектр оптического поглощения Б-ДНКЖ, связанного с САБ-ДТТ, кривая 2 – спектр поглощения предыдущего препарата после обработки его дитионитом. Последний ответствен за полосу поглощения на 313 нм. На нижней панели приведены спектры ЭПР М-ДНКЖ, появляющихся при обработке 0,3 мМ раствора САБ-ДТТ при рН 7,4 смесью Fe²⁺ + NO (б) с последующей обработкой того же раствора дитионитом (в) или N-метил-D-глутамин-дителиокарбаматом. Спектр (а) зарегистрирован в растворе альбумина, не обработанного ДТТ, после контакта этого раствора со смесью Fe²⁺ + NO. Спектры ЭПР зарегистрированы при 77 К при различных значениях усиления радиоспектрометра.

Обработка дитионитом препарата альбумина, содержащего связанные с ним Б-ДНКЖ, приводила к появлению полосы поглощения на

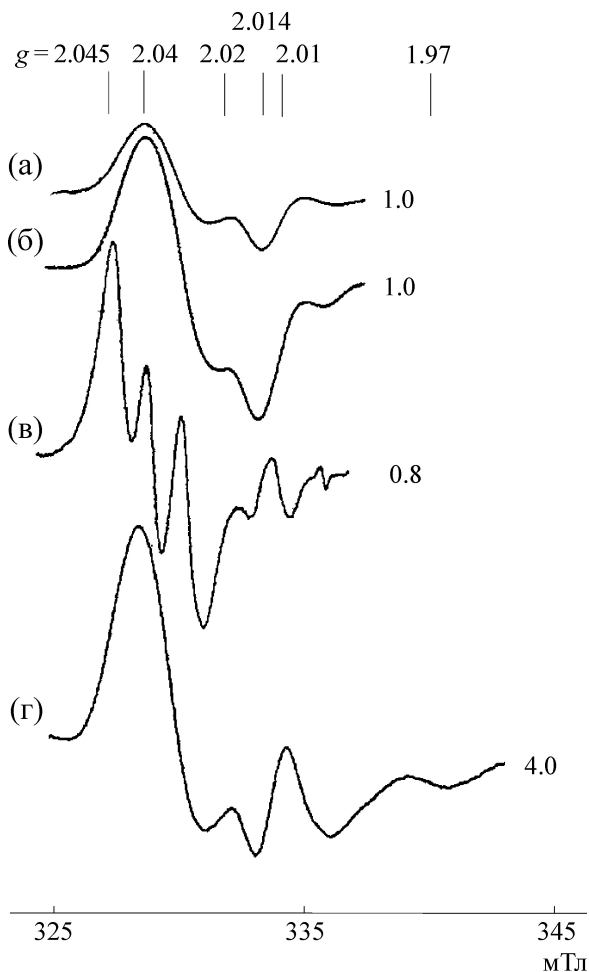


Рис. 3. Спектры ЭПР суспензии дрожжей в 15 мМ НЕРЕС-буфере (рН 7,4) после обработки газообразным NO (а) с последующими повышением рН суспензии до 12 (б), обработкой диэтилдитиокарбаматом (в) или дитионитом натрия (г). Запись при 77 К, справа указано усиление ЭПР-спектра в отн. ед.

640 нм (рис. 2, верхняя панель, кривая 2), совпадающей по своим параметрам с полосой поглощения, характерной для низкомолекулярных Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами после их двухэлектронного восстановления [37,38]. В соответствии с данными, приводимыми в работах [37,38] для низкомолекулярных Б-ДНКЖ, восстановленный дитионитом белок-связанный Б-ДНКЖ давал сигнал ЭПР со значениями g -фактора, равными $g_{\perp} = 2,01$, $g_{\parallel} = 1,97$ (рис. 2в). Что касается сигнала 2,03, он, как правило, в присутствии дитионита резко снижался, очевидно, в результате восстановления М-ДНКЖ дитионитом [37,38]. При встряхивании на воздухе под действием кислорода как окислителя сигнал ЭПР с $g_{\perp} = 2,01$, $g_{\parallel} = 1,97$ исчезал,

тогда как сигнал 2,03 восстанавливался до исходного уровня.

После обработки препарата САБ-ДТТ со спектром поглощения, приведенным на рис. 2, кривая 1, водорастворимым производным дитиокарбамата – N-метил-D-глутамин-дитиокарбаматом (МГД), в препарате возникал моноядерный мононитрозильный комплекс железа с МГД (МНКЖ-МГД, формула NO-Fe-(МГД)_2), характеризующийся при 77 К сигналом ЭПР, приведенным на рис. 2г со значениями g -фактора $g_{\perp} = 2,045$, $g_{\parallel} = 2,02$ и триплетной сверхтонкой структурой при g_{\perp} , обусловленный взаимодействием неспаренного электрона с ядром азота нитрозильного лиганда [39,40]. Образование МНКЖ-МГД было обусловлено переносом Fe-NO-группы из белок-связанных М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ на две молекулы МГД. Судя по результатам двойного интегрирования сигнала ЭПР образующихся МНКЖ-МГД, в эти комплексы включалось железо, в 10 раз превышающее его количество в М-ДНКЖ, образующихся в альбумине при его обработке смесью $\text{Fe}^{2+} + \text{NO}$ при рН 7,4. Этот результат еще раз свидетельствует о том, что количество Б-ДНКЖ в альбумине (в пересчете на один Fe(NO)_2 -фрагмент) на порядок превосходило уровень М-ДНКЖ в этом препарате, т.е. в нем ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (остатками цистеина) в основном были представлены в форме Б-ДНКЖ.

Таким образом, эксперименты на растворах альбумина, обработанного ДТТ, показали, что при нейтральных значениях рН образующиеся в нем в присутствии железа и NO динитрозильные комплексы, преимущественно, были представлены их биядерной формой. Последняя обнаруживалась как по спектрам оптического поглощения, так и после ее перехода в парамагнитные формы – при повышении рН среды, добавлении дитионита или МГД.

В препаратах альбумина, не обработанных ДТТ и содержащих незначительное количество тиоловых групп (менее одной на молекулу белка), образование Б-ДНКЖ не обнаружено.

М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в дрожжевых клетках. Обработка газообразным NO пекарских дрожжей, суспендированных в 15 мМ НЕРЕС-буфере при рН 7,4, приводила к образованию в дрожжах белок-связанных М-ДНКЖ, характеризующихся сигналом 2,03 (рис. 3а). О белковой природе этих комплексов свидетельствовало сохранение формы их сигнала ЭПР при повышении температуры его регистрации от 77 К до комнатной температуры (данные не приводятся). Оценка концентрации М-ДНКЖ, ответственных за сиг-

нал, приведенный на рис. 3а, дала величину 12 микромолей на 1 кг влажных дрожжей. Вклада низкомолекулярных М-ДНКЖ в этот сигнал (узкого сигнала ЭПР с полушириной 0,7 мТл при записи сигнала ЭПР дрожжей при комнатной температуре) не обнаруживалось (данные не приводятся).

Интенсивность сигнала 2,03 в дрожжевых клетках повышалась в среднем в 2,5 раза после повышения рН дрожжевой суспензии до 12–13 (рис. 3б), при этом дополнительно образующиеся ДНКЖ также имели белковую природу. Как и в вышеупомянутых опытах с альбумином, это повышение, очевидно, было обусловлено увеличением количества ионизованных по сере тиоловых групп белков дрожжей, приводившем в соответствии со схемой к превращению возникших в дрожжах Б-ДНКЖ в парамагнитные М-ДНКЖ (рис. 3). Таким образом, исходя из 2,5-кратного повышения уровня последних (до 30 микромолей на 1 кг влажных дрожжей), в дрожжевых клетках, обработанных NO при нейтральных значениях рН, наряду с М-ДНКЖ возникали и Б-ДНКЖ в количестве $(30 - 12)/2 = 9$ микромолей на 1 кг влажных дрожжей (при этой оценке учитывалось наличие двух групп $\text{Fe}(\text{NO})_2$ в составе Б-ДНКЖ и одной такой группы в составе М-ДНКЖ). Таким образом, молярное соотношение Б-ДНКЖ к М-ДНКЖ при такой оценке содержания последних оказалось равным 0,75 : 1,0.

Более высокое содержание Б-ДНКЖ в дрожжах было получено в опытах по воздействию на дрожжи 100 мМ диэтилдитиокарбамата в 15 мМ НЕРЕС-буфере при рН 7,4. Как было показано ранее, это производное дитиокарбамата образует с Fe-NO -группами, извлекаемыми М- и Б-ДНКЖ, гидрофобные МНКЖ-ДЭТК, локализующиеся в клеточных мембранах [39–42]. Сигнал ЭПР этих комплексов, зарегистрированный в дрожжах при 77 К, был идентичным сигналу ЭПР водорастворимых МНКЖ-МГД (рис. 3в) и соответствовал концентрации МНКЖ-ДЭТК, равной 100 микромолей на 1 кг влажных дрожжей. Если учесть наличие двух групп $\text{Fe}(\text{NO})_2$ в составе Б-ДНКЖ и одной такой группы в составе М-ДНКЖ, каждый из этих комплексов мог обеспечить образование соответственно двух и одного комплекса МНКЖ с ДЭТК. Это означает, что при наличии в дрожжах 12 микромолей М-ДНКЖ содержание Б-ДНКЖ, обеспечивших образование остальной части МНКЖ-ДЭТК, составило $(100 - 12)/2 = 44$ микромоля Б-ДНКЖ на 1 кг влажных дрожжей. Полученное таким образом соотношение содержания Б- и М-ДНКЖ должно составлять 3,5 : 1,0, что существенно больше

аналогичной величины, полученной при подщелачивании дрожжевой суспензии. Очевидно, это повышение было обусловлено более эффективным проникновением ДЭТК внутрь дрожжевых клеток по сравнению с ионами гидроксила, способными подщелачивать внутриклеточную среду в дрожжах.

Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, появляющиеся в дрожжах, обработанных NO, обнаруживались и при действии на них дитионита, способного восстанавливать эти комплексы. Сигнал ЭПР восстановленных Б-ДНКЖ в дрожжах ($g_{\perp} = 2,01$, $g_{\parallel} = 1,97$), приведенный на рис. 3г, можно было оценить по его компоненте при $g_{\parallel} = 1,97$, рассчитав по ней амплитуду компоненты при g_{\perp} (последняя, как следует из рис. 3г, снижена из-за наложения на нее компоненты при g_{\parallel} сигнала 2,03). Сопоставление величин двойного интеграла для сигнала 2,03 в дрожжах, обработанных дитионитом, и сигнала с $g_{\perp} = 2,01$, $g_{\parallel} = 1,97$, приведенных на рис. 3г, показало, что количество парамагнитных центров, ответственных за последний, в два раза ниже, чем М-ДНКЖ, ответственных за сигнал 2,03, т.е. составляет 6 наномолей на 1 г дрожжей. Поскольку добавление дитионита практически не приводило к изменению интенсивности сигнала 2,03, появление в этом препарате сигнала ЭПР с $g_{\perp} = 2,01$, $g_{\parallel} = 1,97$, очевидно, было обусловлено восстановлением в дрожжах небольшой части Б-ДНКЖ. Отношение их содержания к содержанию М-ДНКЖ составило в этом случае 0,25:1,0.

Таким образом, данное исследование показало, что в дрожжах, обработанных NO, наибольшая часть образующихся ДНКЖ, обнаруживаемых в наибольшем количестве при их взаимодействии с ДЭТК, представлена их диамагнитной (ЭПР-недектируемой) биядерной формой – ее в 3,5 раза больше, чем М-ДНКЖ, а содержание включенного в них NO в семь раз выше, чем во фракции М-ДНКЖ.

М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, появляющиеся в печени мышей после введения им Б-ДНКЖ с глутатионом. Образование ДНКЖ в печени мышей инициировали внутрибрюшинным введением им 0,5 мл 5 мМ раствора Б-ДНКЖ с глутатионом. Через 30 мин после забоя животных проводили перфузию печени по воротной вене 10 мл 15 мМ раствора НЕРЕС с рН 7,4 и 14, а также 10 мл 200 мМ раствора ДЭТК-Na в 15 мМ раствора НЕРЕС с рН 7,4 с последующим выдерживанием обработанных таким образом препаратов печени при комнатной температуре в течение 30 мин. Результаты последующей регистрации при 77 К

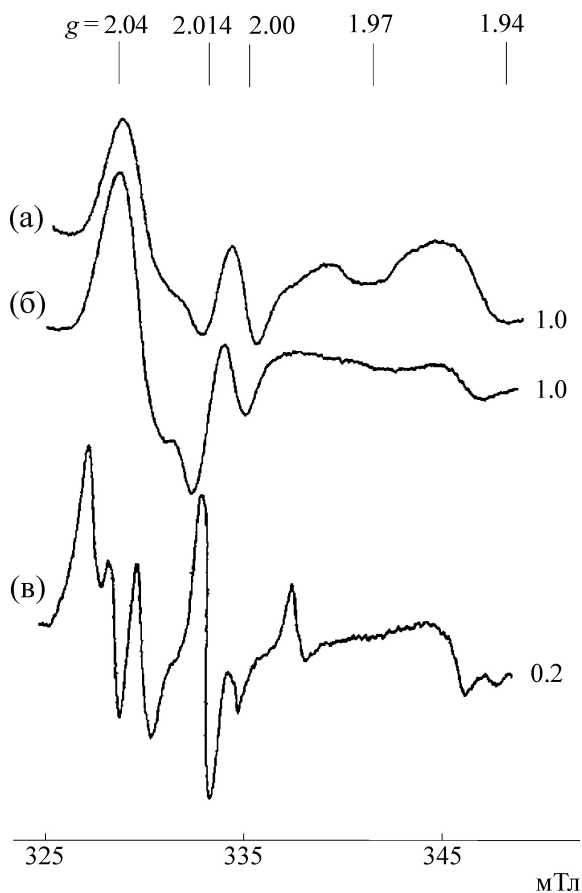


Рис. 4. Спектры ЭПР печени мышей после внутривенного введения им на 30 мин раствора Б-ДНКЖ с глутатионом с последующей перфузией этого органа 15 мМ раствором НЕРЕС-буфера при рН 7,4 (а), рН 13 (б) или содержащем 200 мМ диэтилдитиокарбамата натрия (в). Запись спектров при 77 К. Сигналы ЭПР со значениями g -фактора, равными 2,04 и 2,014, 2,0, 1,97 и 1,94 обусловлены соответственно белок-связанными М-ДНКЖ, свободными радикалами, комплексами молибдена и восстановленными железосерными белками. Сигнал с триплетной сверхтонкой структурой при $g = 2,04$ комплексами МНКЖ-ДЭТК. Три дополнительные компоненты в диапазоне 238–347 мТл в спектре (в) – часть компонент сверхтонкой структуры комплексов ДЭТК с эндогенной медью – ионами Cu^{2+} (см. также рис. 5д) [40,41].

спектров ЭПР этих препаратов приведены на рис. 4а–в соответственно. В препаратах, перфузированных *in vitro* НЕРЕС-буфером с рН 7,4, количество М-ДНКЖ составляло 6 микромолей на 1 кг влажной ткани. При повышении рН НЕРЕС-буфера до 14 оно повышалось в 1,5 раза (до 9 микромолей на 1 кг влажной ткани). Если же печень перфузировали *in vitro* раствором ДЭТК (рН 7,4), то количество образующихся при этом МНКЖ-ДЭТК достигало 54 микромолей на 1 кг влажной ткани, что существенно превышало уровень М-ДНКЖ

(6 микромолей/кг влажной ткани). Очевидно, что основной вклад в образование МНКЖ-ДЭТК должны вносить Б-ДНКЖ, содержание которых должно было составлять $(54-6)/2 = 24$ микромоля на 1 кг печени. Таким образом, соотношение Б-ДНКЖ к М-ДНКЖ в этих опытах составило 6:1.

Столь значительное преобладание Б-ДНКЖ над М-ДНКЖ могло быть обусловлено тем, что животным исходно вводили Б-ДНКЖ с глутатионом, так что именно эти низкомолекулярные комплексы могли вносить основной вклад в образование МНКЖ-ДЭТК. Для того, чтобы убедиться, что в печени животных, как и в дрожжах, действительно могут появляться ДНКЖ эндогенного происхождения с преобладанием их биядерной формы, необходимо было обеспечить появление в организме животных значительного количества NO, способного инициировать образование ДНКЖ из внутриклеточных компонентов этих комплексов – железа и тиолсодержащих лигандов. Решение этой проблемы описывается в следующем разделе.

Образование Б-ДНКЖ в печени мышей, обработанных бактериальным липополисахаридом. Известно, что усиленная продукция NO в организме животных может реализоваться при участии индуцибельной изоформы NO синтазы (iNOS). Последняя появляется в тканях животных при введении в их организм одного из провоспалительных агентов – бактериального липополисахарида [14].

Ранее нашей группой было предложено использовать в качестве детектора NO у этих животных спиновую ловушку этого агента – комплексы ДЭТК с двухвалентным железом, эффективно связывающие NO с образованием в течение 30 мин ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК [39,40]. Выше мы уже упоминали об этих комплексах, возникающих из М- и Б-ДНКЖ в дрожжах и печени при разрушающем действии на них ДЭТК, что было использовано нами при обнаружении в этих биообъектах *in vitro* ЭПР-недетектируемых Б-ДНКЖ. В связи с этим мы попытались применить тот же подход для обнаружения Б-ДНКЖ, которые могли бы образоваться в печени мышей *in vivo* при введении им липополисахарида. Интересно было сопоставить их количество с количеством МНКЖ-ДЭТК, синтезируемых в печени этих животных *in vivo*, т.е. образующихся в течение 30 мин при участии эндогенного NO, ДЭТК и двухвалентного железа, эндогенного или вводимого в организм животных.

Любопытно, что в многочисленных опытах на мышках, обработанных липополисахаридом, т.е в условиях, обеспечивающих интенсивный

Концентрация МНКЖ-ДЭТК, возникавших в печени мышей в указанных условиях проведения опытов

Условия проведения опытов	Концентрация образующихся МНКЖ-ДЭТК (в микромолях на 1 кг влажной печени, по 4-м результатам ЭПР-измерений)
Через 4 ч после внутрибрюшинного введения мышам липополисахарида на 30 мин введены Fe^{2+} + ДЭТК	90 ± 30
Через 4 ч после внутрибрюшинного введения мышам липополисахарида на 30 мин введен только ДЭТК	$18,0 \pm 7,0$
Через 4 ч после внутрибрюшинного введения мышам липополисахарида на 30 мин введен Fe^{2+} , после чего печень <i>in vitro</i> перфузирована раствором ДЭТК с последующим выдерживанием органа на воздухе в течение 30 мин	$18,0 \pm 4,0$
Через 4 ч после внутрибрюшинного введения мышам липополисахарида печень животных <i>in vitro</i> перфузирована раствором ДЭТК с последующим выдерживанием органа на воздухе в течение 30 мин	$8,0 \pm 3,0$
Через 30 мин после внутрибрюшинного введения мышам ДЭТК печень животных <i>in vitro</i> перфузирована раствором ДЭТК с последующим выдерживанием органа на воздухе в течение 30 мин	4 ± 1
Печень животных <i>in vitro</i> перфузирована раствором ДЭТК с последующим выдерживанием органа на воздухе в течение 30 мин	$4,0 \pm 2,0$

синтез NO в печени и других органах, нам не удалось обнаружить в них образования М-ДНКЖ [41,42]. В связи с этим нам представлялось весьма интригующим проверить, а не возникает ли у этих животных в основном только биядерная форма ДНКЖ? Проведенные опыты подтвердили это предположение.

Были проведены опыты, описание и результаты которых приведены в таблице. Дозы вводимого мышам ДЭТК и цитратного комплекса Fe^{2+} указаны выше в методической части. Соответствующие сигналы ЭПР с триплетной сверхтонкой структурой при $g = 2,035$ и $2,02$, обусловленные МНКЖ-ДЭТК, образующимися в печени экспериментальных животных, приведены на рис. 5. По интенсивности этих сигналов была оценена концентрация МНКЖ-ДЭТК.

Как следует из результатов, приведенных в таблице, введение экспериментальным животным липополисахарида приводило через 4 ч к появлению в их печени значительного количества NO, включавшегося *in vivo* МНКЖ-ДЭТК. Как было показано нами ранее, к этому времени в печени устанавливался стационарный уровень NO, так что в последующие 30 мин концентрация образующихся в печени МНКЖ-ДЭТК достигала 90 или 18 микромолей на 1 кг влажной ткани в присутствии соответственно ДЭТК и экзогенного железа или ДЭТК и эндогенного железа. Снижение уровня МНКЖ-ДЭТК во вто-

рой серии опытов могло быть обусловлено, во-первых, тривиальной причиной: меньшей концентрацией ловушек NO – комплексов железа с ДЭТК, что должно в соответствии с законом действующих масс приводить к снижению эффективности захвата NO этими комплексами.

Не исключается и вторая, нетривиальная причина обнаруженного различия в образовании МНКЖ-ДЭТК, а именно иницирующее влияние железа, как прооксиданта, на синтез iNOS, катализирующего образование NO из L-аргинина [42].

Следует отметить, что, как и в наших предыдущих опытах, не удалось обнаружить методом ЭПР образование М-ДНКЖ в печени мышей через 4 ч после введения им липополисахарида, даже после последующего введения им на 30 мин двухвалентного железа, которое могло бы включаться в эти комплексы и, тем самым, повышать вероятность образования М-ДНКЖ. Что касается Б-ДНКЖ, то эти комплексы, судя по результатам опытов с перфузией печени *in vitro* раствором ДЭТК, были обнаружены не только у животных, обработанных липополисахаридом, но и у мышей, не подвергнутых какому-либо воздействию. В этих опытах концентрация МНКЖ-ДЭТК, образующихся при распаде Б-ДНКЖ, составила 18 и 8 микромолей на 1 кг влажной печени у мышей,

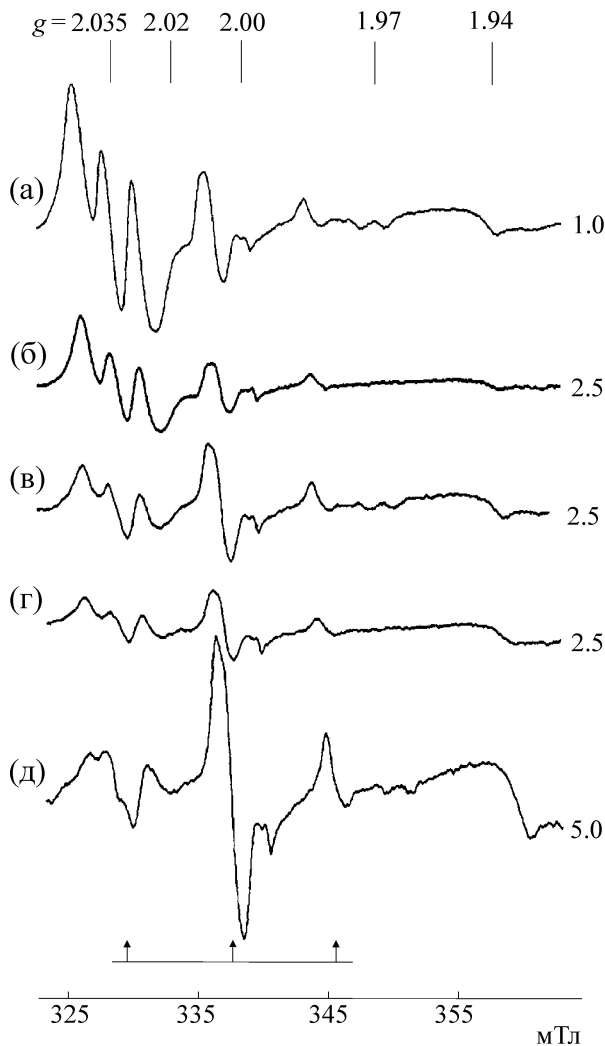


Рис. 5. Спектры ЭПР печени мышей через 4 ч после введения им липополисахарида с последующим введением на 30 мин ДЭТК + Fe^{2+} (а), только Fe^{2+} с последующей перфузией печени *in vitro* раствором ДЭТК (б), только ДЭТК (в), после введения липополисахарида (4 ч) с последующей перфузией печени *in vitro* раствором ДЭТК (г); (д) – печень ничем не обработанных мышей перфузирована раствором ДЭТК. Запись при 77 К. Справа указано усиление радиоспектрометра в относительных единицах. Стрелками на спектре (д) показаны 2-я, 3-я и 4-я компоненты сверхтонкой структуры от ядер меди при g_{\perp} сигнала ЭПР комплексов эндогенной меди – Cu^{2+} с ДЭТК [39,40]. Сигналы ЭПР при $g = 2,035, 2,02$ обусловлены МНКЖ-ДЭТК; при $g = 2,0, 1,97$ и $1,94$ – эндогенными свободными радикалами, комплексами молибдена и восстановленных железосерных белков соответственно.

обработанных липополисахаридом, соответственно, с последующим введением им железа или без него. Таким образом, обнаруживалась корреляция между уровнем МНКЖ-ДЭТК, возникавших *in vivo* в печени этих животных, обусловленная, очевидно, генерацией большего ко-

личества NO из-за стимулирующего действия на этот процесс железа.

Б-ДНКЖ были обнаружены и в печени мышей, не подвергавшимся каким-либо воздействиям, которые могли бы привести к усилению синтеза NO в их организме. Соответствующая концентрация МНКЖ-ДЭТК в печени этих животных составляла 4 микромоля на 1 кг влажной ткани, что было в 2,0–4,5 раза ниже, чем у животных, обработанных липополисахаридом, с усиленной продукцией NO в их организме. Характерно, что аналогичная концентрация МНКЖ-ДЭТК была получена в опытах, в которых раствор ДЭТК вводили мышам внутривентриально на 30 мин.

Если учесть, что при действии ДЭТК на один биядерный ДНКЖ, содержащий две группы $\text{Fe}(\text{NO})_2$, должно возникать соответственно два комплекса МНКЖ с ДЭТК, то приведенные в таблице оценки концентрации МНКЖ-ДЭТК дают следующие концентрации Б-ДНКЖ, возникающих в печени мышей, обработанных липополисахаридом с Fe^{2+} , только липополисахаридом или не обработанных липополисахаридом – соответственно 9, 4 и 2 микромоля на 1 кг влажной ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основной результат нашего исследования – обнаружение в биообъектах разной степени сложности – белках, микроорганизмах и тканях животных биядерных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Как упоминалось выше, их моноядерные ЭПР-детектируемые аналоги – М-ДНКЖ – были обнаружены А.Ф. Ваниным и Р.М. Налбандяном в различных биообъектах 50 лет назад [1], но только сейчас, спустя столь длительное время, полученные нами результаты показывают, что М-ДНКЖ могут представлять в живых системах лишь небольшую часть ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, тогда как Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут оказаться преобладающими у различных представителей живого мира – человека и животных, растений и микроорганизмов.

Обнаруженное нами доминирование Б-ДНКЖ в различных биосистемах (по сравнению с содержанием в них М-ДНКЖ), очевидно, определяется более высокой стабильностью этих комплексов, обусловленной, в первую очередь, характерным для Б-ДНКЖ спиновым спариванием в них («антиферромагнитным» взаимодействием) двух фрагментов $\text{Fe}(\text{NO})_2$ в комплексах. Кроме того, следует также отметить, что Б-ДНКЖ сохраняются даже в сильноокислых средах. В соответствии с высказанным в работе

[9] предположением, это сохранение обусловлено переносом значительной электронной плотности с тиоловых серосодержащих мостиковых лигандов в Б-ДНКЖ на $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -фрагменты. В результате этого «оголения» электронной плотности на атомах серы в тиоловых группах последние «перестают» протонироваться, что и приводит к сохранению тиолсодержащих мостиков в Б-ДНКЖ даже в сильноокислых средах.

Как и в М-ДНКЖ, активным началом в Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами являются $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -фрагменты [3,28]. Именно они, как доноры NO и ионов нитрозония (NO^+), ответственны за биологическое действие обеих форм ДНКЖ, имитирующее разнообразную биологическую активность системы эндогенного NO в живых системах. Более того, проведенная нами оценка содержания Б-ДНКЖ, как доминирующего представителя ДНКЖ в печени мышей, оказалась близкой к стационарной концентрации эндогенного NO в тканях животных, которая варьирует в пределах 1–2 микромолей на 1 кг влажной печени в норме и повышается до 9 микромолей при активации синтеза NO, например, при включении системы клеточного иммунитета, инициируемом бактериальным липополисахаридом. Это позволяет нам предположить, что именно обратимое включение NO в ДНКЖ, в основном в Б-ДНКЖ, обеспечивает его стабилизацию и функционирование в живых системах. Другими словами, не исключено, что Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами представляют собой «рабочую форму» NO, обеспечивающую его функционирование в живых системах в качестве одного из универсальных регуляторов метаболических процессов.

Очевидно, что перенос NO и ионов нитрозония из ДНКЖ на мишени их биологического действия (соответственно, гем- и тиолсодержащие белки) может осуществляться, преимущественно, высокоподвижными низкомолекулярными М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ, а не их белковыми аналогами. Белки, как малоподвижные носители ДНКЖ, вряд ли подходят для роли переносчиков молекул NO и ионов нитрозония. Кроме того, из-за стерических затруднений, определяемых большими размерами белковых молекул, вряд ли возможен эффективный перенос этих агентов с белоксодержащих М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ на гем- и тиолсодержащие белки. Действительно, проведенное в работе [44] сопоставление способности низкомолекулярных и белковых ДНКЖ инициировать у животных гипотензию показало, что скорость снижения артериального давления под действием низкомолекулярных ДНКЖ на порядки превосходила

скорость этого процесса, инициируемого белоксвязанными ДНКЖ.

Как следует из наших исследований, наиболее эффективный способ выявления Б-ДНКЖ в живых системах состоит в обработке клеток и тканей диэтилдитиокарбаматом, легко проникающим внутрь клеток и перехватывающим на себя $\text{Fe}(\text{NO})$ -группы из $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -фрагментов ранее сформировавшихся *in vivo* М- и Б-ДНКЖ с образованием гидрофобных МНКЖ-ДЭТК, локализующихся в клеточных мембранах. Возникает вопрос, обусловлено ли образование последних только взаимодействием ДЭТК с обеими формами ДНКЖ, не могут ли МНКЖ-ДЭТК возникать в клетках и тканях, например, следующим путем – сначала ДЭТК связывается с эндогенным железом, а затем эти комплексы начинают связывать NO, исходно входящего в состав возникших в тканях *in vivo* S-нитрозотиолов или выделяющегося из нитрита в кислой среде. Первое предположение не проходит, поскольку, как уже упоминалось выше, исследованиями американских ученых было показано, что М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами образуются в клетках животных в присутствии NO в количестве, не менее чем на порядок превышающем количество S-нитрозотиолов. Поскольку, согласно нашим данным, М-ДНКЖ представлены в клетках и тканях в существенно меньшем количестве, чем Б-ДНКЖ, говорить о большем вкладе S-нитрозотиолов в образование МНКЖ-ДЭТК по сравнению с вкладом Б-ДНКЖ в этот процесс – тем более не приходится. Во-вторых, связывание железа с ДЭТК, необходимое для последующего перехватывания этими комплексами NO из S-нитрозотиолов, может оказаться невозможным из-за слабой растворимости комплексов железа с ДЭТК в гидрофильной внутриклеточной среде, в которой могут локализоваться S-нитрозотиолы. Что касается возможного вклада в указанный выше процесс NO, образующегося из нитрита в кислой среде (а подкисление внутриклеточной среды в печени – ее ацидоз – вполне возможно, поскольку перфузия печени раствором ДЭТК проводилась нами на забитом животном в отсутствие кислородного снабжения ткани), подобное предположение тоже вряд ли оправдано. Дело в том, что в наших опытах мы использовали для растворения ДЭТК 15 мМ раствор НЕРЕС-буфера при pH 7,4, который при контакте с внутриклеточной средой мог достаточно эффективно предотвратить ее подкисление и тем самым протонирование нитрита с последующим выделением из него NO.

Таким образом, накопившиеся в печени *in vivo* сами по себе ЭПР-недетектируемые Б-ДНКЖ

могут быть превращены в ЭПР-активные МНКЖ-ДЭТК, по количеству которых можно судить о содержании в этой ткани именно Б-ДНКЖ. Предварительные исследования показывают, что аналогичный подход может оказаться успешным при оценке содержания этих комплексов и в других тканях животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-00708а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ф. Ванин и Р. М. Налбандян, *Биофизика* **10**, 167 (1965).
2. А. Ф. Ванин, *Биохимия* **32**, 226 (1967).
3. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1 (2009).
4. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 136 (2011).
5. А. Ф. Ванин, Л. А. Блюменфельд и А. Г. Четвериков, *Биофизика* **12**, 829 (1967).
6. Д. Ш. Бурбаев, А. Ф. Ванин и Л. А. Блюменфельд, *Журн. структур. химии* **12**, 252 (1971).
7. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2**, 224 (1998).
8. A. F. Vanin, N. A. Sanina, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **16**, 82 (2007).
9. A. F. Vanin and D. S. Burbaev, *Biophys. J.* **2011**, Article ID 878236 (2011), doi:10.1155/2011/878236.
10. А. Г. Четвериков, Э. К. Рууге, Д. Ш. Бурбаев и др., *Биофизика* **14**, 932 (1969).
11. F. Murad, *Biosci. Rep.* **24**, 453 (2004).
12. R. F. Furchgott, *Biosci. Rep.* **19**, 235 (1999).
13. L. J. Ignarro, *Biosci. Rep.* **19**, 51 (1999).
14. L. J. Ignarro, *Nitric Oxide: Biology and Pharmacology* (Academic Press, San Diego, 2000).
15. J. R. Lancaster and J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1223 (1990).
16. C. Pellat, Y. Henry, and J.-C. Drapier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 119 (1990).
17. J.-C. Drapier, C. Pellat, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.* **266**, 10162 (1991).
18. M. Lepoivre, J.-M. Flavan, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.* **267**, 22294 (1992).
19. A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, S. Hauschildt, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1177**, 37 (1993).
20. J. Stadler, H. A. Bergonia, M. DiSilvio, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **302**, 4 (1993).
21. Y.-L. Geng, A. S. Petersson, A. Wennmalm, et al., *Exp. Cell. Res.* **214**, 418 (1994).
22. N. R. Bastian, C.-Y. Yim, J. B. Hibbs, et al., *J. Biol. Chem.* **269**, 5127 (1994).
23. K. Odoi, T. Akaike, H. Horie, et al., *Cancer* **77**, 1598 (1996).
24. R. N. Watts, C. Hawkins, P. Ponka, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 7670 (2006).
25. В. Ф. Ванин, *Биохимия* **63**, 782 (1998).
26. A. F. Vanin, *Open Conference Proc. J.* **4**, 31 (2013).
27. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **1**, 191 (1997).
28. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 4 (2013).
29. J. R. Hickok, S. Sahni, H. Shen, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **51**, 1558 (2011).
30. C. C. Tsou, T. T. Lu, and W. F. Liaw, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12626 (2007).
31. T. C. Harrop, D. Song, and S. J. Lippard, *J. Inorg. Biochem.* **101**, 1738 (2007).
32. J. C. Crack, N. E. Le Brun, and A. J. Thomson, *Methods Enzymol.* **437**, 191 (2008).
33. Z. J. Tonzetich, H. Do, and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7964 (2009).
34. L. J. Smith, M. R. Stapleton, G. J. M. Fullstone, et al., *Biochem. J.* **432**, 417 (2010).
35. C. E. Tinberg, Z. J. Tonzetich, H. Wang, et al., *Inorg. Chem.* **49**, 63338 (2010).
36. J. C. Crack, N. E. Le Brun, and A. J. Thomson, *Acc. Chem. Res.* **47**, 3198 (2014).
37. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 35 (2013).
38. R. R. Borodulin, I. A. Dereven'kov, D. S. Burbaev, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **40**, 100 (2014).
39. A. F. Vanin, *Methods Enzymol.* **301**, 269 (1999).
40. А. Л. Клещев, П. И. Мордвинцев и А. Ф. Ванин, *Studia Biofizika* **105**, 93 (1985).
41. L. N. Kubrina, W. S. Caldwell, P. I. Mordvintcev, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1099**, 233 (1992).
42. L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, P. I. Mordvintcev, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1176**, 240 (1993).
43. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 110 (2013).
44. П. И. Мордвинцев, М. Д. Путинцев, М. Е. Галаган и др. *Бюл. ВКНЦ*, № 1, 46 (1988).

Mono- and Binuclear Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-containing Ligands in Various Biosystems

A.F. Vanin, V.D. Mikoyan, L.N. Kubrina, R.R. Borodulin, and E.N. Burgova

Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

It has been shown that dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands, bound with modified bovine serum albumin with high amount of thiol groups, appeared in baker yeast or in animal tissues in the presence of exogenous or endogenous nitric oxide, respectively, are represented predominantly by EPR-silent binuclear form. This form can be transformed into EPR-active mononuclear form of dinitrosyl iron complexes with an increase in pH to basic values, into EPR-active form of mononuclear iron nitrosyl complexes in case of bielectronic recovery of the binuclear form of dinitrosyl iron complexes or under the action of dithiocarbamate derivatives. The latter induced the transformation of dinitrosyl iron complexes into EPR-active mononitrosyl iron complexes with dithiocarbamates. A significant amount of binuclear dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in living systems and identical biological activity of these complexes and endogenous nitric oxide systems allow of considering endogenous binuclear dinitrosyl iron complexes as a “working form” of endogenous nitric oxide recognized now as a universal regulator of biological processes.

Key words: nitric oxide, mono- and binuclear dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands