

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ

© 2017 г. В.Д. Микоян*, Л.С. Ванина**, А.Ф. Ванин* ***

*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

**Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

***Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, 119991, Москва, Трубецкая ул., 8

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

Поступила в редакцию 15.12.16 г.

Методом электронного парамагнитного резонанса установлено, что в растительных тканях (листьях петрушки и яблоках) при наличии в них монооксида азота могут возникать динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, причем в обоих типах тканей эти комплексы обнаруживаются преимущественно в биядерной, диамагнитной форме. Эту форму можно превратить в ЭПР-детектируемый мононитрозильный комплекс железа с диэтилдитиокарбаматом благодаря способности диэтилдитиокарбамата легко присоединять к себе железо-мононитрозильный фрагмент из железо-динитрозильных компонентов биядерных комплексов. Аналогичное превращение обнаруживалось и при воздействии диэтилдитиокарбамата на моноядерную, парамагнитную форму динитрозильных комплексов железа. Значительное количество биядерных комплексов, обнаруживаемых в тканях растений, дает основание рассматривать эти комплексы в качестве «рабочей формы» монооксида азота – одного из универсальных регуляторов метаболических процессов как в растениях, так и в других представителях живого мира.

Ключевые слова: монооксид азота, динитрозильные комплексы железа, тиолы.

В настоящее время установлено, что в растениях, как и в других представителях живого мира (человеке, животных и бактериях), непрерывно ферментативным путем продуцируется простейшее химическое соединение – монооксид азота (NO), функционирующий в живых системах в качестве одного из универсальных регуляторов метаболических процессов [1–3]. В растениях NO возникает из неорганических нитратов и нитритов при участии фермента нитратредуктазы, восстанавливающего нитрат до нитрита и далее нитрита до NO [4,5]. Поскольку монооксид азота как свободнорадикальное соединение в свободном состоянии легко реагирует с другим свободнорадикальным агентом, возникающим в живых системах – анионом супероксида (O_2^-), стационарная концентрация NO может быстро снижаться до уровня, не

оказывающего заметного влияния на биологические процессы, в частности, в растениях [6,7]. Во избежание этого Природа «использует» способность NO включаться в соединения, защищающие его от губительного действия супероксида [8]. Среди таких соединений особое место занимают динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими (RS^-) лигандами, представленные, например, в тканях животных в их моно- и биядерной формах (М- и Б-ДНКЖ соответственно, формулы $[(RS^-)_2Fe^+(NO^+)_2]$ и $[(RS^-)_2Fe_2^+(NO^+)_4]$). Включение NO в качестве динитрозильных лигандов в эти комплексы снижает скорость реакции NO с супероксидом на три порядка, обеспечивает его депонирование в составе белковых ДНКЖ (включающих в себя цистеиновые остатки белков) и перенос NO в составе низкомолекулярных М- и Б-ДНКЖ к мишеням его биологического действия [8–10].

М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами легко образуются в листьях растений при их обработке газообразным NO и идентифицируются по характерному для них сигналу электронного парамагнитного резонанса (ЭПР),

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ – моноядерные (парамагнитные) ДНКЖ, Б-ДНКЖ – биядерные (диамагнитные) ДНКЖ, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат, МНКЖ-ДЭТК – мононитрозильные комплексы железа с диэтилдитиокарбаматом.

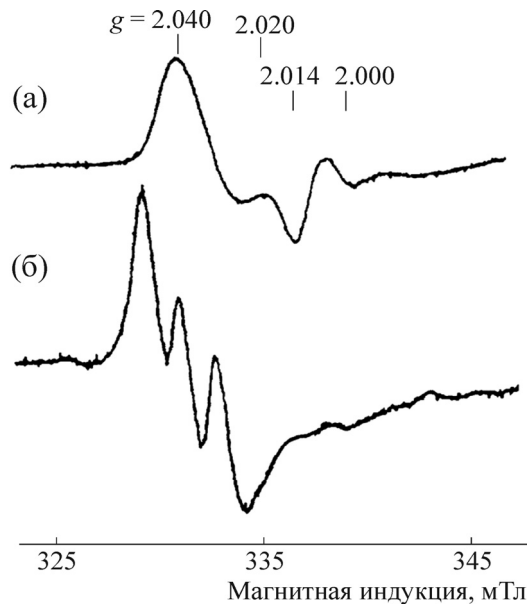


Рис. 1. ЭПР-сигналы М-ДНКЖ (а) и МНКЖ-ДЭТК (б), зарегистрированные при 77 К [5].

приведенным на рис. 1а, называемому, в соответствии со средним значением g -фактора, сигналом 2,03 ($g_{cp} = 2,03$, $g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,01$) [5]. Такой же ЭПР-сигнал М-ДНКЖ регистрируется и в других представителях живого мира [9,10].

В настоящей работе установлено, что в листьях растений (петрушки) и плодах культурного сорта яблони народной селекции Антоновка (вид *Malus domestica*) и зеленоплодного дикорастущего вида яблони североамериканского происхождения (*Malus coronaria* Mill., секция *Chloromelus* Rehd) наряду с М-ДНКЖ, обнаруженными ранее в других растениях [5], может возникать и биядерная форма этих комплексов в количестве, существенно превосходящем уровень М-ДНКЖ.

Б-ДНКЖ, в отличие от М-ДНКЖ, диамагнитны, т.е. ЭПР-неактивны. Это обусловлено тем, что представленные в них два парамагнитных железо-динитрозильных $[Fe^{+}(NO^{+})_2]$ фрагмента спин-спариваются при посредстве мостиковых атомов серы, связывающих эти фрагменты [11]. Как показано в работе [12], это спиновое спаривание (так называемое «антиферромагнитное взаимодействие») в Б-ДНКЖ можно снять, обрабатывая эти комплексы производными дитиокарбамата, например диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК). Последний в соответствии со схемой 1 способен связывать по тиокарбонильной группе железо-монитрозильную $[Fe^{+}(NO^{+})]$ -группу из железо-динитрозильного $[Fe^{+}(NO^{+})_2]$ -фрагмента в обеих формах ДНКЖ с образованием ЭПР-детек-

тируемых монитрозильных комплексов железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК).

Характерным признаком сигнала ЭПР этих комплексов с $g_{\perp} = 2,045$, $g_{\parallel} = 2,02$, приводимого на рис 1б, является наличие триплетной сверхтонкой структуры при g_{\perp} , обусловленной сверхтонким взаимодействием неспаренного электрона с ядром азота нитрозильного (NO) лиганда [13]. По интенсивности этого сигнала можно судить о количестве $[Fe^{+}(NO^{+})]$ -групп, первоначально входивших в состав М- и Б-ДНКЖ и затем включенных в МНКЖ-ДЭТК. Далее, вычитая из них число этих групп, входивших в состав М-ДНКЖ (по интенсивности сигнала ЭПР этих комплексов – сигнала 2,03), можно определить количество $Fe^{+}(NO^{+})_2$ в Б-ДНКЖ и тем самым определить уровень последних в растительной или животной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали диэтилдитиокарбамат натрия (Acros, США), нитрит натрия (Sigma, США) и ферросульфат ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Швейцария). Газообразный NO получали в реакции ферросульфата с нитритом натрия в 0,1 М HCl с последующей очисткой методом низкотемпературной сублимации в вакуумной системе, как описано в работе [11].

Растительные объекты. В экспериментах использовали листья петрушки через одни-две суток после снятия ее с грядки, хранившейся это время при $+4^{\circ}C$, а также два видаобразца яблок (род *Malus* Mill. (яблоня) семейство *Rosaceae* Juss., подсемейство *Maloideae*). Это – широко распространенный в европейском географическом центре сорт народной российской селекции – антоновка обыкновенная – вид *M. domestica* (яблоня домашняя) и дикорастущий вид североамериканского материка *M. coronaria* Mill. – яблоня вечнозеленая, секция *Chloromeles* Rehd. – зеленоплодная. Плоды этой яблони взяты из живой коллекции дикорастущих видов и форм яблони, широко представленной в ботаническом саду биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова [14]. Обработку листьев петрушки и ткани яблок газообразным NO проводили, используя аппарат Тунберга [11], в который помещали эти объекты. После откачки воздуха из аппарата в него на 15–20 мин напускали газообразный NO под давлением 100–150 мм рт. ст., затем откачивали его, извлекали образцы тканей и замораживали их в жидком азоте в ампулах с внешним диаметром 4 мм. После ЭПР-измерений этих образцов их размораживали и выдерживали в течение получаса в 15 мМ HEPES-буфере,

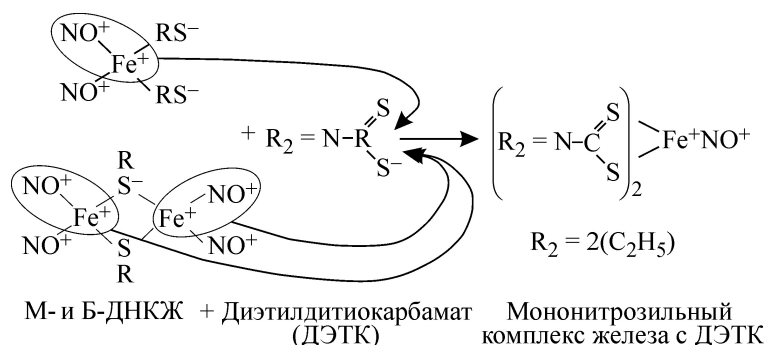


Схема 1. Превращение Б- или М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в парамагнитные мононитрозильные комплексы железа с ДЭТК [12].

pH 7,4, содержащем 100 мМ ДЭТК. Препараты снова замораживали в жидком азоте для новых ЭПР измерений.

ЭПР-измерения проводили на модифицированном радиоспектрометре Radio-Pan (Польша) при 77 К. Концентрацию парамагнитных центров определяли по интенсивности их сигнала ЭПР с использованием метода двойного интегрирования. В качестве стандартного образца использовали замороженный раствор динитрозильного комплекса железа с цистеином с известной концентрацией. Комплекс синтезировали по методу, описанному в работе [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка содержания Б-ДНКЖ в листьях петрушки. Обработка листьев петрушки газообразным NO в аппарате Гунберга в течение 15 мин с последующей откачкой NO из аппарата приводила к образованию в листьях М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в концентрации 10 мкмоль в пересчете на 1 кг влажной ткани. В приведенном на рис. 2б спектре ЭПР этого препарата сигнал 2,03 представлен его компонентой при g_{\perp} , наложенной на одну из компонент сверхтонкой структуры сигнала ЭПР эндогенных комплексов марганца, характерного для исходного препарата листьев (рис. 2а,г). В листьях, не обработанных NO, М-ДНКЖ не обнаруживались.

После 30-минутной инкубации препарата листьев петрушки, дающего сигнал 2,03, в 100 мМ водном растворе ДЭТК спектр ЭПР этого препарата резко изменялся. Исчезали оба сигнала ЭПР, характерные для М-ДНКЖ и комплексов марганца, а вместо них регистрировались сигналы ЭПР МНКЖ-ДЭТК с $g_{\perp} = 2,045$, $g_{\parallel} = 2,02$ и с триплетной сверхтонкой структурой при g_{\perp} (рис. 2в), а также сигнал ЭПР комплексов эндогенной двухвалентной меди с ДЭТК с тремя (из четырех) высокополе-

выми компонентами сверхтонкой структуры (с, d, e). В «чистом» виде этот сигнал регистрировался в листьях петрушки (рис. 2д), обработанных ДЭТК без предварительного воздействия на них газообразного NO. Третья (а) и четвертая (b) компоненты из шестикомпонентной сверхтонкой структуры, характерной для сигнала ЭПР эндогенных комплексов марганца, указаны на рис. 2г.

Таким образом, в листьях петрушки ЭПР-сигнал МНКЖ-ДЭТК появлялся только в препаратах, предварительно обработанных NO. Концентрация этих комплексов достигала, судя по интенсивности их ЭПР-сигнала, 60–70 мкмоль на 1 кг влажных листьев. Поскольку в образование МНКЖ-ДЭТК вносили вклад М-ДНКЖ, концентрация которых, судя по интенсивности их сигнала ЭПР (сигнала 2,03) составляла 10 мкмоль на 1 кг влажных листьев, концентрация Б-ДНКЖ в них достигала 50–60 мкмоль на 1 кг (в пересчете на один атом железа в этих комплексах), т.е. примерно в пять–шесть раз превосходила уровень М-ДНКЖ.

Оценка содержания Б-ДНКЖ в ткани яблок.

Такая обработка не требовалась для образования МНКЖ-ДЭТК в ткани яблок – плодов как культурного сорта яблони народной селекции Антоновки, так и дикорастущего североамериканского вида яблони *Malus coronaria* Mill. Для тех и других яблок обработка их только ДЭТК приводила к образованию в ткани этих плодов МНКЖ-ДЭТК в концентрации 0,2–0,3 мкмоль на 1 кг яблок (рис. 3б). Аналогичная обработка, но уже после контакта тканей яблок с NO, приводила к повышению уровня МНКЖ-ДЭТК до 0,6 и 5 мкмоль на 1 кг влажной ткани яблок соответственно в ткани яблок сорта Антоновка и североамериканского американского вида *Malus coronaria* Mill. (рис. 3г).

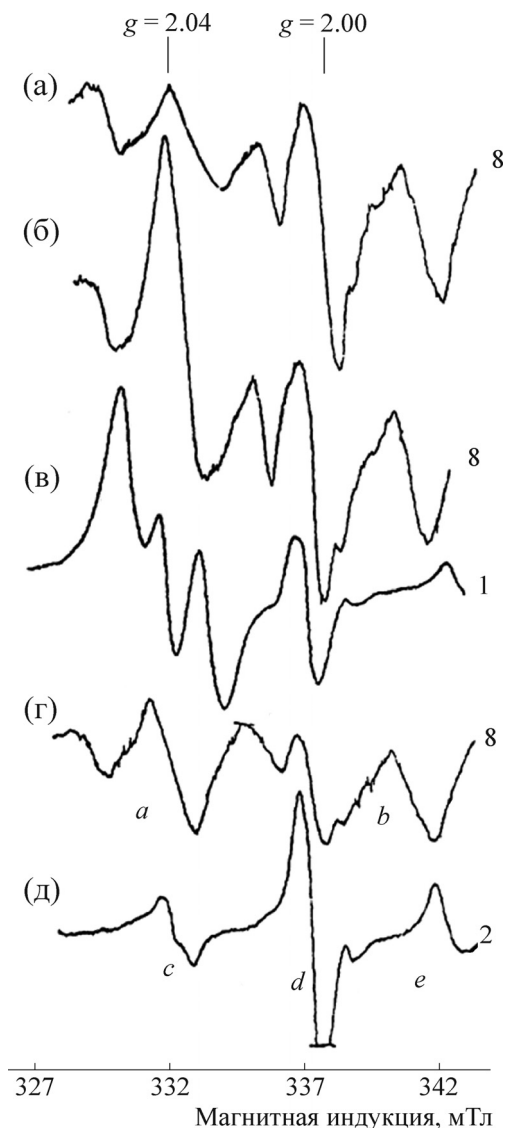


Рис. 2. Спектры ЭПР исходных образцов листьев петрушки ((а) и (г)), обработанных газообразным NO (б) и затем ДЭТК (в). Образец (д) обработан только ДЭТК. На спектрах (г) и (д) указаны соответственно третья и четвертая компоненты сверхтонкой структуры, характерной для сигнала ЭПР эндогенных комплексов марганца (а и б), и вторая–четвертая компоненты сверхтонкой структуры (с, d, e), характерной для сигнала ЭПР комплексов эндогенной Cu^{2+} с ДЭТК. С правой стороны спектров указано усиление радиоспектрометра в отн. ед. Спектры зарегистрированы при 77 К.

Количество М-ДНКЖ, возникавших в тканях этих яблок после их обработки NO, составляло 0,2–0,3 мкмоль на 1 кг влажной ткани яблок, т.е. находилось на том же уровне, что и количество М-ДНКЖ, возникавшее при обработке яблок только ДЭТК (рис. 3в).

Таким образом, в ткани яблок сорта Антоновка и дикого североамериканского вида

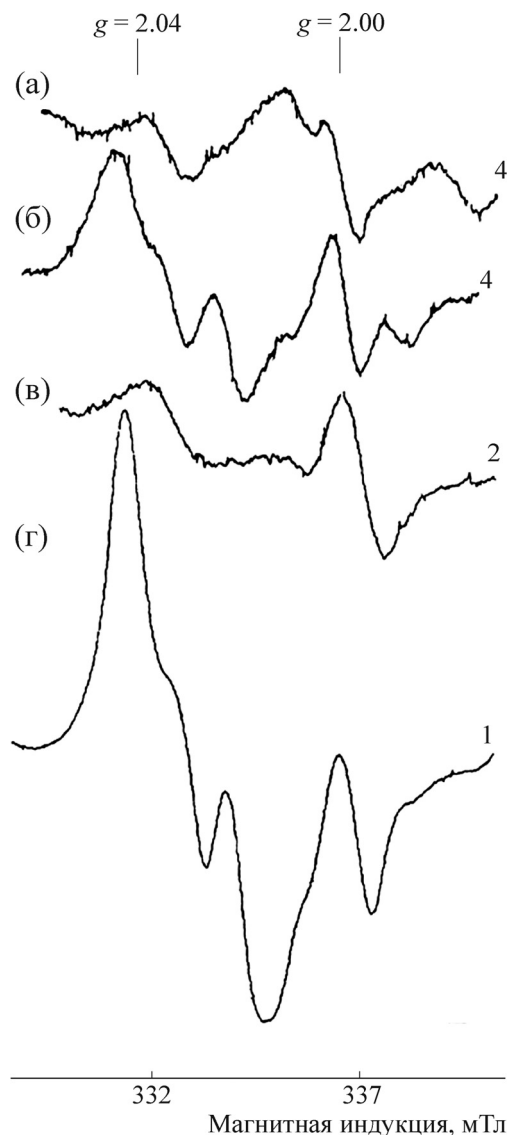


Рис. 3. Спектры ЭПР исходной ткани яблока дикорастущего североамериканского вида яблони *M. coronaria* Mill. (а), после его обработки ДЭТК (б), после его обработки NO (в) и после дополнительной обработки ДЭТК (г). Справа от спектров указано усиление радиоспектрометра в отн. ед. Спектры зарегистрированы при 77 К.

яблони *Malus coronaria* Mill. уровень Б-ДНКЖ составлял соответственно 0,3 и 4,7 мкмоль на 1 кг яблок (в пересчете на один атом железа в комплексе), т.е. в 2 и 16 раз превышал уровень образующихся в этих яблоках М-ДНКЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что в исследованных тканях растительного происхождения (в листьях петрушки и ткани яблок) при появлении в них монооксида азота могут

возникать ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Это означает, что в данных тканях имеется достаточное количество тиолсодержащих соединений (белков и низкомолекулярных тиолов), а также слабосвязанного («свободного») железа, образующих с NO соответствующие ДНКЖ [9,10].

Как и в тканях животных, уровень биядерной формы ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, образующихся в растительных тканях, существенно превышал уровень М-ДНКЖ, т.е. монооксид азота, появляющийся в тканях растений, преимущественно включался в Б-ДНКЖ. Очевидно, это было обусловлено большей устойчивостью данной формы ДНКЖ, обусловленной наличием в этих комплексах антиферромагнитного взаимодействия между двумя $[Fe^+(NO^+)]_2$ -фрагментами этих комплексов. Преобладание Б-ДНКЖ могло также определяться низким уровнем тиолов (RS^-), влияющих на равновесное соотношение между Б- и М-ДНКЖ, описываемое схемой 2 [11].

При высокой концентрации тиолов это равновесие сдвигается в сторону М-ДНКЖ, при ее понижении – в сторону Б-ДНКЖ.

Следует отметить, что обработка растительных объектов газообразным NO с последующей его откачкой из этих объектов, могла приводить к образованию только ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, как соединений, включающих в себя NO. Взаимодействие этих комплексов с ДЭТК приводило, в соответствии со схемой 1, к образованию ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК. Что касается связывания NO с другими его ловушками, например гемсодержащими соединениями, оно должно было приводить к появлению ЭПР-детектируемых нитрозильных комплексов с гемовым железом. Отсутствие характерных для этих комплексов сигналов ЭПР в диапазоне значений *g*-фактора 2,07–1,98 [15] показывает, что такие комплексы в тканях растений не возникали, очевидно, из-за низкого содержания в них гемсодержащих соединений. Кроме того, если бы нитрозильные гемсодержащие комплексы и возникали, из-за их высокой стабильности переход NO с них на комплексы ДЭТК с железом, как показывают соответствующие исследования [15], не имел бы места.

Вместе с тем следует отметить, что при наличии в растительных тканях нитрита последний в присутствии ДЭТК и железа мог бы инициировать образование МНКЖ-ДЭТК при инкубации листьев петрушки и ткани яблок в 15 мМ НЕРЕС-буфере при рН 7,4. Появление в растительных тканях зон с пониженным значением рН (возникающих из-за развивающегося

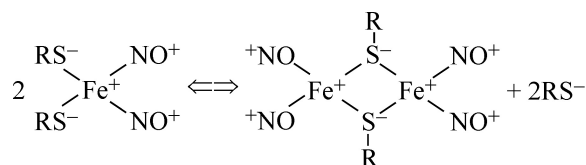


Схема 2. Соотношение между Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ.

в тканях ацидоза) должно было приводить к протонированию нитрита с образованием азотистой кислоты (HNO_2), высвобождающей в присутствии восстановителей, имеющихся в растительных тканях, монооксид азота, включающийся в МНКЖ-ДЭТК. Не исключено, что образование последних в ткани яблок в присутствии ДЭТК без предварительной обработки этих объектов газообразным NO (рис. 3б) было обусловлено наличием в них нитрита.

Обращает на себя внимание резкое различие в образовании Б-ДНКЖ в ткани яблок сорта Антоновка и дикорастущего североамериканского вида яблонь *Malus coronaria* Mill. Существенно большая концентрация этих комплексов в последних обусловлена, очевидно, более высоким уровнем в ткани яблок дикорастущего вида яблонь белковых и низкомолекулярных тиолсодержащих соединений, а также «свободного» железа, как показателей более активного метаболизма в этих растениях по сравнению с их культурными аналогами.

Таким образом, есть основание полагать, что в присутствии NO в тканях растений значительная его часть может включаться в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (преимущественно в их биядерную форму), что должно обеспечивать стабилизацию NO и возможность его переноса к мишеням биологического действия. Тем самым достигается функционирование ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в тканях растений (как и в тканях животных [9]) в качестве «рабочей формы» эндогенного монооксида азота.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. J. Ignarro, *Nitric Oxide Biology and Pharmacology* (Academic Press, Zurich, Switzerland, 2000).
2. P. Domingos, A. M. Prado, A. Wong, et al., *Mol. Plant* **8**, 506 (2015).
3. A. M. Stern and J. Zhu, *Adv. Appl. Microbiol.* **87**, 187 (2014).
4. R. Desikan, R. Griffith, J. Hancock, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16314 (2002).

5. A. F. Vanin, D. Svistunenکو, V. D. Mikoyan, et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 24100 (2004).
6. W. H. Koppenol, J. J. Moreno, W. A. Pryor, et al., *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 834 (1992).
7. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004)
8. А. Ф. Ванин, *Биохимия* **63**, 924 (1998).
9. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **54**, 15 (2016).
10. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1 (2009).
11. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 1236 (2010).
12. A. F. Vanin, R. R. Borodulin, and V. D. Mikoyan, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **62**, 1 (2017).
13. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **15**, 295 (2006).
14. Л. С. Ванина и В. В. Вартапетян, *Дикорастущие яблони (коллекция ботанического сада биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова* (Товарищество научных изданий КМК, Москва, 2010).
15. В. Д. Микоян, Л. Н. Кубрина, Г. Н. Хачатрян и др., *Биофизика* **51**, 968 (2006).

Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands in Plant Tissues

V.D. Mikoyan*, L.S. Vanina**, and A.F. Vanin* ***

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

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

***Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University,
ul. Trubetskaya 8, Moscow, 119991 Russia

Using electron paramagnetic resonance it has been demonstrated that dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands can be formed in plant tissues (parsley and apples) in the presence of nitric monoxide in these living systems. In two types of tissues the said dinitrosyl iron complexes are predominantly represented by the binuclear, diamagnetic form. This diamagnetic form can be transformed in EPR-detectable mononitrosyl iron complexes with diethyldithiocarbamate due to the ability of diethyldithiocarbamate to accept the iron-monomitrosyl groups from iron-dinitrosyl fragments of binuclear complexes. Similar transformation was observed under the influence of diethyldithiocarbamate on mononuclear, paramagnetic form of dinitrosyl iron complexes. Significant amount of binuclear dinitrosyl iron complexes, found in plant tissues suggests that these complexes can be considered as a “working form” of nitric monoxide which is recognized now as a universal regulator of metabolic processes in plants as well as in other representatives of living world.

Key words: nitrogen monoxide, dinitrosyl iron complexes, thiols