

УДК 577.3

СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНАЯ ПРИРОДА МОЛЕКУЛ МОНООКСИДА АЗОТА КАК ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ИХ ПРЕВРАЩЕНИЕ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ В ИОНЫ НИТРОЗОНИЯ

© 2020 г. А.Ф. Ванин

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4
Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8/2

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

Поступила в редакцию 13.03.2020 г.

После доработки 13.03.2020 г.

Принята к публикации 16.03.2020 г.

Получены новые результаты, подтверждающие наши предыдущие данные о способности биядерной формы биологически активных динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами (глутатионом или N-ацетил-L-цистеином) выступать в качестве доноров катионов нитрозония, обеспечивающих образование S-нитрозотиолов при распаде этих комплексов в кислой среде как в аэробных, так и анаэробных условиях. Появление катионов нитрозония в составе биядерных динитрозильных комплексов железа определяется реакцией диспропорционирования свободно-радикальных молекул монооксида азота при их связывании в ходе синтеза этих комплексов с катионами Fe^{2+} (по две на один катион). При окислении тиолсодержащих лигандов в динитрозильных комплексах железа или их блокаде тиолспецифическими реагентами выделяющиеся при распаде этих комплексов катионы нитрозония при нейтральных значениях pH подвергаются гидролизу, превращаясь в анионы нитрита. Аналогичное превращение имеет место при распаде при нейтральных значениях pH моноядерной формы динитрозильных комплексов железа с лигандами нетиоловой природы. Установлено, что образование S-нитрозотиолов при распаде биядерных динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами при кислотных значениях pH может блокироваться при двух-трехкратном избытке свободных тиолов (не включенных в состав комплексов) по отношению к содержанию самих комплексов. Эта блокада обусловлена восстановлением катионов нитрозония тиолами при участии ионов железа как катализаторов до нейтральных молекул NO, высвобождающихся из биядерных динитрозильных комплексов железа. Таким образом обе формы динитрозильных комплексов, возникающие в живых организмах, могут функционировать в них не только как доноры одного из универсальных регуляторов метаболических процессов монооксида азота, но и как доноры катионов нитрозония, инициирующих процесс S-нитрозирования низкомолекулярных и высокомолекулярных (белковых) тиолов.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, оксид азота, S-нитрозотиолы, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302920030011

В настоящее время установлено, что во всех представителях живого мира – животных и человеке, растениях и бактериях – ферментативным путем непрерывно вырабатывается простейшее химическое соединение – монооксид азота (или, как сейчас его принято называть в биологических

публикациях, – оксид азота – NO), функционирующее в живых организмах в качестве одного из универсальных регуляторов разнообразных метаболических процессов [1]. Его биологическое действие не опосредовано клеточными рецепторами: оксид азота легко проникает через клеточные мембраны и, связываясь с гемовой группой разнообразных гемсодержащих ферментов, например, с гуанилатциклазы, активирует (или ингибирует) эти ферменты.

Наряду с биологической активностью NO не менее важным представляется биологическое действие ионизированной формы этого агента – катиона нитрозония (NO^+), связывание которого с

Сокращения: М-ДНКЖ – моноядерные динитрозильные комплексы железа, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, Б-ДНКЖ – биядерные динитрозильные комплексы железа, ДНКЖ-GSH – динитрозильные комплексы железа с глутатионом, GS-NO – S-нитрозоглутатион, NAC – N-ацетил-L-цистеин, ДНКЖ-NAC – динитрозильные комплексы железа с N-ацетил-L-цистеином, ЭДТА – этилендиаминтетраацетат, МНКЖ – монокитрозильные комплексы железа.

тиоловыми группами белков приводит к образованию соответствующих S-нитрозотиолов (RS-NO), резко изменяющих реактивность этих белков [2–4].

В связи с активной ролью катиона NO^+ в биологических процессах встает вопрос, каким образом в живых организмах может достигаться ионизация (одноэлектронное окисление) молекул NO до NO^+ ? Большинство исследователей связывает это с окислением NO кислородом до NO_2 . В образующемся аддукте – триоксиде азота ($\text{NO}-\text{NO}_2$) – взаимное одноэлектронное окисление-восстановление свободно-радикальных молекул NO и NO_2 (реакция их диспропорционирования) приводит к трансформации триоксида азота в аддукт $\text{NO}^+-\text{NO}_2^-$. В отсутствие тиолов ион нитрозония в этом аддукте должен гидролизироваться, превращаясь при связывании с ионами гидроксила и сохранении нейтральных значений pH (в буферном растворе), в анион нитрита [2–7]. В присутствии тиолов, характеризующихся существенно более высоким, чем анион гидроксила, сродством к ионам нитрозония, последние, связываясь с тиолами, образуют S-нитрозотиолы. В кислой среде оба компонента аддукта $\text{NO}^+-\text{NO}_2^-$ превращаются в отсутствие тиолов в молекулы азотистой кислоты (HNO_2), тогда как в присутствии тиолов – в молекулы S-нитрозотиолов [5, 6].

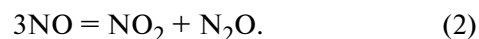
Такого рода превращения, продемонстрированные автором в работе [8] для чисто химических систем, как оказалось, не имеют отношения к процессам образования S-нитрозотиолов в живых организмах. Проведенные на клеточных культурах и микроорганизмах исследования показали, что генерация в них NO действительно приводит к появлению в этих клетках как низкомолекулярных, так белковых S-нитрозотиолов. Однако этот процесс равноэффективно идет как в присутствии, так и в отсутствие кислорода [9, 10]. Это означает, что образование S-нитрозотиолов, т.е. необходимое для этого окисление NO до NO^+ , может происходить в живых организмах и в анаэробных условиях – в отсутствие кислорода.

Возможно ли это? Да, если принять во внимание свободнорадикальную природу оксида азота – агента, выбранного Природой в качестве одного из универсальных регуляторов метаболических процессов у всех представителей живого мира. Дело в том, что для свободных радикалов характерна реакция диспропорционирования, т.е. реакция взаимного одноэлектронного окисления-восстановления, реализующаяся при взаимодействии двух молекул свободных радикалов. Именно эта реакция может обеспечивать превращение одной молекулы NO в катион нитрозония,

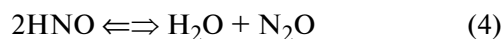
а другой – в анион нитроксила (NO^-) (по реакции 1):



Как было показано нами в работе [8], существование такой реакции в газообразном NO следует из факта превращения этого газа в NO_2 и N_2O в соответствии с реакцией 2, характерной для этого газа при давлении несколько десятков атмосфер (11, 12):



Как показано в работе [8], уравнение, характеризующее реакцию 1, превращается в уравнение, характеризующее реакцию 2, после умножения обеих его частей на 2 и добавления к ним двух молекул воды, обеспечивающих гидролиз ионов NO^+ и NO^- с образованием соответственно молекул азотистой кислоты (HNO_2) и молекул нитроксила (HNO). Последующее диспропорционирование этих молекул в соответствии с реакциями 3 и 4



приводит соответственно к их превращению в диоксид, монооксид (оксид) и закись азота и тем самым (после удаления из обеих частей модифицированного уравнения одной молекулы воды и одной молекулы NO) к превращению этого уравнения в уравнение 2. Таким образом, при высоких давлениях оксид азота может вести себя как кислотный ангидрид, обеспечивающий образование азотистой кислоты.

Такое поведение молекул NO не обнаруживается при давлении в одну атмосферу и ниже, т.е. при концентрации этого агента, продуцируемого в живых организмах. Очевидно, в этом случае концентрация аддуктов (NO^+-NO^-) недостаточна для образования в реакции гидролиза заметного количества азотистой кислоты, так что молекулы NO не проявляют себя в этих условиях в качестве кислотного ангидрида. Тем не менее, как было предположено автором в работах [8, 13], диспропорционирование молекул NO может идти и в этих условиях при наличии в растворе ионов Fe^{2+} , характеризующихся высоким сродством к молекулам NO [14]. Связывание двух молекул NO с ионом Fe^{2+} с образованием железодинитрозильного $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ -фрагмента – так называемого железодинитрозильного $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ -мотива, с включением в его молекулярные орбитали π -орбиталей NO и d -орбиталей железа, обеспечивает перенос неспаренного электрона в этом мотиве с одной молекулы NO на другую, т.е. их реакцию дис-

пропорционирования – реакцию 1. Последующее протонирование появляющегося в этом мотиве иона нитроксила приводит к выходу этого иона, как это показано на схеме 1, из ли-

гандного окружения железа с последующим диспропорционированием молекул нитроксила (HNO) и появлением вместо них в соответствии с уравнением 4 закиси азота и воды:

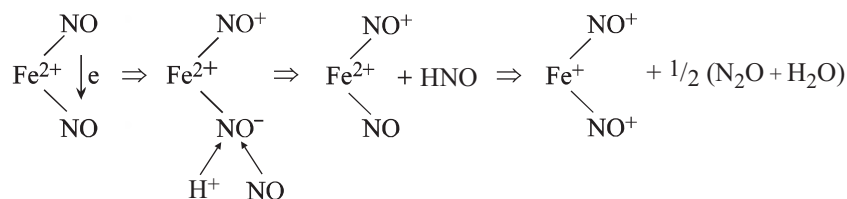


Схема 1. Предполагаемый механизм образования [Fe(NO)₂]-мотива в реакции молекул NO с ионом Fe²⁺ [8, 13, 15–19].

Вместо иона нитроксила в окружение железа включается третья молекула NO, в результате железо в железодинитрозильном мотиве приобретает *d*⁷-электронную конфигурацию с соответствующей резонансной структурой железодинитрозильного мотива – [Fe⁺(NO⁺)₂].

Очевидно, что наличие в этом мотиве легко гидролизуемых NO⁺-лигандов делает указанную резонансную структуру неустойчивой. Эту неустойчивость можно устранить введением в координационную сферу железодинитрозильного мотива тиолсодержащих (RS⁻) лигандов, которые,

будучи сильными π-донорами электронной плотности, могут обеспечить перенос этой плотности на железо и нитрозильные лиганды. Происходящее в результате этого переноса снижение положительного заряда на этих лигандах ослабляет взаимодействие последних с ионами гидроксила, предотвращая тем самым гидролиз нитрозильных лигандов, в результате в соответствии со схемой 2 возникают стабильные парамагнитные моноядерные динитрозильные комплексы железа (М-ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами (формула [(RS⁻)₂Fe⁺(NO⁺)₂]:

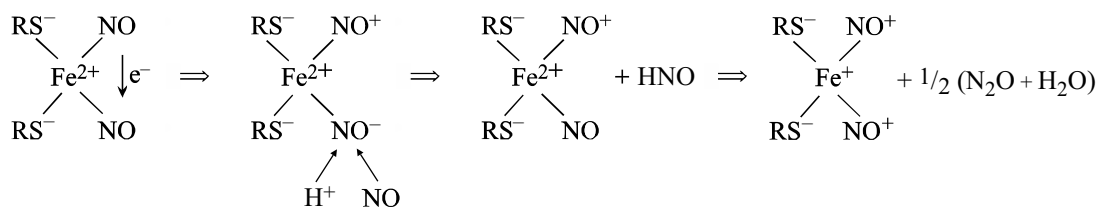


Схема 2. Предполагаемая схема образования моноядерных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции двухвалентного железа, тиолов и газообразного NO [8, 13, 15–19].

Именно эти комплексы впервые были обнаружены нашей группой сначала в дрожжевых клетках (1964–1965 гг.) [20, 21], а затем в тканях животных и птиц (1967 г.) [22] по характерному для этих комплексов сигналу электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) со средним значением *g*-фактора, равным 2.03 (сигнала 2.03), приведенному на рис. 1. В 1964 г. слабый пик при *g* = 2.03 был зарегистрирован Д. Мэллардом и М. Кентом в химически индуцированной гепатоме крыс [23], а в 1965 г. такой же сигнал (точнее, только его часть – пик при *g*₁ = 2.035) был зарегистрирован Б. Коммонером с сотрудниками в печени крыс при иницировании у них гепатоканцерогенеза [24]. В 1990-е годы, когда оксид азота был признан в качестве одного из эндогенных универсальных регуляторов метаболических процессов в

живых организмах, М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами были обнаружены во многих биосистемах, способных продуцировать оксид азота [25–36].

Результаты многолетних исследований природы и биологической активности этих комплексов позволили нам в последние годы предположить, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (и не только М-ДНКЖ, но и обнаруженная позже в биосистемах биядерная форма этих комплексов – Б-ДНКЖ, формула [(RS⁻)₂Fe₂⁺(NO⁺)₄]) могут функционировать в живых организмах в качестве «рабочей формы» оксида азота – они обеспечивают стабилизацию и доставку NO, а также его катионной формы – ионов нитрозония – к мишеням их биологического действия [18, 19].

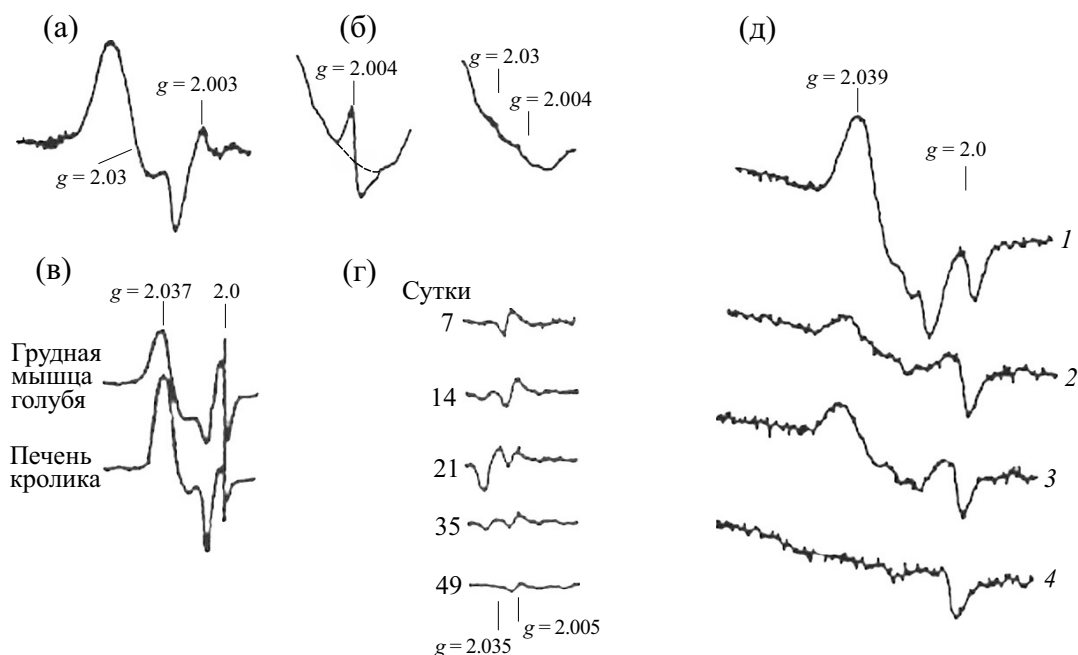


Рис. 1. Сигнал с $g = 2.03$, впервые зарегистрированный в 1960-е годы: (а) – в дрожжевых клетках [20, 21]; (б) – в химически индуцированной гепатоме крыс [23]; (в) – в тканях голубей и кроликов [22]; (г) – в печени крыс на 1–45 сутки после введения в их диету гепатоканцерогенов [24]. (д) – Сигнал с $g = 2.03$, зарегистрированный в 1990-е годы в активированных макрофагах мышей в присутствии субстрата NO-синтаз L-аргинина (1), L-аргинина и ингибитора NO-синтаз N-метил-L-аргинина (2), в отсутствие L-arg и NMMA (3) или в присутствии только NMMA (4) [25].

Цель настоящей публикации состояла в выяснении поставленного ранее в работах автора [8, 13] вопроса о способности ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами выступать в качестве доноров не только нейтральных молекул NO, но и ионов нитрозония. Другими словами, могут ли эти комплексы сами по себе, как это показано на схеме 3, при их распаде в присутствии тиолов иницииро-

вать образование S-нитрозотиолов, а при блокаде тиолов соответствующими реагентами или их окислении – образование нитрита. При этом в соответствии со схемой 3 уровень S-нитрозотиолов или нитритов должен быть равен количеству высвобождающихся при этом нейтральных молекул NO.

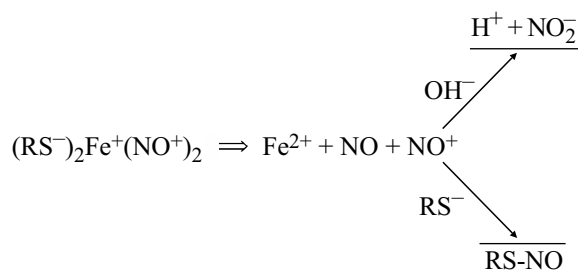


Схема 3. Предполагаемая схема распада М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, приводящего при наличии или отсутствии (блокаде) тиолов в растворе соответственно к накоплению S-нитрозотиолов или нитрита [8, 13].

Проведенные ранее на 0.5 мМ растворах Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) эксперименты, казалось бы, полностью подтвердили это предположение [8, 13]. Распад комплексов в этих работах был инициирован либо протонированием тиолсодержащих лигандов, достигавшимся прогреванием растворов Б-ДНКЖ в сильно кислой среде, окислением тиоловых групп этих ли-

гандов кислородом воздуха, либо связыванием этих групп с ртутьсодержащим агентом – пархлормеркурийбензоатом – в последних двух опытах при нейтральных значениях pH раствора. Предполагалось, что в обоих случаях Б-ДНКЖ сначала распадались на моноядерные формы, которые затем начинали распадаться на составляющие их компоненты, как это показано на схеме 3.

При этом половина высвобождающихся в кислой среде нитрозильных лигандов (как в аэробных, так и в анаэробных условиях) обнаруживалась в форме NO^+ в составе S-нитрозоглутатиона (GS-NO), тогда как при распаде ДНКЖ в растворе при нейтральных значениях pH также только половина нитрозильных лигандов превращалась в анионы нитрита (очевидно, в результате гидролиза высвобождающихся из ДНКЖ ионов нитрозония).

Что касается другой половины нитрозильных лигандов, то в соответствии со схемой 3 она должна была высвобождаться из Б-ДНКЖ в форме газообразных (летучих) молекул NO . Однако оценка уровня этого газа, высвобождавшегося в течение часа в анаэробных условиях из подкисленных 12 мМ растворов Б-ДНКЖ с глутатионом при их прогреве, показала, что оба нитрозильных лиганда, входивших в состав железо-динитрозильного мотива, переходили в форму нейтральных молекул NO . Ни GS-NO , ни нитрит в растворах распадающихся ДНКЖ в этих опытах не обнаруживались.

Для объяснения полученного несоответствия со схемой 3 было предположено, что GS-NO , который мог возникать в этих условиях, распадался при каталитическом действии на него примесной меди, уровень которой мог повышаться, например, в результате использования при синтезе Б-ДНКЖ-GSH в сравнительно высокой (12 мМ) концентрации ферросульфата (до 24 мМ) [8, 13]. Возможен был и другой путь превращения всех нитрозильных лигандов при распаде Б-ДНКЖ-GSH в нейтральные молекулы NO . Он мог реализовываться в результате одноэлектронного восстановления катионов нитрозония ионами Fe^{2+} , высвобождающимися в соответствии со схемой 3 из Б-ДНКЖ. Мог ли этот процесс эффективно реа-

лизоваться при участии только ионов Fe^{2+} или эти ионы выступали в качестве промежуточных участников — катализаторов реакции восстановления катионов нитрозония глутатионом как представителем тиолсодержащих соединений — этот вопрос в наших предыдущих работах [8, 13] не изучался.

В настоящей работе сделана попытка преодолеть этот недостаток и тем самым окончательно ответить на вопрос, действительно ли ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут функционировать в живых организмах не только в качестве доноров газообразных (нейтральных) молекул NO , но и катионов нитрозония.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах были использованы ферросульфат (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, N-ацетил-L-цистеин (NAC), неокупроин и нитрит натрия (все производства компании Sigma, США). Газообразный NO был получен в реакции ферросульфата и нитрита натрия в 0.1 М HCl с последующей очисткой NO от примеси NO_2 методом низкотемпературной сублимации в вакуумированном сосуде [17].

Синтез Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ с глутатионом или N-ацетил-L-цистеином. При синтезе ДНКЖ с глутатионом (ДНКЖ-GSH) или N-ацетил-L-цистеином (ДНКЖ-NAC) как представителями тиолсодержащих лигандов использовалась способность S-нитрозотиолов продуцировать ДНКЖ с тиолсодержащими (RS^-) лигандами в реакции двух молекул RS-NO с ионом двухвалентного железа и двумя молекулами тиолов (схема 4):

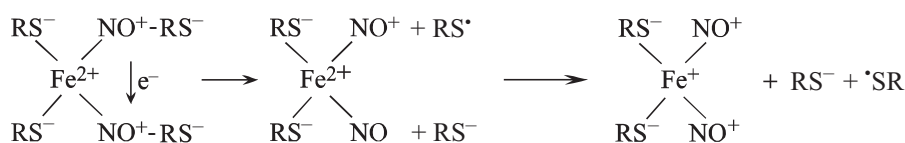


Схема 4. Предполагаемый механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции между Fe^{2+} -ионами, тиолами (RS^-) и S-нитрозотиолами (RS-NO^+) [37].

В соответствии со схемой 3 при связывании с Fe^{2+} ионом двух разных резонансных структур $\text{RS-NO}/\text{NO}^+-\text{RS}^-$ и NO^+-RS^- перенос электрона от NO^+ в первой из них на ион нитрозония в другой структуре может сразу же из-за распада S-нитрозотиольных лигандов приводить к формированию железодинитрозильного $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]$ -мотива М-ДНКЖ. Что касается по-

следующего обратимого превращения М-ДНКЖ в биядерную Б-ДНКЖ-форму, происходящего в соответствии со схемой 5, то, поскольку тиолы включаются в эти комплексы в ионизованной RS^- -форме, из-за низкого содержания последней при нейтральных значениях pH подавляющая часть М-ДНКЖ, в частности М-ДНКЖ-GSH, в этих условиях должна димеризоваться в Б-ДНКЖ:

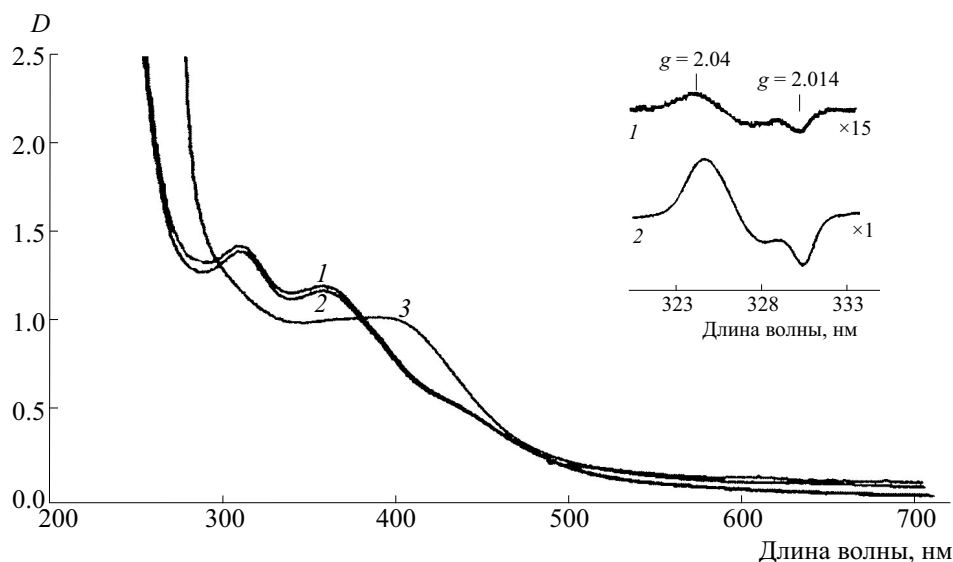


Рис. 2. Спектры оптического поглощения Б-ДНКЖ-GSH, зарегистрированные в водном растворе при pH 7.4 и 1.0 (кривые 1 и 2 соответственно). Кривая 3 – спектр поглощения М-ДНКЖ-GSH, зарегистрированный в растворе Б-ДНКЖ-GSH в присутствии трехкратного избытка глутатиона и pH 11.0. На врезке – сигналы с $g = 2.03$ (кривые 1 и 2), зарегистрированные при 77 К в растворах Б-ДНКЖ-GSH, характеризующихся спектрами оптического поглощения, представленными соответственно кривыми 1 и 3. Справа у кривых на врезке указано усиление радиоспектрометра в отн. ед. Точно такие же спектры оптического поглощения и сигнал с $g = 2.03$ характерны соответственно для Б-ДНКЖ-NAC и М-ДНКЖ-NAC.

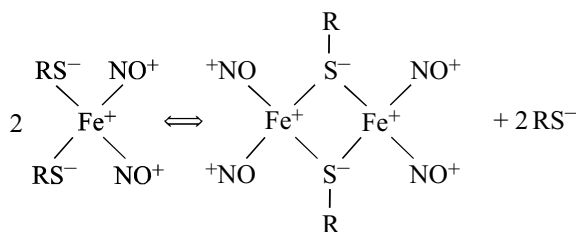


Схема 5. Обратимое взаимопревращение М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [17].

В соответствии с ранее разработанным нашей группой протоколом синтеза Б-ДНКЖ на основе схемы 4 [38], синтез Б-ДНКЖ-GSH был осуществлен следующим образом. К 10 мл 15 мМ HEPES-буфера при pH 7.4 последовательно добавлялись 20 или 15 мМ глутатиона, 10 мМ ферросульфата и 10 мМ нитрита натрия. Понижение pH раствора HEPES после добавления в него глутатиона (до pH 3.0–3.5) обеспечивало полное растворение добавляемого ферросульфата, а также полное превращение нитрита в GS-NO, образующийся в реакции протонированного нитрита с глутатионом. Об эффективности образования GS-NO можно было судить по кинетике нарастания полосы оптического поглощения этого соединения на длине волны 334 нм, а также по более слабой полосе на 546 нм с коэффициентами экстинкции, равными соответственно $0.94 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $0.017 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [38].

По окончании образования GS-NO, происшедшего в течение одного-полутора часов, pH

раствора был повышен до нейтральных значений (до pH 7.3–7.5) добавлением нескольких капель 100 мМ раствора NaOH, в результате чего розовая окраска раствора, характерная для GS-NO, сменялась в течение пяти-шести часов на темно-коричневую, характерную для образующегося Б-ДНКЖ-GSH.

Как следует из схемы 4, при равных концентрациях Fe^{2+} и GS-NO (10 мМ) последний полностью включался в Fe^{2+} -динитрозильный мотив Б-ДНКЖ, что существенно снижало риск загрязнения раствора нитритом, не включившимся в Б-ДНКЖ («свободным нитритом»). Что касается Fe^{2+} -ионов, то только 50% из них (5 из 10 мМ) включались при нейтральных значениях pH в образующиеся Б-ДНКЖ. Другая половина осаждалась в форме железогидроокисных комплексов, и ее можно было полностью удалить из раствора его пропусканием через бумажный фильтр. Полученные таким образом растворы Б-ДНКЖ-GSH замораживали в жидком азоте и хранили в холодильнике при -18°C с последующим размораживанием перед использованием в экспериментах.

Что касается глутатиона, содержание которого при синтезе Б-ДНКЖ в полтора или два раза превышает содержание железа, соответствующая его часть – 10 или 5 мМ – не включалась в Б-ДНКЖ, т.е. сохранялась в свободном состоянии. Количество тиола, включившегося в эти комплексы, бы-

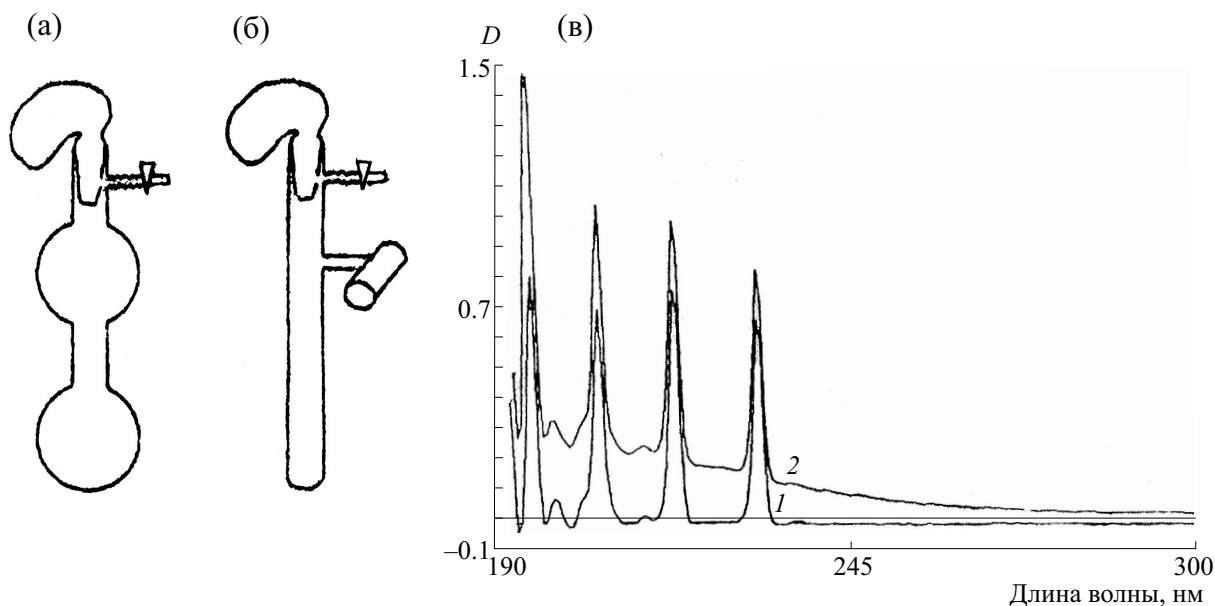


Рис. 3. Схемы модифицированных аппаратов Тунберга, использовавшихся для получения ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы (а) или для измерения оптического поглощения NO и NO₂ в газовой фазе (б); (в) — спектр оптического поглощения газообразного NO (четыре эквидистантных узких полосы, кривая 1) и суммарное оптическое поглощение газовой смеси NO + NO₂ (кривая 2).

ло равно в соответствии со схемой 4 количеству включенного в них железа.

Концентрация полученных Б-ДНКЖ-GSH была определена оптическим методом по интенсивности характерных для этих комплексов полос поглощения на 310 и 360 нм в спектре поглощения, приведенном на рис. 2, с коэффициентами экстинкции ϵ , равными соответственно 4600 и 3700 М⁻¹см⁻¹ (в пересчете на один атом железа) [17, 38]. Концентрация комплексов, полученных в этих условиях, составляла 4.5–5.0 мМ. Таким образом, при использовании 20 или 15 мМ глутатиона при синтезе Б-ДНКЖ-GSH отношение содержания свободного глутатиона к содержанию комплексов составляло соответственно 2 : 1 или 1 : 1.

Что касается моноядерной формы ДНКЖ-GSH, о ее наличии в растворе можно было судить по сигналу 2.03, приведенному на врезке на рис. 2, со следующими значениями g -фактора: $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$, $g_{cp} = 2.03$. Интенсивность этого сигнала при нейтральных значениях pH соответствовала включению в М-ДНКЖ не более 5% от общего содержания железа, включавшегося суммарно в обе формы ДНКЖ. При повышении до 10–11 pH раствора, в который при синтезе ДНКЖ вводили 20–30 мМ глутатиона, интенсивность сигнала 2.03 повышалась в 20–30 раз (рис. 2, врезка), так что все железо в растворе обнаруживалось в составе М-ДНКЖ. При этом

спектр поглощения раствора трансформировался и становился характерным для спектра М-ДНКЖ-GSH с полосой на 390 нм с $\epsilon = 4700$ М⁻¹см⁻¹ [17].

Аналогичным образом были синтезированы Б-ДНКЖ-NAC. Различие состояло лишь в том, что синтез S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина (S-NAC), необходимого для образования этих комплексов, заканчивался через 20–25 мин после добавления в соответствующий раствор нитрита, а синтез Б-ДНКЖ-NAC, начинавшийся после подщелачивания раствора S-NAC и ферросульфата, заканчивался через три-четыре часа. Соотношение NAC и железа, использованных при синтезе Б-ДНКЖ-NAC, составляло 3 : 1 (30 и 10 мМ) или 1.5 : 1 (15 и 10 мМ). Концентрация нитрита натрия составляла 10 мМ. Отношение содержания свободного NAC к содержанию комплексов, синтезированных при 30 и 15 мМ NAC и 10 мМ железа, составляло соответственно 4 : 1 и 1 : 1.

Синтез ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы. Синтез М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы — водой, фосфатом и этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) — проводили в модифицированном аппарате Тунберга, схема которого представлена на рис. 3а, в соответствии с описанным ранее подходом [17]. Процедура синтеза состояла в следующем. В верхнюю часть аппарата помещали 0.5 мл дистиллированной воды, а в нижнюю

часть — 4.5 мл 30 мМ НЕРЕС-буфера при рН 7.3–7.5 без каких-либо добавок или содержавшего 100 мМ фосфата или ЭДТА. После пяти-десяти-минутного выдерживания этой системы в вакууме, необходимого для удаления воздуха из воды, в верхнюю часть аппарата (в дистиллят) вводили ферросульфат железа, снова откачивали воздух из аппарата и затем вводили в него газообразный NO под давлением 100–150 мм рт. ст. на установке, описанной в работе [39]. При последующем пяти-десятиминутном встряхивании аппарата раствор ферросульфата в верхней его части приобретал зеленую окраску, обусловленную образованием монотирозильного комплекса Fe^{2+} ; далее этот раствор смешивался с раствором, помещенным в нижней части аппарата. После десятиминутного встряхивания аппарат откачивали от NO, а полученный раствор замораживали в жидком азоте для последующего изучения оптическими и ЭПР-методами.

Регистрация спектра оптического поглощения газообразного NO. Для регистрации спектра оптического поглощения газообразного NO, выделявшегося из Б-ДНКЖ-GSH при его распаде, использовали модифицированный аппарат Тунберга (схема представлена на рис. 3б), содержащий припаянную к нему кювету цилиндрической формы с кварцевыми торцевыми стенками. Аппарат помещали в спектрофотометр таким образом, чтобы световой луч в нем проходил вдоль оси кюветы. Характерный спектр регистрируемого при этом оптического поглощения газообразного NO и примесного газообразного NO₂ показаны на рис. 3в. Спектр поглощения газообразного NO характеризовался четырьмя эквидистантными узкими полосами поглощения в области 190–200 нм, тогда как газообразный NO₂ давал в этой области широкую бесструктурную полосу поглощения [38, 40]. Вакуумная сублимация смеси NO + NO₂ приводила в результате удаления NO₂ к полному исчезновению бесструктурного оптического поглощения этого газа.

Для оценки количества газообразного NO, высвобождавшегося из Б-ДНКЖ-GSH, использовали стандартный образец газообразного NO при давлении, определявшемся ртутным манометром на вакуумной установке, описанной нами в работе [39].

РЕЗУЛЬТАТЫ

S-Нитрозирующее действие Б-ДНКЖ-GSH и Б-ДНКЖ-НАС на включенные в них тиолсодержащие лиганды. Как указывалось во введении, образование GS-NO при распаде Б-ДНКЖ-GSH могло ослабляться в результате одноэлектронного восстановления катионов нитрозония молекулами глутатиона при участии ионов железа как ка-

тализаторов этого процесса. Естественно, что для проверки этой возможности необходимо было оценить эффективность образования GS-NO при прогреве подкисленных растворов Б-ДНКЖ-GSH в анаэробных условиях в зависимости от уровня свободного (не включенного в ДНКЖ) глутатиона в растворе. Ожидалось, что содержание GS-NO должно было повышаться по мере снижения этого уровня до минимального (нулевого) значения. Такая ситуация могла, очевидно, реализоваться, если при синтезе Б-ДНКЖ глутатион и железо вводили бы в равном количестве. Однако при таком соотношении глутатиона и ферросульфата оказалось невозможным синтезировать Б-ДНКЖ-GSH в концентрации, равной концентрации этих комплексов при использовании при их синтезе более высокого соотношения количества глутатиона и ферросульфата, например при соотношениях 2 : 1 или 3 : 1. Такое равенство удалось достигнуть только при соотношении глутатиона и ферросульфата при синтезе Б-ДНКЖ-GSH, равном 1.5 : 1.0, например при концентрациях глутатиона и ферросульфата, равных 15 и 10 мМ, и концентрации нитрита, равной 10 мМ. Судя по спектру оптического поглощения раствора полученных таким образом комплексов (рис. 4, кривая 2), их концентрация была близка к концентрации Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношении глутатиона и ферросульфата, равном 2 : 1, (рис. 4, кривая 1). В обоих случаях растворы перед их записью на спектрофотометре разбавляли в десять раз.

При последующем прогреве при 80°C в анаэробных условиях этих двух неразбавленных подкисленных растворов Б-ДНКЖ-GSH наблюдалось полное исчезновение исходных спектров поглощения и появление спектра поглощения, характерного для GS-NO (рис. 4, кривые 3–5), с интенсивной полосой на 334 нм и слабой полосой на 543 нм, о которых было сказано в методической части. При этом, судя по интенсивности этих полос, концентрация GS-NO, образующихся в растворах Б-ДНКЖ-GSH с низким содержанием глутатиона, соответствовала (в полном соответствии со схемой 3) включению в GS-NO поливинил нитрозильных лигандов, входивших в состав Б-ДНКЖ (рис. 4, кривые 4 и 5), что существенно превышало уровень GS-NO, возникших в растворах Б-ДНКЖ-GSH с более высоким содержанием глутатиона (рис. 4, кривая 3). Очевидно, именно последнее, в соответствии с высказанным выше предположением, обеспечивало превращение подавляющей катионов нитрозония не в GS-NO, а в NO так, как это могло иметь в наших ранних опытах [8, 13], о которых говорилось выше. При этом следует отметить небольшой сдвиг (на несколько нм) центра поглощения основной полосы GS-NO на рис. 4 с 334 нм в коротковолновую область. Этот сдвиг был

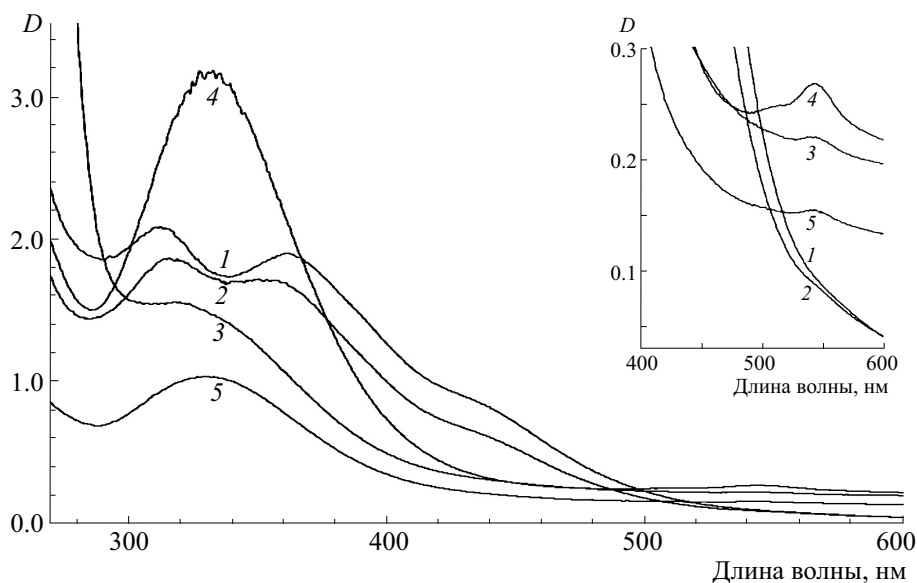


Рис. 4. Спектры поглощения растворов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношениях концентраций глутатиона и ферросульфата (нитрита), равных 2 : 1 (20 мМ и 10 мМ, кривая 1) или 1,5 : 1 (15 мМ и 10 мМ, кривая 2). Растворы разбавлены в десять раз. Кривые 3 и 4 – характерные для GS-NO спектры поглощения растворов тех же комплексов, подвергнутых нагреванию при 80°C в анаэробных условиях в течение восьми-деяти минут без разбавления растворов. Спектры характеризуются слегка сдвинутой в коротковолновую область полосой поглощения на 334 нм и слабой полосой на 543 нм. Кривая 5 – спектр поглощения раствора, характеризующегося кривой 4, после разбавления этого раствора в четыре раза. На врезке приведены спектры поглощения всех этих растворов, зарегистрированные при более высокой чувствительности спектрометра в области полосы поглощения GS-NO на 543 нм.

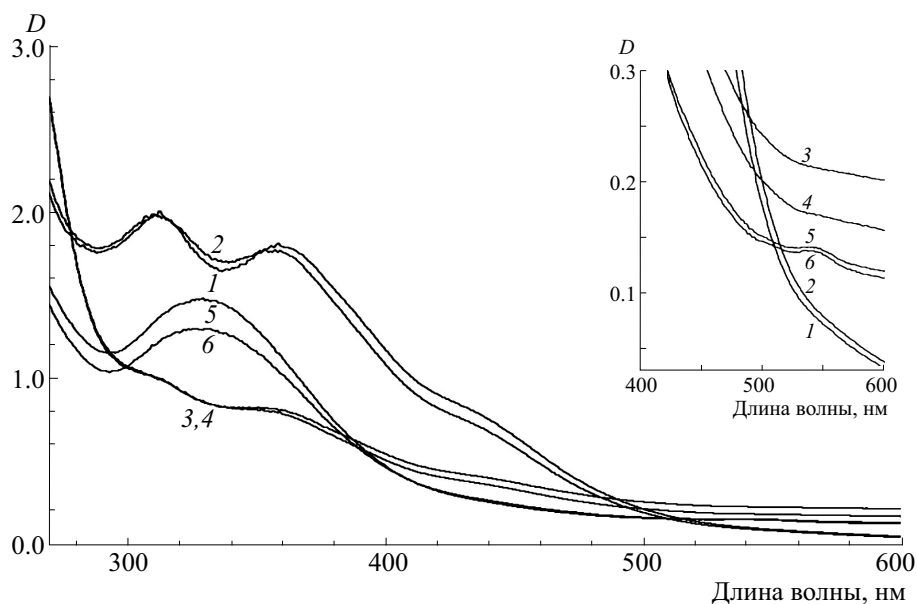


Рис. 5. Спектры поглощения растворов Б-ДНКЖ-NAC, синтезированных при соотношениях концентраций NAC и ферросульфата, равных 3 : 1 (30 мМ и 10 мМ, кривая 1) или 1,5 : 1 (15 мМ и 10 мМ, кривая 2). Растворы разбавлены в десять раз. Кривые 3, 4 и 5, 6 – соответственно спектры поглощения растворов тех же комплексов, разбавленных в два раза и подвергнутых нагреванию при 80°C в анаэробных условиях в течение семи-деяти или двух-трех минут. Спектры 5 и 6 с полосами поглощения на 334 и 543 нм обусловлены образующимся S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеином. На врезке приведены спектры поглощения всех этих растворов, зарегистрированные при более высокой чувствительности спектрометра в области полосы поглощения S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина на 543 нм.

обусловлен оптическим поглощением ионов Fe^{3+} , сохранявшихся в растворе после синтеза комплексов.

Такой же результат был получен в аналогичных опытах на растворах Б-ДНКЖ-НАС, синтезированных при соотношениях концентраций НАС : ферросульфат : нитрит натрия, равных соответственно 30 : 10 : 10 мМ и 15 : 10 : 10 мМ (рис. 5). В этих опытах прогрев раствора Б-ДНКЖ-НАС-комплексов, синтезированных при трехкратном избытке глутатиона по сравнению с концентрацией ферросульфата, приводил к восстановлению до NO всех катионов нитрозония, высвобождавшихся из Б-ДНКЖ-НАС при прогреве их подкисленных растворов в анаэробных условиях. Об этом свидетельствует отсутствие даже следовых количеств S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина в спектрах поглощения раствора, представленных кривыми 3 и 4.

Что касается количества S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина, образовавшегося при распаде Б-ДНКЖ-НАС, синтезированных при соотношении НАС : ферросульфат (нитрит), равным 1.5 : 1, оно составляло не более 30% от общего количества нитрозильных лигандов, входивших в состав Б-ДНКЖ-НАС. Не исключено, что образование S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина при распаде этих комплексов в анаэробных условиях частично подавлялось восстановительным действием НАС на катионы нитрозония даже при сравнительно малом содержании этого тиолсодержащего соединения. Как следует из вышеизложенного, такой эффект не обнаруживался при распаде аналогичных комплексов Б-ДНКЖ-GSH, сопровождаемемся включением в GS-NO половины нитрозильных лигандов в этих комплексах. Не исключено, что это различие было обусловлено более высокой восстановительной активностью НАС по сравнению с аналогичной характеристикой глутатиона.

При прогреве подкисленных 0.5 мМ растворов всех этих комплексов при 80°C на воздухе не обнаруживалось какого-либо различия в их поведении. Все они, судя по исчезновению окраски, распадались в течение 0.5–1.0 минуты с образованием соответствующих S-нитрозотиолов в концентрации, соответствующей включению в них половины нитрозильных лигандов (или равной концентрации комплексов, рассчитанной на один атом железа), как это было описано ранее в работах [8, 13].

Что касается возможного влияния примеси меди как агента, разрушающего S-нитрозотиолы и тем самым возможно блокировавшего появление GS-NO при распаде Б-ДНКЖ-GSH в анаэробных условиях, о чем было предположено в работах [8, 13], эксперименты с добавлением в разных концентрациях сильного хелатора

ионов меди – неокупроина [41], проведенные в настоящей работе, показали, что связывание примесной меди этим хелатором не влияло на появление соответствующих S-нитрозотиолов в растворах Б-ДНКЖ при их распаде.

Таким образом, есть основание полагать, что обнаруженное ранее в работах [8, 13] высвобождение нитрозильных лигандов из Б-ДНКЖ-GSH в подкисленных растворах, прогревавшихся при 80°C в анаэробных условиях, только в форме нейтральных молекул NO было обусловлено восстановительным действием глутатиона на высвобождающиеся из этих комплексов катионы нитрозония. Этот эффект мог сниматься в результате окисления избытка глутатиона в растворах Б-ДНКЖ-GSH кислородом при выдерживании этих растворов, что, по-видимому, имело место в наших экспериментах, описанных в работах [8, 13].

В связи с этим не исключено, что упоминавшееся выше образование S-нитрозотиолов при прогреве подкисленных 0.5 мМ растворов Б-ДНКЖ при 80°C на воздухе вне зависимости от соотношения тиолов и железа в растворах этих комплексов могло быть обусловлено быстрым окислением избытка тиолов кислородом воздуха в ходе повышения температуры растворов от комнатной температуры до 80С.

Образование нитрита при распаде Б-ДНКЖ-GSH в анаэробных условиях под действием феррицианида калия. В соответствии с предложенным на схеме 3 с механизмом распада ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, например, в результате блокады тиоловых групп соответствующими реагентами или их окисления, вместо S-нитрозотиолов в растворах Б-ДНКЖ должны были при нейтральных значениях pH накапливаться анионы нитрита, причем в количестве, равном в молярном выражении количеству высвобождающихся из Б-ДНКЖ нейтральных молекул NO. Такого рода опыты с окислением тиоловых групп в Б-ДНКЖ-GSH на воздухе показали, что действительно нитрит, появляющийся в растворе, в соответствии со схемой 3 включал в себя ровно половину нитрозильных лигандов, входивших в состав Б-ДНКЖ [8, 13]. Однако в экспериментах с блокадой тиоловых групп в этих комплексах параклормеркурийбензоатом в анаэробных условиях нитрит не обнаруживался, а оптическим методом регистрировался только газообразный NO в количестве, соответствующем включению в NO 75–80% нитрозильных лигандов Б-ДНКЖ [8, 13]. Было предположено, что нитрит в этих опытах возникал, однако подкисление растворов Б-ДНКЖ в ходе их распада приводило к его превращению в азотистую кислоту, реакция диспропорционирования которой приводила к накоплению в газовой фазе дополнительного количества NO

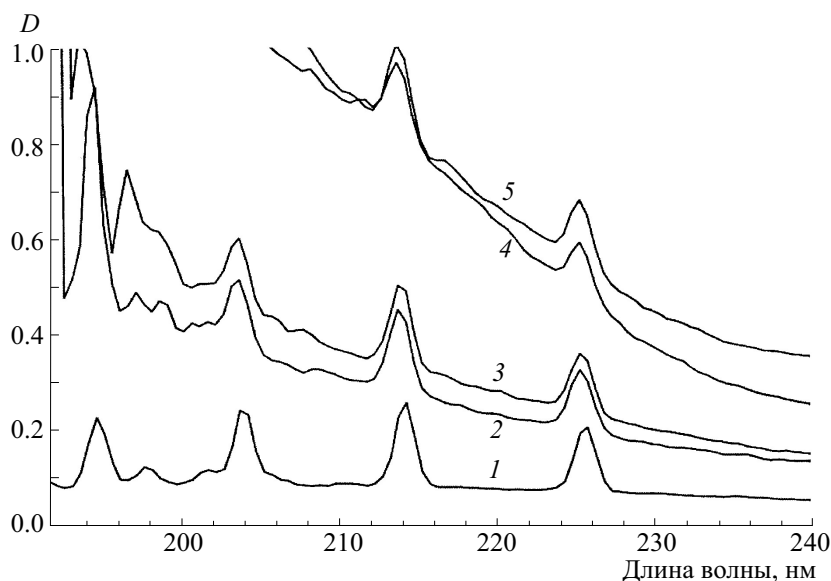


Рис. 6. Изменение оптического спектра NO в газовой фазе, зарегистрированного в модифицированном аппарате Тунберга, схема которого приведена на рис. 3б, в ходе распада 16 мл 8 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH в 200 мМ HEPES-буфере при pH 7.4, вызванного добавлением к раствору феррицианида калия (FeCN) в конечной концентрации 80 мМ с последующим подкислением раствора. Кривая 1 – спектр поглощения стандартного образца газообразного NO (125 микромолей в 100 мл свободного объема аппарата Тунберга). Кривые 2 и 3 – четыре эквидистантные полосы поглощения NO, зарегистрированные через 15 и 20 мин после добавления FeCN к раствору Б-ДНКЖ-GSH при pH 7.4, нагретому до 60°C, в откачанном аппарате Тунберга. Кривые 4 и 5 – первые две (из четырех) эквидистантных полос поглощения NO, зарегистрированные в повторно откачанном аппарате Тунберга через 15 и 20 мин после подкисления раствора серной кислотой. Дрейф нулевой линии в спектрах обусловлен загрязнением торцевых стенок цилиндрической кюветы аппарата Тунберга частицами берлинской лазури, образующейся в реакции FeCN с двухвалентным железом, высвобождающимся из Б-ДНКЖ.

(наряду с выделяющимся из распадающихся Б-ДНКЖ).

В связи с этим необходимо было показать, что распад Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в анаэробных условиях, вызванный удалением этих лигандов из координационной сферы железа, действительно при нейтральных значениях pH приводит к накоплению в растворе анионов нитрита, образующихся в результате гидролиза катионов нитрозония, высвобождающихся из Б-ДНКЖ. Такого рода результат был получен в настоящей работе при изучении распада Б-ДНКЖ-GSH, вызванного в анаэробных условиях окислением тиоловой группы в глутатионе феррицианидом калия (FeCN) (рис. 6). 16 мл 8 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH в 200 мМ HEPES-буфере при pH 7.4 помещали в модифицированный аппарат Тунберга (рис. 3б) с последующей откачкой воздуха из этого аппарата. Предполагалось, что высокая концентрация буфера в этом растворе должна была обеспечить сохранение нейтрального значения pH, которое могло снижаться в результате гидролиза катионов нитрозония, высвобождающихся из Б-ДНКЖ.

Сразу же после добавления FeCN (80 мМ) к раствору Б-ДНКЖ-GSH при 60°C в анаэробных условиях начиналось бурное выделение из рас-

твора газообразного NO, уровень которого в аппарате оценивали по его спектру поглощения, регистрируемому в цилиндрической кювете, присоединенной к аппарату. Через 20 мин этот уровень достигал плато, соответствующего высвобождению в форме NO половины нитрозильных лигандов, что было равно количеству Б-ДНКЖ-GSH в пересчете на один атом железа в этих комплексах – 128 микромолей в 100 мл свободного объема аппарата Тунберга, равного свободному объему этого аппарата после введения в него 16 мл раствора Б-ДНКЖ-GSH.

После этого газообразный NO, высвободившийся из Б-ДНКЖ, откачивали вакуумным насосом, затем в верхнюю часть аппарата после его открытия на воздухе вводили несколько капель концентрированной серной кислоты, которая смешивалась с оставшимся в нижней части аппарата раствором после откачки воздуха из аппарата. Предполагалось, что нитрит, который образовался в результате гидролиза катионов нитрозония, высвободившегося из Б-ДНКЖ в количестве, равном (в соответствии со схемой 3) половине нитрозильных лигандов в исходных Б-ДНКЖ-GSH, должен был после превращения нитрита в азотистую кислоту перейти в форме NO в газовую фазу и обеспечить появление соответ-

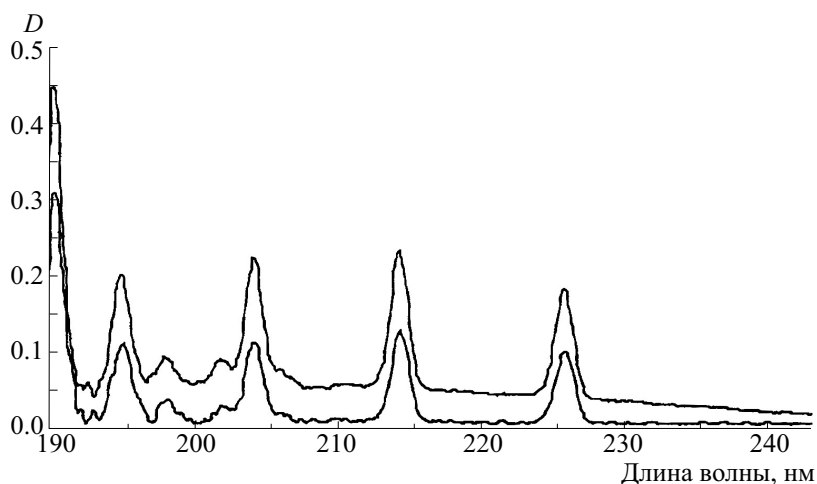


Рис. 7. Верхняя кривая – спектр поглощения газообразного NO, вышедшего из 15 мл 10 мМ раствора нитрита в течение 1 ч при 60°C после его подкисления до pH 2.0. Нижняя кривая – спектр поглощения стандартного образца газообразного NO (75 микромолей NO в 100 мл свободного объема аппарата Тунберга).

ствующих полос поглощения. Действительно, удалось зарегистрировать две первые длинноволновые полосы, интенсивность которых через 20 мин после подкисления раствора достигала плато. Зарегистрировать остальные две коротковолновые полосы поглощения NO было невозможно из-за сдвига нулевой линии вследствие загрязнения торцевых стенок цилиндрической кюветы аппарата Тунберга попадавшими на них частицами берлинской лазури, образующейся в реакции FeCN с высвобождавшимся из Б-ДНКЖ двухвалентным железом.

Количество NO, перешедшего из подкисленного нитрита в газовую фазу, оказалось равным ~90 микромолей на 100 мл свободного объема аппарата Тунберга, что соответствовало превращению в NO 70% нитрита, предположительно образовавшегося при распаде Б-ДНКЖ-GSH, вызванном FeCN. Эксперименты, поставленные с целью проверки эффективности превращения нитрита в NO в кислой среде, результаты которых приводятся на рис. 7, показали, что действительно примерно 70% нитрита превращаются в этих условиях в NO. Из 15 мл 10 мМ раствора нитрита натрия, т.е. из 150 микромолей нитрита, в анаэробных условиях при pH 2.0 высвобождалось примерно 100 микромолей NO – ~70% от 150 микромолей.

Эту величину легко получить из следующих расчетов. Протонизация 150 микромолей нитрита приводит к его превращению в 150 микромолей азотистой кислоты, которая в результате реакции диспропорционирования (реакция 3, представленная во введении) дает по 75 микромолей NO и NO₂. Далее пары молекул NO₂ в ходе гидролиза превращаются в равном количестве (37.5 микромолей) в молекулы азотистой и азотной кислот.

Затем из 37.5 микромолей азотистой кислоты снова образуются по ~18 микромолей NO и NO₂, и далее процесс повторяется по описанному выше пути, так что в его конце в газовой фазе должно накапливаться ~100 микромолей NO, или ~70% от исходного количества нитрита.

Таким образом результаты и этих экспериментов находятся в полном соответствии с механизмом распада Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, приведенным на схеме 3. Они показывают, что действительно в ходе этого процесса из этих комплексов могут высвобождаться катионы нитрозония в количестве, равном половине нитрозильных лигандов в этих комплексах или их концентрации в пересчете на один атом железа в этих комплексах. Сохранение этих катионов в условиях устранения тиолсодержащих лигандов (в результате окисления) показывает, что ионы Fe²⁺ сами по себе без участия тиолов не способны были восстанавливать катионы нитрозония.

Двухвалентное железо катализирует в анаэробных условиях превращение молекул NO в анионы нитрита. Вывод, сделанный в предыдущем разделе, подтверждается результатами исследований распада М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы со спином $S = 1/2$, существование которых было продемонстрировано еще в 1960-е годы уже в первом ЭПР-исследовании низкоспиновых М-ДНКЖ с различными анионными лигандами [42]. Последующие исследования, проведенные в 1980-е годы нашей группой, показали, что наряду с указанными низкоспиновыми М-ДНКЖ, характеризующимися сравнительно узкими сигналами ЭПР со значениями g -фактора в диапазоне 2.05–2.014 ($g_{\text{ср}} = 2.03$), в тех же растворах, исходно содержащих ионы Fe²⁺ и лиганды нетиоловой

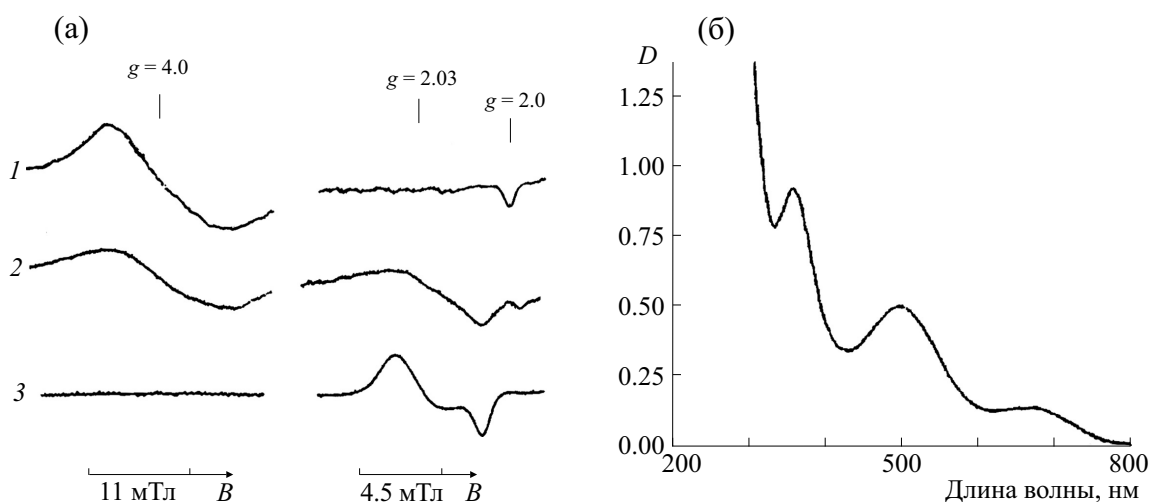


Рис. 8. (а) – Спектры ЭПР нитрозильных комплексов железа с ЭДТА (спектр 1), водой (спектр 2) и НАС (спектр 3), зарегистрированные при 77 К; (б) – спектры оптического поглощения, характерные для нитрозильных комплексов железа с ЭДТА или водой.

природы, такие как фосфат, цитрат или аскорбат, при их обработке газообразным NO возникают также высокоспиновые ($S = 3/2$) моонитрозильные комплексы железа (МНКЖ), характеризующиеся сравнительно широким сигналом ЭПР со значениями g -фактора в диапазоне 4.0–2.0 [43–45]. Такая же смесь низкоспиновых и высокоспиновых нитрозильных комплексов железа (соответственно ДНКЖ и МНКЖ) возникала при обработке оксидом азота чисто водных растворов Fe^{2+} , так что в этих комплексах в качестве лигандов выступали молекулы воды [43–45]

В настоящей работе были синтезированы нитрозильные комплексы железа с ЭДТА, водой и (для сравнения) с НАС, спектры ЭПР которых представлены на рис. 8а. На рис. 8б приведены спектры оптического поглощения, характерные для МНКЖ с лигандами нетиоловой природы, в нашем случае – для МНКЖ с ЭДТА или молекулами воды.

Синтез обоих типов нитрозильных комплексов железа – высокоспиновых МНКЖ и низкоспиновых ДНКЖ – проводили следующим образом. В нижнюю часть аппарата Гунберга, приведенного на рис. 3а, вводили в 4 мл воды ЭДТА (100 мМ) + НЕРЕС-буфер (30 мМ), только НЕРЕС-буфер (30 мМ) или 50 мМ НАС + НЕРЕС-буфер (30 мМ) – все при нейтральных значениях pH, а в верхнюю часть аппарата – 1 мл дистиллированной воды при pH 5.0–5.5. После откачки воздуха в верхнюю часть аппарата вводили сухой порошок $FeSO_4 \cdot H_2O$, так что его концентрация при последующем смешивании растворов в нижней и верхней частях аппарата составляла 20 мМ. После вторичной откачки воздуха в аппарат вводили газообразный NO и после пятиминутного

встряхивания аппарата, когда раствор железа в дистиллированной воде приобретал зеленую окраску, смешивали его с раствором в нижней части аппарата и после последующего пятиминутного встряхивания в присутствии NO аппарат откачивали с последующим быстрым замораживанием в жидком азоте полученного раствора в ампуле для ЭПР-исследований диаметром 4 мм.

В полном соответствии с результатами нашей предыдущей работы [43] в растворах Fe^{2+} с НЕРЕС-буфером были зарегистрированы сигналы ЭПР высокоспиновых МНКЖ и низкоспиновых ДНКЖ с молекулами воды в качестве лигандов (рис. 8а, спектр 2), тогда как растворах Fe^{2+} с ЭДТА или с НАС – сигналы ЭПР соответственно только высокоспиновых МНКЖ с ЭДТА, характеризующиеся значениями $g_{\perp} = 4.0$ и $g_{\parallel} = 2.0$, или низкоспиновых М-ДНКЖ с НАС, характеризующиеся значениями $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$ ($g_{cp} = 2.03$) (рис. 8а, спектры 1 и 3).

Следует отметить, что использование раствора Fe^{2+} в дистиллированной воде было обязательным для синтеза указанных комплексов, поскольку только в дистиллированной воде при pH 5.0–5.5 можно было полностью растворить соль двухвалентного железа. После контакта с NO ионы Fe^{2+} , связавшиеся с NO, могли включаться в водный раствор в нижней части аппарата, содержащий при нейтральных значениях pH ЭДТА, НЕРЕС или НАС с образованием соответствующих МНКЖ с ЭДТА или молекулами воды и М-ДНКЖ с водой или НАС.

В отличие от ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, как МНКЖ, так и М-ДНКЖ с молекулами воды в качестве лигандов сохранялись в вод-

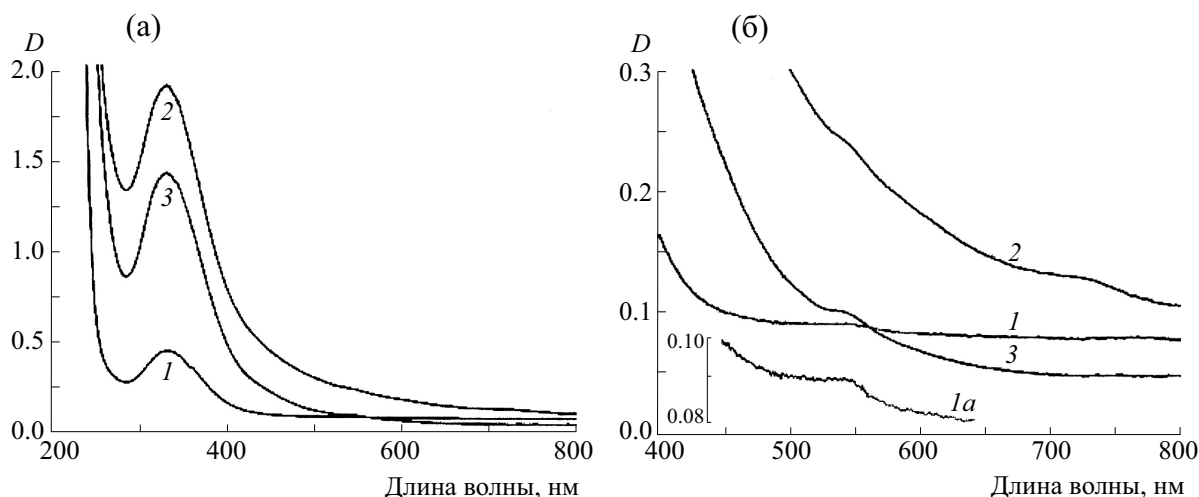


Рис. 9. Образование GS-NO как индикатора превращения оксида азота (NO) в анионы нитрита, появившегося при распаде М-ДНКЖ с молекулами воды. М-ДНКЖ были синтезированы путем обработки водных 30 мМ растворов НЕРЕС газообразным NO в присутствии 20 мМ ионов Fe^{2+} (кривые 2 и 3). Кривая 1 получена при такой же обработке растворов НЕРЕС, но без добавления к ним ионов Fe^{2+} . Приводятся зарегистрированная в указанных растворах полоса оптического поглощения GS-NO на 334 нм (а) и зарегистрированная при большей чувствительности спектрометра полоса на 543 нм (б). На врезке (кривая 1а) — увеличенный фрагмент кривой 1.

ных растворах при нейтральных значениях pH только в присутствии газообразного NO. При откачке последнего через 10–20 мин эти комплексы полностью распались, при этом высвобождавшиеся из них ионы Fe^{2+} выпадали из раствора в форме нерастворимых в воде гидроокисных комплексов, резко повышавших мутность раствора. Последнее устранялось подкислением получившихся суспензий до pH 1–2. Если после этого в полученные таким образом растворы сразу после их подкисления вводили тиолы, например глутатион в концентрации 50 мМ, в спектре оптического поглощения растворов появлялись полосы на 334 и 543 нм, характерные для GS-NO (рис. 9). Характерно, что при этом по мере растворения гидроокисных осадков железа из-за ослабления интенсивности светорассеяния растворов базовая линия снижалась практически до нуля (рис. 9, кривые 2 и 3).

Появление полос поглощения GS-NO, очевидно, было обусловлено S-нитрозированием глутатиона молекулами азотистой кислоты, образующейся при подкислении нитрита, который в соответствии со схемой 3 должен был возникать при распаде М-ДНКЖ с молекулами воды, как лигандами нетиоловой природы. Что касается возможности S-нитрозирования глутатиона высокоспиновыми МНКЖ с молекулами воды, одна из резонансных структур которых описывается как Fe^+NO^+ и могла бы выступать в качестве донора катиона нитрозония, такая возможность для указанных комплексов не реализуется. В пользу этого свидетельствует факт отсутствия S-нитрозирующей активности у нитрозильных комплек-

сов железа с ЭДТА. Эти комплексы существуют только в форме высокоспиновых МНКЖ, не образуя (как это следует из рис. 8) их динитрозильных аналогов

Образование GS-NO в водных растворах, обработанных газообразным NO, наблюдалось и в отсутствие экзогенных ионов Fe^{2+} в этих растворах (рис. 9, кривая 1). Этот процесс был обусловлен наличием в газообразном NO примеси NO_2 . Его уровень существенно снижался при очистке NO от примеси NO_2 методом низкотемпературной сублимации в вакуумированном сосуде.

Эксперименты, проведенные на растворах нитрозильных комплексов железа с фосфатом, представленных, как и ДНКЖ с молекулами воды, высокоспиновыми МНКЖ и низкоспиновыми М-ДНКЖ, показали, что распад последних также (в соответствии со схемой 3) сопровождается высвобождением нитрита, образующим GS-NO при подкислении растворов нитрита с последующим добавлением к ним глутатиона (данные не приводятся).

Таким образом, включение молекул NO в М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы в качестве нитрозильных лигандов может обеспечить превращение половины из них в катионы нитрозония. Высвобождаясь из комплексов, эти катионы превращаются в результате гидролиза при нейтральных значениях pH в анионы нитрита.

ОБСУЖДЕНИЕ

Способность ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами высвобождать при распаде нейтральные молекулы NO и катионы нитрозония делает возможной их регенерацию по двум путям, приводимым на схеме 6 – в реакции Fe^{2+} , газообразного NO и тиолов (реакции 1) и реакции Fe^{2+} , S-нитрозотиолов (RS-NO) и тиолов (реакции 2). Эти реакции, в соответствии с их механизмами, указанными на схемах 2 и 4, необратимы из-за превращения NO и тиолов соответственно в закись азота и дисульфида. Это превращение можно рассматривать в качестве «сгорания» основных «топливных компонентов системы», показанной на схеме 6 – NO и тиолов, обеспечивающих при

воспроизводстве этих агентов существование указанной системы как самоподдерживающейся, саморегулирующейся системы реакций 1 и 2, реакций химического равновесия, устанавливающихся между М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ, а также между ними и составляющими их компонентами. Так, в зависимости от соотношения уровней NO и RS-NO в этой системе может попеременно доминировать либо реакция 1, либо реакция 2. По мере расходования NO в реакции 1 и накопления RS-NO синтез М-ДНКЖ начинает протекать по реакции 2 и, наоборот, по мере расходования RS-NO и накопления NO снова начинает доминировать реакция 1.

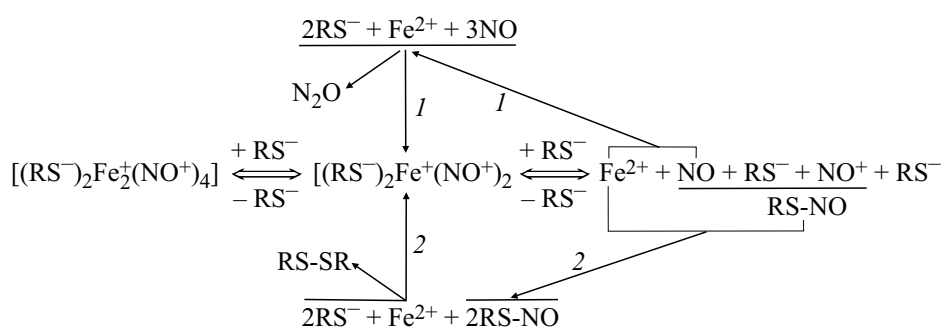


Схема 6. Саморегулирующаяся система реакций химического равновесия, устанавливающихся между М- и Б-ДНКЖ, а также между ними и составляющими их компонентами.

Таким образом, для этой системы не исключается колебательный режим ее существования и более того появление автоволн, о чем свидетельствуют результаты наших исследований, опубликованных в работах [19, 46].

Самоподдерживающийся, саморегулирующийся режим существования системы, приведенной на схеме 6, вполне возможен в живых организмах, в которых может поддерживаться на стационарном уровне концентрация «топливных» компонентов указанной системы – NO и тиолов. В отсутствие такого воспроизводства эта система перестает функционировать, но может снова начать работать при возобновлении ее снабжения NO или тиолами, причем этот процесс может развиваться по следующим сценариям. При блокаде поставки NO указанная система должна сразу же останавливаться, и ее последующая реконструкция, а именно возобновление в ней соответствующих реакций, может начаться сразу после начала снабжения системы газообразным NO. При замедлении снабжения системы тиолами, вызванном, например, их окислением или блокадой тиоловыми реагентами, катионы нитрозония должны вместо реакции S-нитрозирирования включаться в реакцию гидролиза, приводящую к превращению катионов нитрозония при ней-

тральных значениях pH в нитрит-анионы – конечный продукт распада рассматриваемой системы, что и наблюдалось в эксперименте (рис. 6). При нейтральных значениях pH этот процесс был необратимым, поскольку при этих pH нитрит сам по себе не мог инициировать образования ДНКЖ. В этом случае рассматриваемую систему можно было реконструировать только при добавлении в нее тиолов с последующим их превращением в S-нитрозотиолы в реакции с нитритом в кислой среде. Последующее повышение pH до нейтральных значений в присутствии ионов Fe^{2+} должно было (по реакции 2 на схеме 6) обеспечить образование М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ.

Как показали наши предыдущие исследования [8, 13] и исследования, изложенные в настоящей работе, распад химической системы, приведенной на схеме 6, можно было инициировать протонированием тиолсодержащих лигандов в Б-ДНКЖ, обеспечивающим разрыв связи между ионами железа и атомами тиоловой серы в этих комплексах. Этот процесс усиливался при подогреве их кислотных растворов. Высвобождающиеся при этом протонированные тиолы могли связываться с катионами нитрозония и образовывать с ними S-нитрозотиолы, что наблюдалось

как в прошлых исследованиях [8, 13], так и в настоящей работе (рис. 5 и 6). Вместе с тем, как показал эксперимент, протонированные тиолы были не способны связываться с ионами Fe^{2+} и тем самым обеспечивать при участии S-нитрозотиолов образование в кислой среде соответствующих ДНКЖ. Это и приводило к обнаруживаемому накоплению в этой среде S-нитрозотиолов в количестве, равном половине нитрозильных лигандов, имевшихся в исходных Б-ДНКЖ.

Предложенный механизм образования М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами основывается на предположении о возможности реакции диспропорционирования молекул NO при их связывании с ионами Fe^{2+} (схемы 1 и 2). Такая возможность обсуждается и другими авторами [47–49], но в отличие от механизма, описанного в данной работе, они объясняют, исходя этого предположения, образование при распаде ДНКЖ только диоксида и закиси азота (NO_2 и N_2O) как результата гидролиза образующихся при диспропорционировании двух молекул NO – катиона нитрозония и аниона нитроксила. Что касается направления наших исследований, они касаются изучения возможности образования в ходе этих процессов S-нитрозотиолов, т.е. реакции, способной успешно конкурировать с реакцией гидролиза катионов нитрозония. В этом отношении основной результат настоящей работы состоит в том, что образование S-нитрозотиолов при распаде М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами может существенно затрудняться из-за восстановления катионов нитрозония тиолами при посредстве ионов железа как катализаторов этого процесса.

Следует отметить, что предположение о роли реакции диспропорционирования молекул NO в процессе образования ДНКЖ восходит (в соответствии с информацией, приводимой в работах [50, 51]) еще к пионерским работам Джозефа Пристли – великого английского ученого, открывшего в XVIII веке не только азот, но и монооксид азота, а также реакцию последнего с железом, приводящей как к образованию железонитрозильных комплексов, так и к реализации реакции диспропорционирования молекул NO до закиси и диоксида азота.

В последнее время был предложен другой механизм образования М и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в водных растворах в ходе реакции ионов Fe^{2+} , тиолов и газообразного NO [52, 53]. Авторы этих работ полагают, что парамагнетизм возникающих при этом М-ДНКЖ на первой стадии их образования обеспечивается одноэлектронным восстановлением мононитрозильной ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO} \leftrightarrow \text{Fe}^+\text{-NO}^+$) группы одним из тиолсодержащих соединений, участвующих в об-

разовании указанных комплексов. В результате электронная конфигурация железа в этой группе переходит из d^7 - в d^8 -конфигурацию, а при последующем связывании с железом второй молекулы NO и тиолсодержащей молекулы, приводящем к окончательному образованию М-ДНКЖ, железодинитрозильная группа в этих комплексах начинает характеризоваться d^9 -электронной конфигурацией железа или, как представлено в работе [54], структурой $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}^9$. В качестве экспериментального факта, подтверждающего вышеизложенное предположение о механизме образования парамагнитных М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, авторы работы [53] указывают на обнаруженное ими появление в растворе синтезируемых комплексов тиольного радикала (RS^\cdot), образующегося в результате одноэлектронного окисления тиола железомононитрозильной (Fe-NO) группой.

Вывод о локализации на d -орбиталях железодинитрозильной группы в М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами девяти электронов находится в полном соответствии с представлениями многих исследователей этих комплексов, основанными на результатах рентгеноструктурных кристаллографических исследований М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [55–60]. Поскольку, согласно этим исследованиям, железодинитрозильная группа, включая атомы тиоловой серы, характеризуется в кристаллическом состоянии тетраэдрической пространственной структурой, то парамагнетизм монокристаллической формы ДНКЖ с $S = \frac{1}{2}$ может обеспечиваться локализацией на верхних t_{2g} (d_{xz} , d_{yz} и d_{xy}) орбиталях пяти электронов (девять электронов суммарно на всех d -орбиталях). При этом предполагается, что при растворении ДНКЖ указанная тетраэдрическая пространственная структура этих комплексов и соответствующая ей электронная структура полностью сохраняется, что полностью согласуется с выводами авторов работы [53] о d^9 -электронной конфигурации железа в ДНКЖ, синтезируемых в растворе.

Таким образом в настоящее время существуют два взаимоисключающих представления об электронной структуре ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, характеризующейся либо d^9 -, либо d^7 -электронной конфигурацией железа в железодинитрозильных фрагментах этих комплексов. Вопрос о справедливости какого-либо из этих представлений остается открытым. Единственное, что позволяет, по мнению автора настоящей работы, отдать предпочтение d^7 -конфигурации – это то, что в ее рамках легко объяснить на основе схемы 3 способность М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ выступать в качестве доноров не только нейтраль-

ных, газовых молекул NO, но и катионов нитрозония, превращающихся либо в S-нитрозотиолы, либо в анионы нитрита.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность В.Д. Микояну за регистрацию спектров ЭПР (рис. 8), Р.Р. Бородину — за регистрацию спектров оптического поглощения (рис. 6 и 7) и Н.А. Ткачеву — за компьютерную обработку рис. 4, 5 и 9.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Российского Федерального Агенства для научных организаций (00008202014-00016, № АААА-А17-117040610310-6, 0082-2014-0008 и № АААА-А17-1170403100008-5, спонсирована Российским академическим проектом «5-100», а также финансирована в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-04-00059а.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. J. Ignarro, *Nitric Oxide Biology and Pharmacology* (Acad. Press, Zurich, Switzerland, 2000).
2. N. Hogg, *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 1478 (2000).
3. B. M. Gaston, J. Carver, A. Doctor, et al., *Mol. Intervention* **3**, 253 (2003).
4. D. Seth, D. T. Hess, A. Hausladen, et al., *Mol. Cell* **89**, 451 (2018).
5. D. A. Wink, R. W. Nims, J. F. Darbyshir, et al., *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 525 (1994).
6. V. G. Khatitonov, A. R. Sandquist, and V. S. Sharma, *J. Biol. Chem.* **270**, 28158 (1995).
7. N. S. Bryan, T. Rassaf, R. E. Maloney, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 438 (2004).
8. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmac. Chem.* **5** (4), id1109 (2018).
9. C.A. Bosworth, J.C. Toledo, J.W. Zmiewski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4671 (2009).
10. M. V. Foster, L. Liu, M. Zeng, et al., *Biochem.* **48**, 792 (2009).
11. T. P. Melia, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **27**, 95 (1965).
12. S. F. Agnew, B. I. Spansou, L. H. Jones, et al., *J. Phys. Chem.* **89**, 1678 (1985).
13. A. F. Vanin, *Cell. Biochem. Biophys.* **77**, 279 (2019).
14. Q. Liu, K. Yu, P. Yi, et al., *Environment. Sci. Pollution Res.* **28**, 19540 (2019).
15. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1 (2009).
16. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.* **14**, 818836 (2011).
17. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 136 (2010).
18. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **54**, 15 (2018).
19. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms*, (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
20. Р. М. Налбандян, А. Ф. Ванин и Л. А. Блюменфельд, в сб. *Тезисы конференции «Свободнорадикальные процессы в биологических системах»* (1964), с. 18.
21. А. Ф. Ванин и Р. М. Налбандян, *Биофизика* **10**, 167 (1965).
22. А. Ф. Ванин, Л. А. Блюменфельд и А. Г. Четвериков, *Биофизика* **12**, 829 (1967).
23. J. R. Mallard and M. Kent, *Nature* **204**, 1192 (1964).
24. A. J. Vithaythil, B. Ternberg, and B. Commoner, *Nature* **207**, 1246 (1965).
25. J. R. Lancaster and J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1223 (1990).
26. C. Pellat, Y. Henry, and J.-C. Drapier, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **166**, 119 (1990).
27. J.-C. Drapier, C. Pellat, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.* **266**, 10162 (1991).
28. M. Lepoivre, J.-M. Flavan, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.* **267**, 22294 (1992).
29. A. F. Vanin, P. I. Mordvintsev, S. Hauschildt, et al., *Biochem. Biophys. Acta* **1177**, 37 (1993).
30. J. Stadler, H. A. Bergonia, M. DiSilvio, et al., *Arch. Biochim. Biophys.* **302**, 4 (1993).
31. A. K. Nussler, D. A. Geller, M. A. Sweetland, et al., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **194**, 826 (1993).
32. Y.-L. Geng, A.-D. Petersson, A. Wennmalm, et al., *Exp. Cell Res.* **214**, 418 (1994).
33. N. R. Bastian, C.-Y. Yim, J. B. Hibbs, et al., *J. Biol. Chem.* **269**, 5127 (1994).
34. K. Odoi, T. Akaike, H. Horie, et al., *Cancer* **77**, 1598 (1996).
35. B. Muller, A. Kleschyov, and J.-C. Stoclet, *Br. J. Pharmacol.* **119**, 1281 (1996).
36. R. N. Watts, C. Hawkins, P. Ponka, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 7670 (2006).

37. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **1**, 1991 (1997).
38. R. R. Borodulin, L.N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **29**, 4 (2013).
39. A. F. Vanin, R. R. Borodulin, and V. D. Mikoyan, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **66**, 1 (2017).
40. J. Lique and D. R. Grosley, *J. Chem. Phys.* **111**, 7405 (1999).
41. A. P. Dicks, P. Herves Beloso, D. Lyn, and H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 1429 (1997).
42. C. C. MacDonald, W. D. Philips, and H. F. Mower, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3319 (1965).
43. A. F. Vanin and D. I. Aliev, *Studia Biophysica* **93**, 63 (1983).
44. A. Wanat, T. Schnepfensieper, G. Stochel, et al., *Inorg. Chem.* **41**, 4 (2002).
45. A. In-lam, M. Wolf, C. Wilfer, et al., *Chem. Eur.* **25**, 1304 (2019).
46. A. F. Vanin, V. D. Mikoyan, N. M. Rubtsov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 175 (2010).
47. P. C. Ford and I. M. Lorcovic, *Chem. Rev.* **102**, 993 (2002).
48. S. Stojanovic, D. Stanic, M. Nolic, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **11**, 256 (2004).
49. C. K. Brozek, J. T. Miller, S. A. Stoian, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 7495 (2015).
50. E. W. Ainscough and A. M. Brodie, *J. Chem. Educ.* **72**, 686 (1995).
51. D. Michael and P. Mingos, *Struct. Bond.* **153**, 1 (2014).
52. J. C. M. Pereira, A. V. Iretskii, R.-M. Han, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 328 (2015).
53. D. R. Truzzi, O. Augusto, P. C. Ford, *Chem. Comm.* **55**, 9156 (2019).
54. J. H. Enemark and R. D. Feltham, *Coordination Chem. Rev.* **13**, 339 (1974).
55. T. C. Harrop, Z. J. Tonzetch, E. Reisner, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15602 (2008).
56. A. F. Shestakov, Yu. M. Shul'ga, N. S. Emel'yanova, et al., *Rus. Chem. Bull.* **56**, 1289 (2009).
57. R. Polukkody and M. Y. Darensbourg, *Acc. Chem. Res.* **48**, 2049 (2015).
58. J. Fitzpatrick and E. Kim, *Acc. Chem. Res.* **48**, 2453 (2015).
59. T.-T. Lu, Y.-M. Wang, C.-H. Hung, et al., *Inorg. Chem.* **57**, 12425 (2018).
60. S.-L. Cho, C.-J. Liao, and T.-T. Lu, *J. Biol. Inorg. Chem.* **24**, 495 (2019).

Free Radical Nature of Nitric Oxide Molecules as a Determinant of Their Transformation into Nitrosonium Cations in Living Systems

A.F. Vanin

Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation, Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia

The paper presents novel results that confirm our previous conclusion that the binuclear form of biologically active dinitrosyl iron complexes (B-DNIC) with thiol-containing ligands (glutathione or N-acetyl-L-cysteine) may act as a donor of nitrosonium cations which are responsible for S-nitrosothiol formation during B-DNIC decomposition in acid solutions under aerobic/anaerobic conditions. The presence of nitrosonium cations within the composition of B-DNIC is determined by a disproportionation reaction between free radical NO molecules while binding to Fe²⁺ cations (two molecules for one ion) during B-DNIC synthesis. When thiol-containing ligands are oxidized in DNIC or inhibited by thiol-specific reagents released during decomposition of these DNIC at neutral pH values, nitrosonium cations undergo hydrolysis followed by transformation into nitrite anions. Similar transformation occurs when mononuclear DNIC (M-DNIC) with non-thiol ligands are decomposed at neutral pH values. It was found that S-nitrosothiol formation in the decomposition process of B-DNIC with thiol-containing ligands at acid pH values can be prevented in the presence of free thiol molecules (not present within the composition of B-DNIC) in two-threefold excess with regard to the content of B-DNIC. This inhibition is due to reduction of nitrosonium cations to NO molecules induced by free thiol molecules with participation of iron ions as catalytic agents. Therefore, both forms of DNIC (M- and B-DNIC) which form in living systems can act not only as the donors of nitric oxide recognized now as one of universal regulators of metabolic processes but also as the donors of nitrosonium cations that initiate the S-nitrosation process of low- and high-molecular (protein-bound) thiols.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, NO, S-nitrosothiols, EPR