

УДК 577.3

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ ИЗ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА ПРИ ИХ РАСПАДЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНИОНОВ СУПЕРОКСИДА ИЛИ ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРААЦЕТАТА

© 2022 г. А.Ф. Ванин*, #, В.Д. Микоян*, Н.А. Ткачев*

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

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

Поступила в редакцию 14.09.2022 г.

После доработки 14.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

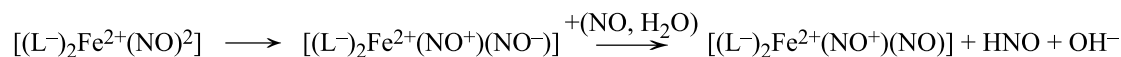
Оптическим методом продемонстрирован полный распад биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом под действием стократного избытка анионов супероксида калия (KO_2) или ЭДТА. В соответствии с резонансной структурой $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}_2(\text{NO}^+)_2(\text{NO})_2]$, характерной для этих комплексов, их распад, вызванный взаимодействием супероксида с тиоловыми и NO -компонентами комплексов, приводил к высвобождению в раствор катионов нитрозония (NO^+), превращавшихся в результате гидролиза в анионы нитрита, в количестве, равном половине нитрозильных (NO^+ , NO) лигандов в комплексах. При распаде этих комплексов, вызванном ЭДТА как хелатором железа, высвобождавшиеся катионы NO^+ не гидролизировались, а связывались с третичными аминами в ЭДТА. При этом биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом трансформировались в высокоспиновые ($S = 3/2$) моонитрозильные комплексы, регистрируемые методом ЭПР. Полученные результаты полностью согласуются с представлениями о динитрозильных комплексах железа с тиолсодержащими лигандами, как соединениях, способных в живых организмах выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO , так и катионов нитрозония.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, оксид азота, катионы нитрозония, анионы супероксида, нитрит.

DOI: 10.31857/S0006302922060011, EDN: LITINT

В наших предыдущих исследованиях мы показали, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) при их разрушении способны высвобождать катионы нитрозония (NO^+), образующие с присутствующими тиолами S-нитрозотиолы, а в их отсутствие — гидролизующиеся (в реакции с анионами гидроксила) до анионов нитрита [1–8]. Эта способность ДНКЖ определяется существованием железо-ди-

нитрозильных фрагментов (ЖДНФ) этих комплексов в одной из их резонансных структур, описываемой как $\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})$. Такая структура возникает в результате реакции диспропорционирования двух молекул NO , связывающихся с катионом двухвалентного железа, с последующим протонированием образующегося аниона нитроксила и его выходом из лигандного окружения железа (см. схему [2, 9]):



Включение вместо аниона нитроксила третьей молекулы NO и приводит к образованию указанной выше резонансной структуры ЖДНФ. В соответствии с ней резонансные структуры моно- и би-

ядерных форм ДНКЖ (М- и Б-ДНКЖ), включающие в себя различные анионные (L^-) лиганды, могут быть представлены соответственно как $[(\text{L}^-)_2\text{Fe}^{2+}-(\text{NO}^+)(\text{NO})]$ и $[(\text{L}^-)_2\text{Fe}^{2+}_2(\text{NO}^+)_2(\text{NO})_2]$.

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, ЖДНФ — железо-динитрозильные фрагменты, М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ — моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа, МНКЖ — моонитрозильные комплексы железа, Б-ДНКЖ-GSH — биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, GS-NO — S-нитрозоглутатион.

При включении в ДНКЖ в качестве анионных лигандов соединений, не содержащих тиоловых групп, комплексы становятся неустойчивыми из-за гидролиза катионов нитрозония, входящих в состав этих комплексов. Потеряв эти катионы, М- и Б-ДНКЖ превращаются в моонитрозильные комплексы железа (МНКЖ) (формула $[(L^-)_2Fe^{2+}-(NO)]$). Что касается высвобождающихся катионов нитрозония, они переходят в раствор, где гидролизуются до анионов нитрита (при сохранении нейтральных значений pH).

Иная ситуация реализуется для ДНКЖ при включении в них тиолсодержащих анионных (RS^-) лигандов, характеризующихся в отличие от других лигандов высокой электрон-донорной активностью. Перенос электронной плотности с атомов серы на катионы нитрозония приводит к нейтрализации положительного заряда на этих лигандах и тем самым к подавлению их гидролиза (взаимодействия катионов нитрозония с анионом гидроксила) [3, 5–9]. В результате резко повышается стабильность ДНКЖ, что и обеспечивает функциональную активность этих комплексов в живых организмах как доноров нейтральных молекул NO и катионов нитрозония (NO^+). Соответственно, при удалении тиолсодержащих лигандов из ДНКЖ в результате окисления их тиоловых групп или их блокаде тиоловыми реагентами ДНКЖ начинают распадаться с высвобождением катионов нитрозония, гидролизующихся до нитрита [5–8].

Что касается образования S-нитрозотиолов в ходе распада ДНКЖ, такого рода процесс наблюдался нами только при кислотной обработке этих комплексов. В этих условиях ДНКЖ распались из-за протонирования тиолов, с последующим их выходом из лигандного окружения железа и связыванием с катионами нитрозония, высвобождающимися из ДНКЖ [5–8].

Во всех этих опытах количество катионов нитрозония, высвобождавшихся из ДНКЖ, было в точности равно количеству железа в составе этих комплексов. Таким образом, поскольку каждый атом железа в ЖДНФ связан с двумя нитрозильными лигандами, можно было утверждать, что при распаде фрагментов половина этих лигандов должна высвобождаться в форме катионов нитрозония, а другая половина – в форме нейтральных молекул NO, что находится в полном соответствии с вышеприведенной резонансной структурой ЖДНФ в моно- и биядерной формах ДНКЖ.

В настоящей работе мы проверили, сохраняется ли эта закономерность для Б-ДНКЖ с одним из типичных представителей тиолсодержащих лигандов – глутатионом при распаде этих комплексов под действием анионов супероксида, ре-

агирующих в составе ДНКЖ с молекулами NO [10], или под действием одного из достаточно сильных хелаторов переходных металлов – анионов этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), способных, как мы предполагали, замещать при избыточной концентрации молекулы глутатиона в биядерных динитрозильных комплексах железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) с последующей (в соответствии с вышесказанным) трансформацией последних в МНКЖ с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК). Предполагалось, что при обоих воздействиях из распадающихся Б-ДНКЖ-GSH могли бы высвободиться катионы нитрозония, связывающиеся с тиоловой группой глутатиона с образованием S-нитрозоглутатиона (GS-NO).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали ферросульфат ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Швейцария), глутатион, надпероксид (диоксид) калия (KO_2), нитрит натрия и этилендиаминтетраацетат калия (ЭДТА) (Sigma, США). Газообразный NO получали в реакции ферросульфата с нитритом натрия в 0.1 M HCl с последующей очисткой NO методом низкотемпературной сублимации [11].

Синтез биядерных ДНКЖ с глутатионом. Комплексы синтезировали обработкой газообразным NO (при давлении 100 мм рт. ст.) 1 мл раствора ферросульфата в дистиллированной воде и 4 мл 10 mM раствора глутатиона в 15 mM HEPES-буфере (pH 7.4), помещенных соответственно в верхнюю и нижнюю части аппарата Тунберга, с последующим пятиминутным встряхиванием аппарата и смешиванием этих растворов в присутствии NO, как это описано в работе [11]. Концентрация ферросульфата в этой смеси составляла 5 mM. После последующего пятиминутного встряхивания смеси, приводившей к включению всего железа в Б-ДНКЖ-GSH, NO удаляли откачкой, раствор полученного комплекса замораживали и использовали после разморозки в экспериментах.

Концентрацию Б-ДНКЖ-GSH оценивали по интенсивности одной из полос его оптического поглощения (на 360 нм) с коэффициентом поглощения (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ, равным $3700 M^{-1}cm^{-1}$) [11].

Оптические и ЭПР-измерения. Оптические измерения растворов проводили при комнатной температуре на спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu, Europa GmbH, Германия), используя плоскую кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм. ЭПР измерения проводили при 77 K на модифицированном ЭПР-спектрометре RadioPan (Польша) при мощности СВЧ 5 мВт и ам-

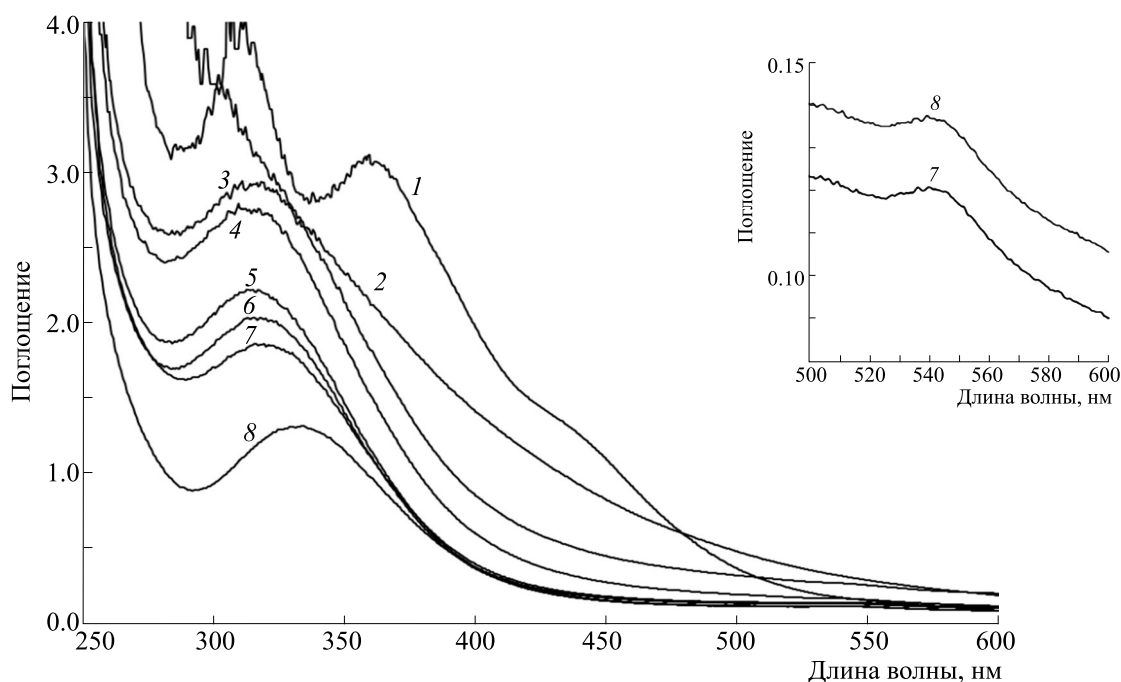


Рис. 1. Эволюция спектра поглощения 0.9 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (кривая 1) после добавления к нему в качестве донора O_2^- 100 мМ KO_2 (кривая 2) с последующим добавлением в раствор 100 мМ GSH и серной кислоты – кривые 3–8, запись соответственно через 1, 5, 30, 45, 60 и 90 мин после добавления GSH в диапазоне значений оптического поглощения $D = 0–4.0$. Врезка – кривые 7 и 8, записанные в диапазоне 500–600 нм и $D = 0–0.14$.

плитуде высокочастотной модуляции магнитного поля 0.2 мТл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Действие супероксида на Б-ДНКЖ-GSH. Введение в 0.9 мМ раствор Б-ДНКЖ-GSH в 15 мМ HEPES-буфере порошка KO_2 в конечной концентрации 100 мМ приводило к резкому повышению рН раствора – с 7.5 до 11 и, судя по быстрому исчезновению спектра поглощения этого комплекса (рис. 1, кривая 1), к его практически мгновенному распаду. Вместо исходного спектра регистрировалось монотонно возрастающее при переходе к коротковолновой области оптическое поглощение (рис. 1, кривая 2), обусловленное, очевидно, в основном комплексами трехвалентного железа, высвободившегося из распавшихся ДНКЖ и включившегося при щелочных рН в полимерные гидроокисные комплексы. При последующем добавлении в раствор глутатиона в концентрации 100 мМ и серной кислоты, снижавших рН раствора до 1.0–1.5, в растворе сразу же регистрировалась полоса поглощения на 315 нм, приведенная на рис. 1 (кривая 3). При выдерживании этого раствора на воздухе при комнатной температуре максимум этой полосы по мере снижения поглощения гидроокисных комплексов железа сдвигался за 1.5 ч к 334 нм (рис. 1, кривые 4–8).

Этот сдвиг заканчивался формированием полосы поглощения на этой длине волны (кривая 8 на рис. 1) и слабой полосы на 543 нм (рис. 1, врезка) – полос, характерных для оптического поглощения S-нитрозотиолов [4]. Таким образом, обработка продукта распада Б-ДНКЖ-GSH избытком глутатиона в сильно кислой среде вела к образованию GS-NO. Такое превращение мог испытывать только нитрит, который, очевидно, появлялся (наряду с гидроокисными комплексами железа) в растворе Б-ДНКЖ-GSH, распавшихся под действием супероксида. В соответствии с информацией, приведенной во «Введении», нитрит мог возникать из катионов нитрозония, высвобождавшихся из Б-ДНКЖ-GSH, с их последующим гидролизом.

Это предположение согласуется с количеством образовавшегося GS-NO, которое можно было определить исходя из величины оптического поглощения на 334 нм (кривая 8 на рис. 1). Она составила 0.5, что соответствовало концентрации GS-NO, равной 0.5 мМ. Эта величина оказалась равна концентрации катионов нитрозония – одного из двух нитрозильных лигандов в составе ЖДНФ, которые могли бы (в соответствии с вышесказанным во «Введении») выделиться из каждого из этих фрагментов ДНКЖ при их распаде.

При повторении опытов, аналогичных проиллюстрированным на рис. 1, но с другими исход-

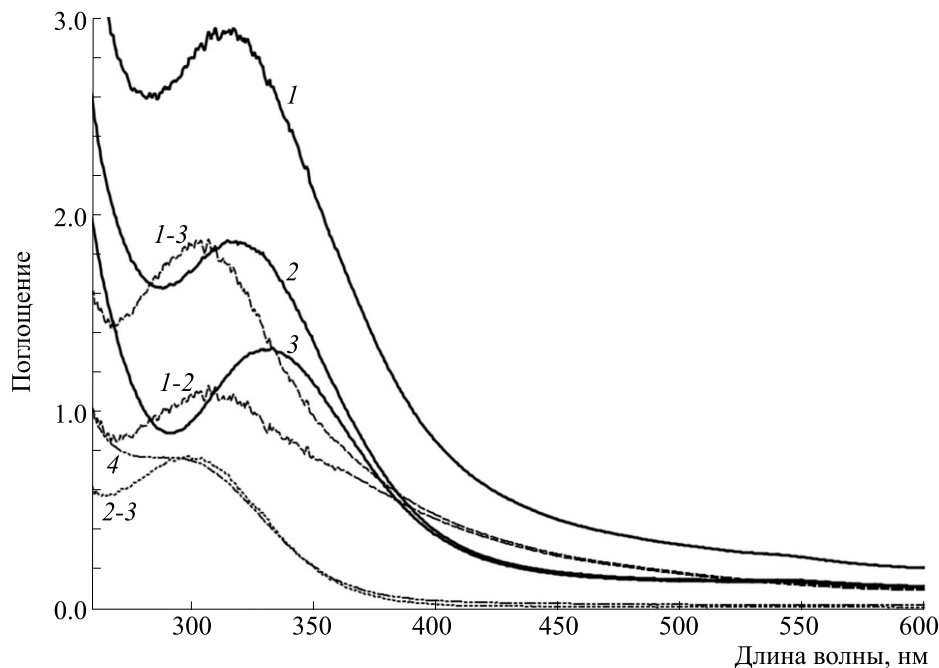


Рис. 2. Результаты вычитания кривых 2 и 3 из кривой 1, а также кривой 3 из кривой 2 (кривые 1-2, 1-3 и 2-3 соответственно). Кривые 1, 2 и 3 соответствуют кривым 3, 7 и 8, приводимым на рис. 1. Кривая 4 – спектр поглощения 0.5 мМ водного раствора FeCl_3 при pH 2.0.

ными концентрациями Б-ДНКЖ-GSH (0.7 и 0.5 мМ), также было получено точное соответствие этих концентраций и концентрации образующихся GS-NO (0.7 и 0.5 мМ). Проверка разброса экспериментальных результатов по трем повторам показала, что среднее отклонение от средней величины концентрации образующихся GS-NO не превышало 10%. Столь четко выраженное равенство между концентрацией Б-ДНКЖ-GSH (в пересчете на атом железа в этих комплексах) и GS-NO, образующихся в вышеописанных опытах, делает весьма правдоподобным наше предположение о высвобождении из распадающихся под действием анионов супероксида одного из двух нитрозильных лигандов в составе ЖДНФ в форме катиона нитрозония с последующим его превращением в анион нитрита.

Следует отметить, что при десятикратном снижении уровня KO_2 , т.е. при соотношении Б-ДНКЖ-GSH и KO_2 , равном 1:10, распад Б-ДНКЖ-GSH не обнаруживался.

Встает вопрос, какой процесс при выдерживании продуктов распада Б-ДНКЖ-GSH в кислой среде в присутствии 100 мМ глутатиона мог приводить к выявлению в этой системе GS-NO? Ответ был получен в результате приведенного на рис. 2 вычитания кривых 2 и 3 из кривой 1 (соответствующих кривым 7, 8 и 3 на рис. 1). Это вычитание показало, что постепенное формирование полосы, характерной для GS-NO, происходило в

результате ослабления полосы на 300 нм, обусловленной оптическим поглощением ионов Fe^{3+} , спектр поглощения 0.5 мМ раствора которых приводится на рис. 2 (кривая 4). Это ослабление, очевидно, было обусловлено восстановлением этих ионов до двухвалентного состояния, в котором эти ионы характеризуются слабым оптическим поглощением.

Аналогичный результат был получен в опытах, в которых pH 0.5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH был сначала поднят до щелочных значений – до 11.0, а затем были добавлены 50 мМ KO_2 . Как и в предыдущих опытах, это добавление приводило, судя по исчезновению спектра оптического поглощения Б-ДНКЖ-GSH, к его распаду и появлению интенсивного бесструктурного поглощения во всем диапазоне спектра (рис. 3, кривая 3), обусловленного, очевидно (как следует из дальнейшего), в основном гидроокисными комплексами уже не трех-, а двухвалентного железа. При последующем добавлении в раствор глутатиона в концентрации 100 мМ и подкислении серной кислотой до pH 1.0–1.5 в растворе сразу же регистрировали полосу поглощения на 325 нм (рис. 3, кривая 4). При последующей инкубации этого раствора на воздухе при комнатной температуре, приводившей к снижению бесструктурного поглощения гидроокисных комплексов железа из-за их осаждения, максимум исходной кривой 4 за 1 ч сдвигался к 330 нм. Этот сдвиг сопровождался

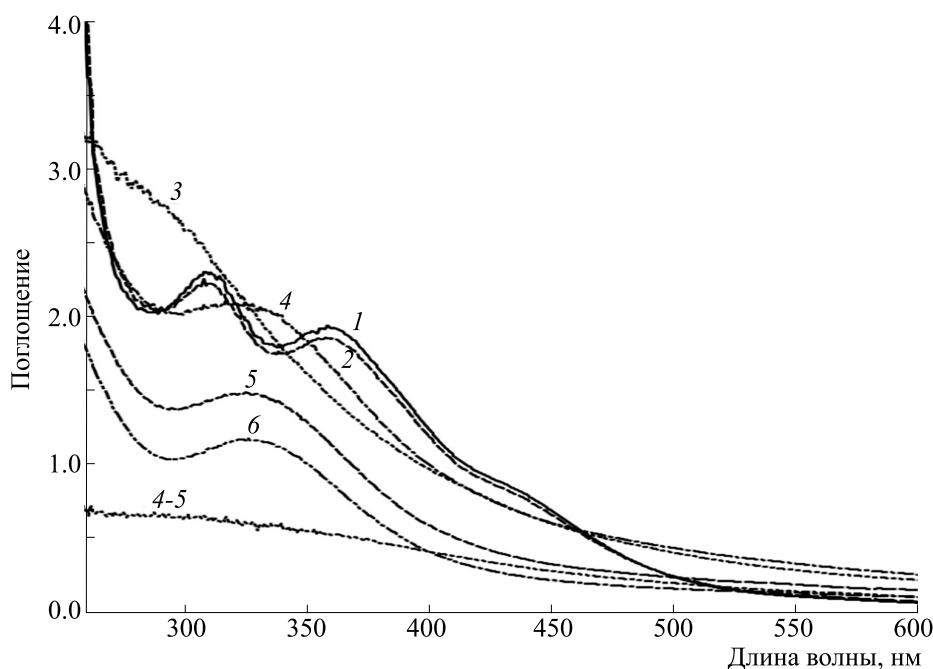


Рис. 3. Эволюция спектра поглощения 0.5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (кривая 1, рН 7.5) с последующими соответственно повышением рН раствора до 11.0 (кривая 2), добавлением к нему 50 мМ KO_2 ((кривая 3) и далее введением в раствор 100 мМ GSH и серной кислоты — кривые 3–8, запись соответственно через 1, 5, 30, 45, 60 и 90 мин. Кривая 4–5 — разность кривых 4 и 5.

появлением слабой полосы на 543 нм. Эти изменения однозначно свидетельствовали о появлении в растворе GS-NO, возникавшего в результате S-нитрозирования глутатиона азотистой кислоты, появлявшейся, в свою очередь, из нитрита в кислой среде. Что касается последнего, он появлялся в результате гидролиза катионов нитрозония, высвобождавшихся в присутствии супероксида из Б-ДНКЖ-GSH.

Что касается менее значительного с течением времени сдвига максимума полосы поглощения GS-NO в этих опытах (с 325 до 330 нм) по сравнению с аналогичным сдвигом, приведенным на рис. 1 (с 315 до 334 нм), оно могло быть обусловлено меньшей крутизной в этой области оптического поглощения, наложенного на полосу поглощения GS-NO на рис. 3, по сравнению с приведенным поглощением на рис. 1 (можно соответственно сравнить разностные кривые 4–5 и 1–2). Большая крутизна этого поглощения на рис. 1, по-видимому, была обусловлена значительным вкладом в него оптического поглощения трехвалентного железа. Последнее, очевидно, определялось тем, что высвобождающееся в этих опытах из Б-ДНКЖ-GSH двухвалентное железо могло окисляться до Fe^{3+} перекисью водорода (в реакции Фентона), образующейся в большем количестве при добавлении супероксида к Б-ДНКЖ-GSH при нейтральных, чем при щелочных рН, как это имело место в опытах, иллюстрируемых соответственно на рис. 1 и 3.

Повышение рН 0.9 или 0,5 мМ растворов Б-ДНКЖ-GSH до щелочных значений при добавлении к ним избытка супероксида (соответственно 100 или 50 мМ) можно было предотвратить и тем самым заблокировать распад Б-ДНКЖ-GSH, используя для этого растворы HEPES с высокой концентрацией буфера. Результаты такого рода опытов на 0.5 мМ растворе Б-ДНКЖ-GSH в 500 мМ HEPES-буфере при рН 7.5, обработанном от 200 до 1000 мМ KO_2 приведены на рис. 4а. Как следует из него, добавление 200 мМ KO_2 практически не влияло на устойчивость Б-ДНКЖ-GSH и только при повышении концентрации KO_2 до 1 М начинался распад этого комплекса. Величина рН при этом практически не изменялась. Это означало, что емкости буфера было достаточно для нейтрализации анионов гидроксила, уровень которых должен был бы (в отсутствие этого буфера) повышаться в результате связывания протонов с анионами супероксида. Эта нейтрализация достигалась высвобождением из HEPES-буфера соответствующего количества протонов, так что анионов супероксида начинало «не хватать» для их реакции с молекулами NO в составе Б-ДНКЖ, которая приводила бы к распаду этих комплексов и высвобождению из них катионов нитрозония. В результате, как это следует из рис. 4 (кривые 2–4),

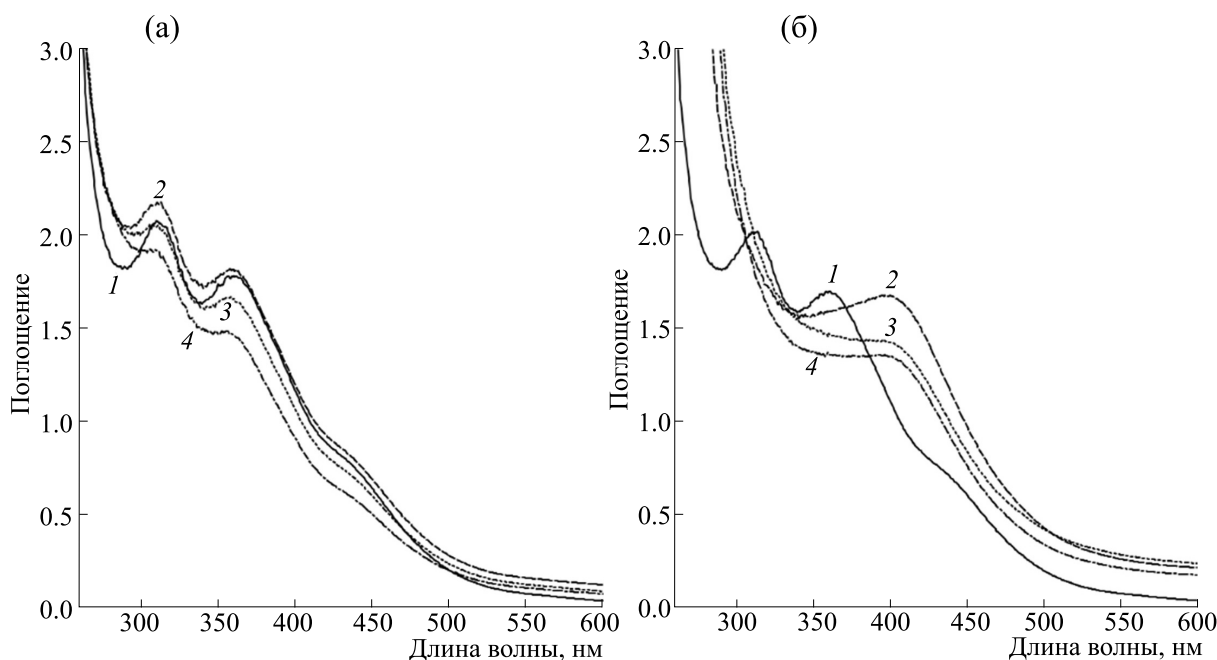


Рис. 4. Эволюция спектра поглощения 0.5 мМ растворов Б-ДНКЖ-GSH: (а) – в 500 мМ HEPES-буфере, pH 7.5 (кривая 1), через 5 мин после добавления к нему 200 мМ CO_2 (кривая 2), через 5 мин после добавления к предыдущему еще 500 мМ CO_2 (кривая 3) и еще 500 мМ CO_2 (кривая 4); добавление CO_2 не привело к заметному повышению pH раствора; (б) – в 15 мМ HEPES-буфере, pH 7.5 (кривая 1), после введения в раствор 100 мМ GSH и повышения pH до 11.0 (кривая 2) и далее сразу или через 10 мин после добавления 50 мМ CO_2 (кривые 3 и 4).

комплексы не распались, и, как следствие, катионы нитрозония в форме нитрита или GS-NO в этих опытах не обнаруживались.

Таким образом, распад Б-ДНКЖ-GSH под действием анионов супероксида, необходимый для высвобождения в раствор катионов нитрозония, в водных растворах мог достигаться только при щелочных значениях pH (при pH 10–11), т. е. в условиях подавления реакции протонов с анионами супероксида, способными разрушать Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [10].

Встает вопрос, можно ли было в этих условиях предотвратить превращение высвобождающихся из Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония в нитрит в результате их гидролиза – связывания с анионами гидроксила, а именно, обеспечить связывание катионов нитрозония с тиоловой группой молекул глутатиона, как одного из представителей тиолсодержащих соединений, с образованием соответствующего S-нитрозотиола – GS-NO. Очевидно, что для этого необходимо было поднять концентрацию свободного глутатиона (не включенного в Б-ДНКЖ) до высокого уровня с тем, чтобы обеспечить его конкуренцию с анионами гидроксила в реакции с катионами нитрозония.

Такого рода опыты были поставлены на 0.5 мМ растворе Б-ДНКЖ-GSH в 15 мМ HEPES-буфере, pH 7.5, в который добавляли 100 мМ GSH с последующим подщелачиванием раствора до

pH 11–12. В результате вместо спектра поглощения с полосами на 310 и 360 нм, характерного для исходного Б-ДНКЖ-GSH, регистрировался спектр с полосой поглощения на 400 нм, характерный для мономерной формы ДНКЖ-М-ДНКЖ-GSH (рис. 4в, кривые 1 и 2). Такое превращение закономерно следовало из-за повышения уровня молекул GSH с ионизованной по сере тиоловой группой в соответствии с химическим равновесием между Б- и М-ДНКЖ, определяемым уровнем ионизованных тиолов. Что касается действия на М-ДНКЖ анионов супероксида (добавлены 50 мМ CO_2), то, судя по незначительному снижению полосы поглощения на 400 нм, оно не приводило к заметному распаду этих комплексов и появлению в растворе GS-NO (рис. 4в, кривые 3 и 4). При последующем подкислении раствора вновь регистрировался спектр поглощения Б-ДНКЖ (данные не приведены).

Таким образом и в этих опытах нам не удалось обнаружить распад Б-ДНКЖ-GSH, что обеспечило бы появление в растворе катионов нитрозония, связывание которых с тиоловой группой глутатиона могло бы привести к образованию GS-NO. Не исключено, что в этих опытах разрушительное действие анионов супероксида на Б-ДНКЖ-GSH было предотвращено восстановительным действием на эти анионы тиоловых групп молекул глутатиона

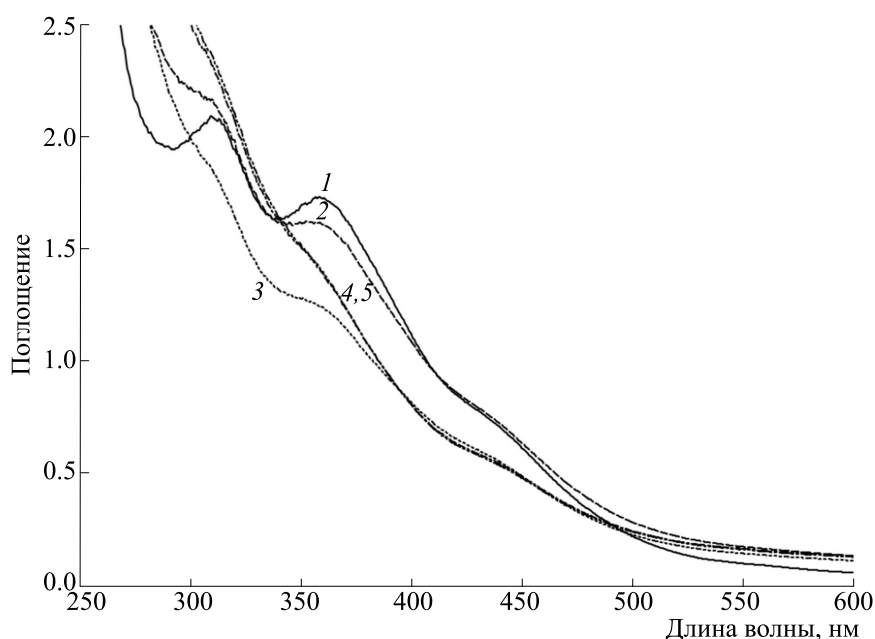


Рис. 5. Изменение спектра поглощения 0.5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH, pH 7.4 (кривая 1) через 2 и 15 мин после добавления 50 мМ ЭДТА (кривые 2 и 3 соответственно) с последующим добавлением 50 мМ глутатиона при pH 1.0 (кривые 4 и 5, зарегистрированные через 2 и 20 мин после добавления GSH и последующего подкисления раствора).

Действие ЭДТА на Б-ДНКЖ-GSH. ЭДТА как хелатор металлов, в том числе железа, способен разрушать Б-ДНКЖ-GSH при введении в раствор в 100-кратной избыточной концентрации – 50 мМ против 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH, о чем свидетельствовало полное исчезновение спектра поглощения этого комплекса уже через 15 мин после добавления к нему ЭДТА (рис. 5, кривые 1–3).

Этот результат коррелировал с изменением спектра ЭПР Б-ДНКЖ-GSH: последний (рис. 6, сигналы *a* и *b*) становился идентичным спектру ЭПР комплексов, возникавших при обработке газообразным NO раствора Fe^{2+} (0.5 мМ) + ЭДТА (50 мМ) (рис. 6, сигналы *c, d* и *e, f* соответственно). Отсюда следует, что распад Б-ДНКЖ-GSH под действием избыточной дозы ЭДТА был обуслов-

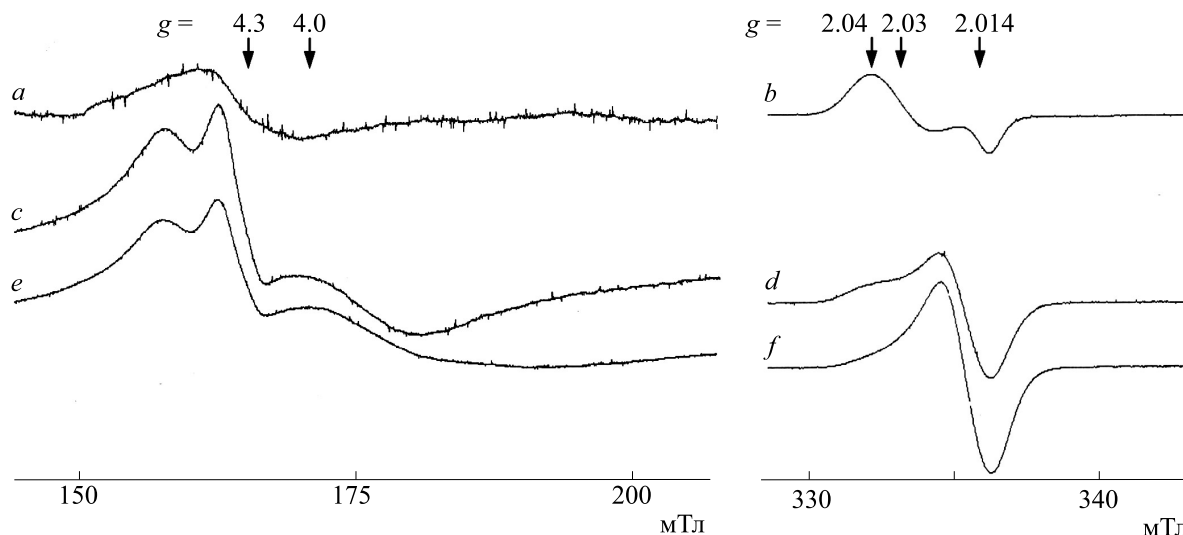


Рис. 6. Спектры ЭПР исходного 0.5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (сигналы *a* и *b*), того же комплекса после его обработки стократным избытком ЭДТА (сигналы *c* и *d*) и комплексов, образующихся после обработки газообразным NO раствора 0.5 мМ $FeSO_4$ + 50 мМ ЭДТА (сигналы *e* и *f*). Спектры зарегистрированы при 77 К при относительном усилении спектрометра при регистрации сигналов *a–f*, соответственно равном 100, 10, 20, 1, 10 и 1.

лен замещением тиолсодержащих лигандов в этих комплексах молекулами ЭДТА при сохранении в них нитрозильных лигандов. При этом, судя по сигналам, представленным в спектре ЭПР, появлялись два типа парамагнитных центров, ответственных за эти сигналы – ДНКЖ с ЭДТА с $S = 1/2$, дающие сигнал ЭПР в диапазоне значений g -фактора 2.04–2.014 (рис. 6, сигналы d и f) [12], и высокоспиновые комплексы с $S = 3/2$, дающие сигналы ЭПР в районе значений g -фактора 4.0–4.3 (рис. 6, сигналы c и e). Сравнительно узкий сигнал с $g = 4.3$ был обусловлен примесными комплексами Fe^{3+} , тогда как более широкий сигнал при $g = 4.0$ представлял собой низкополевую компоненту широкого сигнала ЭПР с $g = 4.0$ и 2.0, обусловленного МНКЖ-ЭДТА [12, 13]).

Исходя из результатов расчета методом двойного интегрирования соотношения интегральной интенсивности сигналов ЭПР высокоспинового МНКЖ с цитратом ($S = 3/2$) и низкоспинового ДНКЖ с тем же лигандом ($S = 1/2$), проведенного нами в работе [14] при соответствующем соотношении амплитуды этих сигналов (первой производной их ЭПР поглощения), было показано, что даже при десятикратном превышении амплитуды сигнала ЭПР низкоспиновых ДНКЖ по сравнению с амплитудой сигнала высокоспиновых МНКЖ при $g = 4.0$ вклад низкоспиновых ДНКЖ в интегральное ЭПР-поглощение обоих типов парамагнитных центров не превышал нескольких процентов по сравнению с вкладом в это поглощение высокоспиновых МНКЖ. Поскольку, как это следует из рис. 6, именно такое соотношение было характерно для амплитуды сигналов ЭПР ДНКЖ-ЭДТА и МНКЖ-ЭДТА, можно говорить о доминирующем вкладе высокоспиновых МНКЖ-ЭДТА в интегральное ЭПР-поглощение раствора этого комплекса + ДНКЖ-ЭДТА, соответствующем концентрации железа, использованного при синтезе этих комплексов – 0.5 мМ. Такая же концентрация характерна и для МНКЖ-ДЭТК, образующегося при распаде Б-ДНКЖ-GSH при действии на него ЭДТА (сигнал c на рис. 6). Последнее следует из равенства амплитуды сигналов e и c , зарегистрированных при относительном усилении 20 и 10.

Следует отметить, что при десятикратном снижении уровня ДЭТК, т. е. при соотношении Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК, равном 1 : 10, распад Б-ДНКЖ-GSH не обнаруживался.

Таким образом, при действии ЭДТА на Б-ДНКЖ-GSH железо-мононитрозильные группы из железо-динитрозильных фрагментов Б-ДНКЖ-GSH практически полностью переходили на ЭДТА с образованием соответственно МНКЖ-ДЭТК. Другая часть (другая половина) нитрозильных лигандов из Б-ДНКЖ-GSH должна была в форме катионов нитрозония переходить

в раствор с последующим их гидролизом до анионов нитрита. Содержание этих анионов, как и в вышеприведенных опытах с воздействием на Б-ДНКЖ-GSH анионов супероксида, можно было оценить, действуя на анионы нитрита глутатионом при кислых значениях pH, что приводило бы к образованию GS-NO.

Как следует из данных, приводимых на рис. 5 (кривые 4 и 5), образование GS-NO в такого рода опытах не обнаруживалось. Спрашивается, куда могли исчезать катионы нитрозония? Ответ следующий – они могли связываться с ЭДТА, а именно, с входящими в него третичными аминогруппами с образованием ионов нитрозоаммония (R_3N^+NO), распадающихся при комнатной температуре в результате разрыва N–C-связи [15]. Реализация реакции катионов нитрозония с третичными аминами в ЭДТА, а не реакции катионов нитрозония с тиоловой группой молекул глутатиона, могла быть обусловлена добавлением в раствор ЭДТА в концентрации, в 100 раз превышающей концентрацию глутатиона, определяемой количеством Б-ДНКЖ-GSH.

Как низкоспиновые ДНКЖ-ЭДТА, так и высокоспиновые МНКЖ-ЭДТА оказались неустойчивыми. Первые исчезали в присутствии газообразного NO в течение 10–15 мин, очевидно, в результате гидролиза входящих в их состав катионов нитрозония, тогда как высокоспиновые МНКЖ распадались в течение 20–30 мин после откачки газообразного NO из аппарата Тунберга, в котором они были синтезированы, в результате их денитрозирования.

Взаимодействие ЭДТА с катионами нитрозония, продуцируемыми азотистой кислотой. Связывание катионов нитрозония с аминогруппами ЭДТА можно было показать в опытах с использованием азотистой кислоты как донора этих катионов. Эти опыты сводились к следующему: 1 мМ растворы $NaNO_2$ в 15 мМ HEPES-буфере, не содержавших и содержавших 100 мМ ЭДТА (кривые 2 и 3), подкисляли на 15 мин до pH 1–2 с последующим добавлением к этим растворам 100 мМ глутатиона с тем, чтобы оптическим способом оценить концентрацию GS-NO, образующегося в реакции глутатиона и азотистой кислоты, возникшей в кислой среде из нитрита. Предполагалось, что часть катионов нитрозония, входящих в состав азотистой кислоты, успеет за 15 мин необратимо связаться с аминогруппами ЭДТА, что должно было привести к снижению концентрации образующегося GS-NO по сравнению с концентрацией этого вещества, возникшего в тех же опытах в растворе нитрита в отсутствие ЭДТА. Проведенные оптические измерения полностью подтвердили это предположение. Интенсивность полосы поглощения на 334 нм, обусловленной GS-NO, возникшим в растворе в отсут-

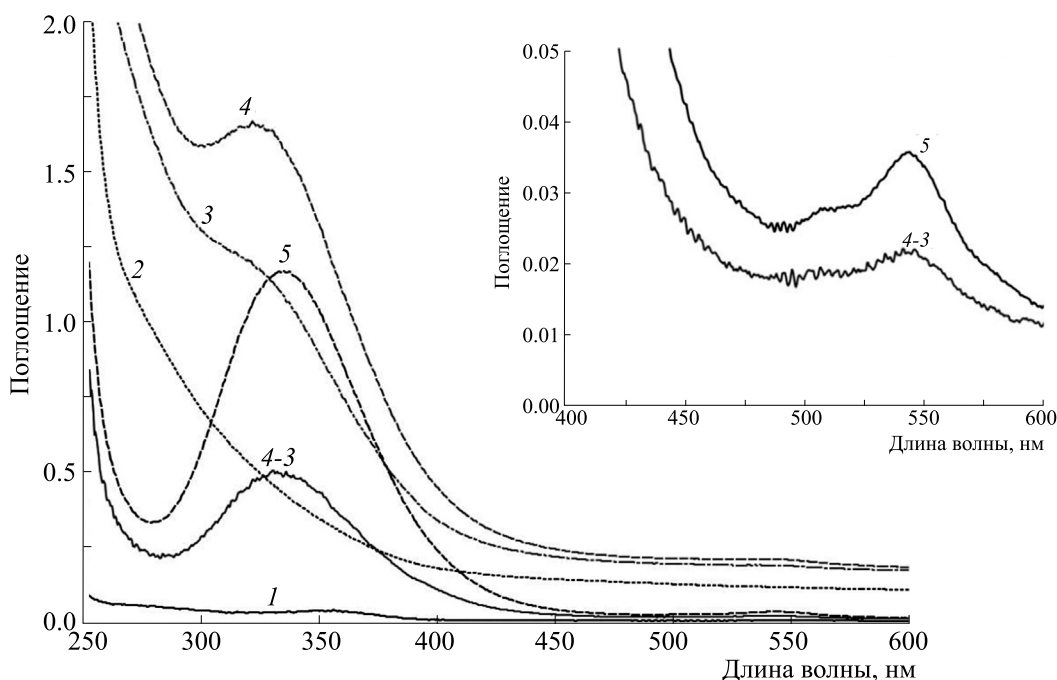


Рис. 7. Спектры поглощения 100 мМ раствора глутатиона (кривая 1), 1 мМ раствора нитрита натрия (кривая 2), 1 мМ раствора нитрита натрия + 100 мМ ЭДТА (кривая 3), 1 мМ раствора нитрита натрия, подкисленного на 15 мин до рН 1–2 с последующим добавлением 100 мМ глутатиона (кривая 4). Кривая 4-3 получена вычитанием кривой 3 из кривой 4, кривая 5 – спектр поглощения 1 мМ раствора нитрита натрия, подкисленного на 15 мин с последующим добавлением 100 мМ глутатиона. На врезке приведены спектры поглощения растворов, характеризующихся кривой 5 и кривой 4-3 в области 400–600 нм.

ствии ЭДТА (рис. 7, кривая 5), существенно превосходила аналогичное поглощение GS-NO, возникавшего в растворе нитрита в присутствии ЭДТА (кривая 4-3, полученная вычитанием кривой 3 из кривой 4). Кривая 4 представляла собой оптическое поглощение раствора нитрита + ЭДТА, подкисленного на 15 мин с последующим добавлением глутатиона, тогда как кривая 3 – оптическое поглощение раствора нитрита + ЭДТА без подкисления и последующего добавления глутатиона. Глутатион сам по себе не давал заметного оптического поглощения в регистрируемой области оптического спектра (рис. 7, кривая 1).

Полученное различие в концентрации GS-NO в растворах, соответствующих кривым 5 и 4-3 дает основание предполагать, что катионы нитрозония, высвобождавшиеся из Б-ДНКЖ-GSH, распадавшиеся в присутствии ЭДТА, могли частично связываться с аминогруппами ЭДТА.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной результат проведенных нами исследований полностью согласуется с развиваемыми нашей группой представлениями о том, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут выступать в качестве доноров как молекул NO, так и катионов нитрозония, причем при определенных

условиях [7, 8] оба этих компонента ДНКЖ могут высвобождаться при распаде комплексов в одинаковом количестве. Хотя в наших опытах нам не удалось наблюдать предполагавшегося образования GS-NO при связывании с глутатионом высвобождающихся из Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония, об их появлении в растворе можно было судить по косвенным данным. Так, например, о высвобождении катионов нитрозония из железо-динитрозильных фрагментов при действии на них анионов супероксида при стократном избытке можно было судить по накоплению в растворе анионов нитрита. Их количество, которое оценивалось по уровню образовавшихся из них в кислой среде в присутствии глутатиона молекул GS-NO, в молярном отношении было равно половине нитрозильных лигандов в исходных Б-ДНКЖ-GSH.

В принципе, высвобождающиеся из этих комплексов катионы нитрозония могли быть обнаружены по количеству GS-NO, которые могли бы возникать при связывании катионов нитрозония с тиоловой группой молекул глутатиона, тем более что константа этой реакции по данным работы [16] на три-четыре порядка превышала реакцию связывания катионов нитрозония с анионами гидроксила – реакцию гидролиза этих катионов до анионов нитрита. В этих опытах мы

не обнаружили сколько-нибудь заметного образования GS-NO, по-видимому, из-за окисления глутатиона до его дисульфидной формы избытком добавлявшегося в раствор диоксида (надпероксида) калия (KO₂).

Что касается высвобождения из Б-ДНКЖ-GSH молекул NO в опытах с обработкой этих комплексов анионами супероксида, говорить об этом не приходится из-за полного исчезновения этих молекул в составе ЖДНФ в результате их реакции со стократным избытком анионов супероксида, добавлявшихся к раствору Б-ДНКЖ-GSH. Именно взаимодействие молекул NO с анионами супероксида, приводившее к трансформации NO в составе ДНКЖ в пероксинитрит [10], обеспечивало распад этих комплексов и тем самым высвобождение из них катионов нитрозония. Что касается молекул пероксинитрита, образовавшихся в составе ДНКЖ, после их предполагаемой изомеризации в анионы нитрата они выходили в этой форме из ДНКЖ, что и приводило к распаду этих комплексов.

Аналогичный результат, а именно высвобождение из Б-ДНКЖ-GSH в равном соотношении молекул NO и катионов нитрозония, наблюдалось нами при обработке этих комплексов стократным избытком ЭДТА. Такая обработка приводила к трансформации 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH в парамагнитные ЭПР-регистрируемые высокоспиновые МНКЖ-ЭДТА с $S = 3/2$, возникавшие практически в той же концентрации – 0.5 мМ (рис. 6). Эта трансформация, очевидно, была обусловлена высвобождением из исходных Б-ДНКЖ-GSH 0.5 мМ катионов нитрозония, что и приводило к превращению этих комплексов в МНКЖ-ДЭТК при сохранении в них соответственно 0.5 мМ молекул NO, имевшихся в исходных Б-ДНКЖ-GSH. Что касается появившихся при этом низкоспиновых ДНКЖ-ДЭТК с $S = 1/2$, их содержание в растворе было пренебрежимо мало по сравнению с количеством МНКЖ-ДЭТК.

Высвобождение катионов нитрозония из Б-ДНКЖ-GSH в результате их связывания с третичными аминами в составе ЭДТА, по видимому, было обусловлено следующим. При замещении глутатионовых лигандов в Б-ДНКЖ молекулами ЭДТА, не содержащими тиоловой группы, электронная плотность на нитрозильных лигандах снижалась, они вновь приобретали положительный заряд и могли, как электрофилы, легко связываться с нуклеофилами, в данном случае с третичными аминами в ЭДТА.

Обнаруженное в нашей работе связывание катионов нитрозония с имеющимися в ЭДТА третичными аминами показывает, что при рассмотрении химических превращений катионов нитрозония в живых организмах не следует

сосредотачиваться только на характерных для этих катионов реакций гидролиза и их взаимодействия с тиолами, приводящих соответственно к превращению этих катионов в анионы нитрита или S-нитрозотиолы. Соответствующие сведения о разнообразных реакциях – реакциях нитрозирования с различными электрофильными соединениями, в которые, в частности, в живых организмах, могут включаться катионы нитрозония, можно найти, например, в монографии [15] или в обзоре [17].

Таким образом, проведенные нами исследования дают основание полагать, что реализация изученных нами процессов в живых организмах, а именно реакция появляющихся в них ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами с анионами супероксида или хелаторами железа может приводить к появлению в живых организмах высвобождающихся из ДНКЖ молекул NO и катионов нитрозония, оказывающих на процессы жизнедеятельности как позитивное, регуляторное, так и негативное, цитотоксическое действие [18].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ф. Ванин, И. В. Маленкова, П. И. Мордвинцев и др., *Биохимия*, **58**, 1094 (1993).
2. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 191 (1997).
3. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.* **14**, Article ID 878236 (2011).
4. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **29**, 4 (2013).
5. A. F. Vanin, *Austin J. Anal. Pharm. Chem.*, **5**, 1103 (2018).
6. A. F. Vanin, *Cell. Biochem. Biophys.*, **77**, 279 (2019).
7. A. F. Vanin, *Appl. Magn. Res.*, **51**, 851 (2020).
8. А. Ф. Ванин, *Биофизика*, **65**, 421 (2020).
9. А. Ф. Ванин, *Биофизика*, **67**, 434 (2022).
10. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **18**, 37 (2008).
11. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **23**, 136 (2011).
12. A. F. Vanin and D. I. Aliev, *Studia Biophysica*, **93**, 63 (1983).
13. A. Wanat, T. Schnepf, G. Stochel, et al., *Inorg. Chem.*, **41**, 4 (2002).

14. A. F. Vanin, N. A. Sanina, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 82 (2007).
15. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*, (Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2007).
16. V. G. Kharitonov, A. R. Sandquist, and V. S. Sharma, *J. Biol. Chem.*, **270**, 28158 (1995).
17. Г. И. Бородкин и В. Г. Шубин, *Успехи химии*, **86**, 18 (2017).
18. А. Ф. Ванин, *Биохимия*, № 11 (2022) (в печати).

Nitrosonium Cation Release from Dinitrosyl Iron Complexes during Superoxide Anion- or Ethylenediaminetetraacetate-Induced Decomposition of These Complexes

A.F. Vanin*, V.D. Mikoyan*, and N.A. Tkachev*

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

An optical method has been applied to demonstrate a complete decomposition of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione after the addition of a 100-fold excess of potassium superoxide anions (KO_2) or EDTA. According to the resonance structure $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}_2(\text{NO}^+)_2(\text{NO})_2]$ of these complexes, their decomposition, induced by the interaction of thiol- and NO-components of the complexes with the superoxide ion, led to nitrosonium (NO^+) cation release into the solution. Due to the hydrolysis reaction, nitrosonium cations are converted into nitrite anions in the amount equal to half of nitrosyl ligands presented in these complexes. When the complexes were decomposed by EDTA as an iron chelator, NO^+ cations released from the complexes were not hydrolyzed but bound to tertiary amino groups in EDTA. At the same time, through the use of EPR method it was found out that dinitrosyl iron complexes with glutathione were transformed into high spin ($S = 3/2$) mononitrosyl iron complexes. These findings support the concept that dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands are compounds that can serve as donors to both neutral NO molecules and nitrosonium cations in living organisms.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, nitrosonium cations, superoxide anions, nitrite