

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ ПРЕДСТАВЛЕНЫ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ В ОСНОВНОМ ИХ БИЯДЕРНОЙ ФОРМОЙ

© 2020 г. В.Д. Микоян*, Е.Н. Бургова*, Р.Р. Бородулин*, 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 26.06.2020 г.

После доработки 26.06.2020 г.

Принята к публикации 29.06.2020 г.

Методом электронного парамагнитного резонанса оценено количество моонитрозильных комплексов железа с диэтилдитиокарбаматом, образующихся в печени мышей *in vivo* и *in vitro* после внутрибрюшинного введения биядерных динитрозильных комплексов железа с N-ацетил-L-цистеином или глутатионом, S-нитрозоглутатиона, нитрита натрия или вазодилатирующего препарата Изокет®. В противоположность комплексам, образующимся после введения нитрита или Изокета, уровень которых резко возрастал после обработки препаратов печени сильным восстановителем — дитионитом, количество моонитрозильных комплексов железа с диэтилдитиокарбаматом, появившихся в печени мышей после введения им биядерных динитрозильных комплексов железа с N-ацетил-L-цистеином или глутатионом или S-нитрозоглутатиона, в присутствии дитионита не изменялось. Сделан вывод, что в первом случае ЭПР-детектируемые моонитрозильные комплексы железа с диэтилдитиокарбаматом в отсутствие и в присутствии дитионита возникали в результате реакции NO, образующегося из нитрита, соответственно с комплексами Fe^{2+} -диэтилдитиокарбамата и Fe^{3+} -диэтилдитиокарбамата. Во втором случае моонитрозильные комплексы железа с диэтилдитиокарбаматом возникали в результате перехода железо-моонитрозильных фрагментов из готовых железо-динитрозильных групп биядерных динитрозильных комплексов, в три-четыре раза превышающих содержание в ткани мооядерной формы этих комплексов. Полученные результаты позволяют утверждать, что при появлении в тканях животных *in vivo* динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами, либо введенных в организм, либо продуцируемых при участии эндогенного NO, данные комплексы представлены в этих тканях преимущественно их диамагнитной, ЭПР-недетектируемой биядерной формой.

Ключевые слова: моонитрозильные комплексы железа, динитрозильные комплексы железа, биядерная форма динитрозильных комплексов.

DOI: 10.31857/S0006302920060149

В 1964–1965 гг. Р.М. Налбандяном и А.Ф. Ваниным в дрожжевых клетках по характерному сигналу ЭПР со значениями $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$ (названным в соответствии с его средним значением сигналом 2.03) были обнаружены парамагнитные центры [1, 2], идентифицированные в 1967 г. как мооядерная форма динитрозильных комплексов железа (М-ДНКЖ) с тиол-

содержащими лигандами [3]. В том же году по сигналу 2.03 эти комплексы были зарегистрированы и в тканях животных [4]. Последующие длительные исследования позволили нашей группе (под руководством А.Ф. Ванина) установить не только их состав и происхождение, но и продемонстрировать разнообразную биологическую активность этих комплексов, обусловленную их способностью выступать в качестве доноров одного из универсальных регуляторов метаболических процессов во всех представителях живого мира — монооксида азота (NO) или, как сейчас принято говорить, оксида азота [5, 6].

В настоящее время установлено, что наряду с мооядерной формой ДНКЖ с тиолсодержащими

Сокращения: М-ДНКЖ — мооядерная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ — биядерная форма динитрозильных комплексов железа, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, МГД — N-метил-D-глюкамин-дитиокарбамат, МНКЖ — моонитрозильные комплексы железа, GSH — глутатион, NAC — N-ацетил-L-цистеин, GS-NO — S-нитрозоглутатион, ПДК — производные дитиокарбамата.

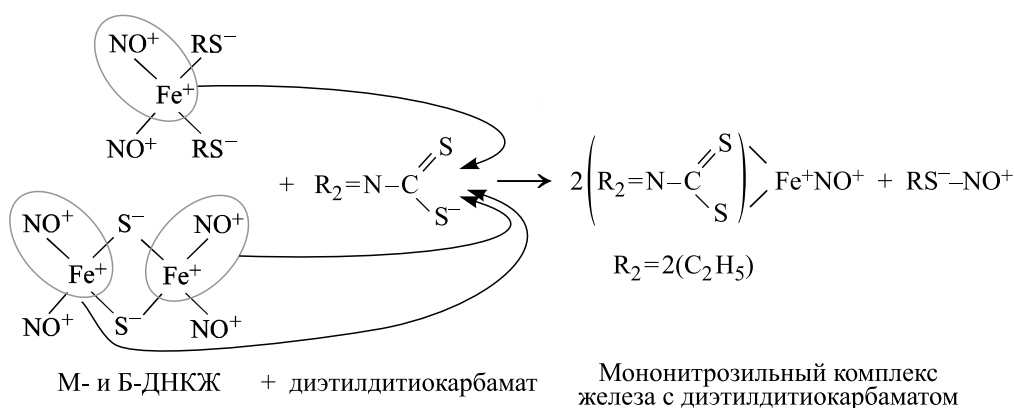


Рис. 1. Механизм превращения М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с диэтилдитиокарбаматом.

лигандами в различных биообъектах может возникать и биядерная, диамагнитная (ЭПР-недетектируемая) форма этих комплексов — Б-ДНКЖ [5–10]. Изучение электронной и пространственной структуры обеих форм ДНКЖ, их способности выступать не только в качестве доноров нейтральных молекул NO, но и в качестве производных этих молекул, не менее биологически активных — катионов нитрозония (NO^+), позволило нам предложить для М- и Б-ДНКЖ формулы, характеризующие одну из основных резонансных структур этих комплексов, соответственно как $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]$ и $[(\text{RS}^-)_2(\text{Fe}^+)_2(\text{NO}^+)_4]$ [5, 6].

Более того, в настоящее время есть основание полагать, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, образующиеся в различных живых организмах, продуцирующих оксид азота, функционируют в этих организмах в качестве «рабочей формы» этого агента, т.е. оксид азота способен оказывать физиологическое действие на организм животных и человека только после его включения в ДНКЖ как в форме NO, так и в форме NO^+ . ДНКЖ обеспечивает депонирование и стабилизацию этих агентов с последующей их доставкой к мишеням их биологического действия — соответственно к гем- и тиолсодержащим белкам. Последующее связывание NO и NO^+ соответственно с гемовой или тиоловой группами этих белков, приводящее соответственно к образованию нитрозильных комплексов гемового железа или S-нитрозотиолов, вызывает резкое изменение конформации этих белков и тем самым их активацию или дезактивацию [5, 6].

В последнее время нами были получены данные, свидетельствующие о том, что в тканях животных образующиеся в них ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами представлены преимущественно биядерной формой этих комплексов [7, 8]. Эти результаты были получены в опытах с обработкой изолированных органов животных произ-

водными дитиокарбамата — диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) или N-метил-D-глюкамин-дитиокарбаматом (МГД), способными в соответствии со схемой, приведенной на рис. 1 [7, 8], перехватывать на себя железо-мононитрозильный фрагмент из железо-динитрозильной группы Б-ДНКЖ с образованием ЭПР-детектируемых мононитрозильных комплексов железа (МНКЖ) с ДЭТК или МГД, а также S-нитрозотиолы (RS^-NO^+). МНКЖ-ДЭТК, будучи водонерастворимыми комплексами, локализуются преимущественно в гидрофобных компартментах мембран, тогда как МНКЖ-МГД (водорастворимые комплексы) — в водосодержащих областях клеток и тканей.

В работе [8] мы изучили взаимодействие ДЭТК и МГД с изолированными органами мышей, в организм которых предварительно внутрибрюшинно вводили в качестве возможных экзогенных доноров NO нитрит натрия, органический нитрит (изосорбида динитрат) или S-нитрозоглутатион. Кроме того, некоторые органы *in vitro* обрабатывали газообразным NO с последующей инкубацией этих органов в растворах ДЭТК или МГД. Что касается эндогенного NO, его появление в организме мышей в высоком количестве инициировали активацией воспалительных процессов, что достигалось введением в организм животных бактериальных липополисахаридов. В результате в органах мышей начинался усиленный синтез мощного NO-генератора — индуцибельной NO-синтазы. Повышение уровня NO в печени мышей, которое мы оценивали по количеству МНКЖ-ДЭТК, возникших *in vivo* в результате связывания NO с его ловушками — комплексами железа с ДЭТК, сопоставлялось затем с количеством МНКЖ-ДЭТК, образовавшихся *in vitro* в печени мышей, обработанных липополисахаридами, после выдерживания этой ткани в растворе ДЭТК.

Что касается работы [7], то в ней обработку изолированной печени растворами ДЭТК проводили

путем ее перфузии этими растворами. Было показано, что внутрибрюшинное введение мышам Б-ДНКЖ с глутатионом приводило к образованию в печени этих животных значительного количества МНКЖ-ДЭТК, в четыре-пять раз превышавшего уровень М-ДНКЖ, появившийся в печени *in vivo* после введения мышам Б-ДНКЖ с глутатионом.

В связи с этим встает вопрос, действительно ли введение животным перечисленных выше доноров NO приводило во всех случаях к образованию в печени (а возможно, и в других органах животных) диамагнитных Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, превращавшихся под действием ДЭТК (или МГД) в парамагнитные, ЭПР-детектируемые МНКЖ-ДЭТК(МГД)? В настоящей работе мы попытались, проведя соответствующие эксперименты, ответить на этот вопрос.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ферросульфат ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион (GSH), дитионит натрия, N-ацетил-L-цистеин (NAC) и цитрат натрия (все — от Sigma, США), изосорбида динитрат (ISDN, изокет) (UCB Farma, Ирландия) и ДЭТК (Acros, США). Газообразный NO получали в реакции ферросульфата с нитритом натрия в 0.1 М HCl с последующей очисткой от примеси NO_2 методом низкотемпературной сублимации в вакуумированной системе [9].

Синтез Б-ДНКЖ с глутатионом или N-ацетил-L-цистеином и S-нитрозоглутатиона. Б-ДНКЖ-GSH синтезировали по методу, описанному в работе [10]. В 10 мл 15 мМ HEPES-буфера, pH 7.4 последовательно растворяли 120 мг глутатиона (40 мМ), 56 мг ферросульфата (20 мМ) и 14 мг нитрита натрия. Введение в раствор глутатиона приводило к существенному снижению pH этого раствора (до 3.5), что обеспечивало растворение ферросульфата без образования водонерастворимых гидроокисных комплексов железа и последующее образование GS-NO при введении в раствор нитрита. Последнее сопровождалось розовым окрашиванием раствора. По завершении синтеза GS-NO через один-полтора часа (о чем можно было судить по интенсивности полосы поглощения GS-NO на длине волны 334 нм), pH раствора повышали до нейтральных значений, добавляя в раствор каплями 0.1 М раствор NaOH. При этом окраска раствора изменялась от розовой до темно-оранжевой, характерной для образующихся комплексов Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH). При этом ионное железо, не включившееся в эти комплексы, начинало постепенно выпадать в осадок в форме железо-гидроокисных комплексов.

Полученную таким образом суспензию оставляли на воздухе при комнатной температуре на 8–12 ч до полного осаждения железо-гидроокисных комплексов, удалявшихся из раствора Б-ДНКЖ его фильтрацией на бумаге. Концентрацию сохранившихся при этом Б-ДНКЖ-GSH определяли по интенсивности характерных для этих комплексов полос на 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции, равными соответственно 4600 и $3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ) [9]. Концентрация синтезированных таким образом Б-ДНКЖ-GSH в среднем составляла 9.5 мМ.

Аналогичным образом синтезировали комплексы Б-ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином (Б-ДНКЖ-NAC) за следующими исключениями. На синтез S-нитрозо-NAC затрачивали не более 20 мин, на синтез Б-ДНКЖ-NAC — не более 3–4 ч. В ряде экспериментов мы использовали Б-ДНКЖ-GSH(NAC), синтезированные путем обработки газообразным NO растворов Fe^{2+} с последующим контактом этих растворов с растворами GSH или NAC по методике, описанной в работе [9].

Для получения S-нитрозоглутатиона (GS-NO) к 5.5 мМ раствору глутатиона в 15 мМ HEPES-буфере, pH которого снижался после введения глутатиона с нейтральных значений до pH 3.0–3.5, на воздухе добавляли 5 мМ нитрита натрия, после чего раствор приобретал розовую окраску, характерную для GS-NO. Концентрацию последнего определяли по интенсивности его основной полосы поглощения на 334 нм с коэффициентом экстинкции, равным $0.94 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [11].

Исследования на животных. Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах массой 18–20 г. Все вещества, за исключением цитратных комплексов железа, вводили животным внутрибрюшинно в 0.2 мл физиологического раствора в следующих дозах: NaNO_2 — 50 мг/кг (0.7 мМ/кг), изокет (ISDN) — 1 мМ/кг, ДЭТК — 500 мг/кг (3 мМ/кг), GS-NO — 0.2 мМ/кг, Б-ДНКЖ-GSH(NAC) — 0.12–0.15 мМ/кг (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ). Fe-цитрат вводили внутримышечно в лапу в следующих дозах: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 37.5 мг (0.135 мМ/кг), цитрат — 187.5 мг (0.675 мМ/кг).

Животных, обработанных NaNO_2 , ISDN, GS-NO или Б-ДНКЖ-GSH одновременно с введением им Fe-цитратных комплексов, через 30 мин декапитировали, извлекали у них печень, помещали в ЭПР-ампулы и замораживали в жидком азоте. После регистрации в этих образцах спектров ЭПР их размораживали и выдерживали в 200 мМ растворе ДЭТК при комнатной температуре в течение 30 мин, затем снова замораживали в ЭПР-

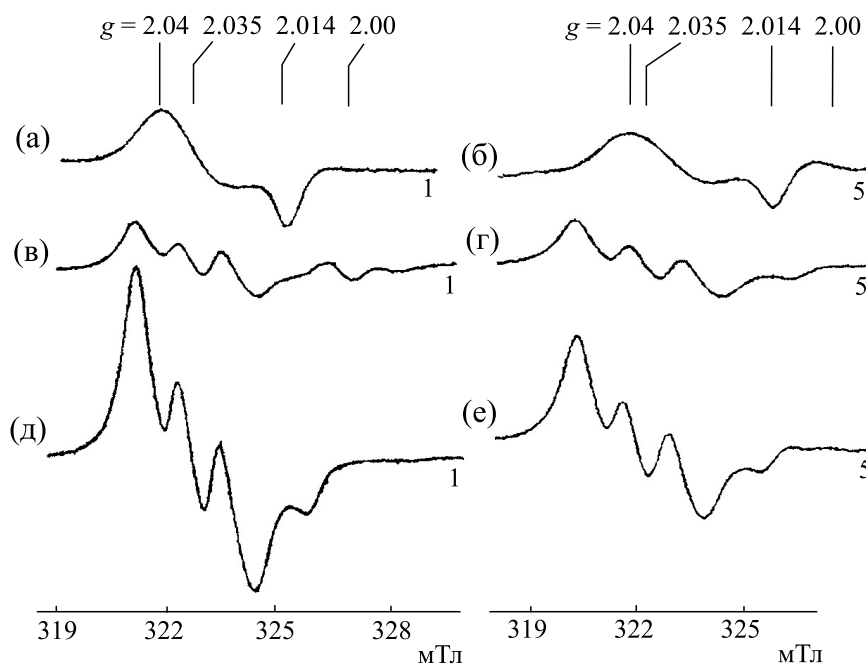


Рис. 2. Спектры ЭПР, зарегистрированные: (а, б) — в печени мышей через 30 мин после внутрибрюшинного введения им Б-ДНКЖ-НАС или ДНКЖ-GSH, (в, г) — через 30 мин инкубации препаратов печени таких же мышей в 200 мМ растворе ДЭТК, (д, е) — в печени таких же мышей с последующим внутрибрюшинным введением им на 30 мин ДЭТК. Спектры зарегистрированы при 77 К. Справа указано усиление радиоспектрметра в отн. ед.

ампулах и снова регистрировали в этих образцах спектры ЭПР.

ЭПР-измерения проводили на модифицированном ЭПР-радиоспектрметре Radio-Pan (Польша) X-диапазона при 77 К в образцах печени в цилиндрических ЭПР-ампулах диаметром 4 мм, помещаемых в палец кварцевого сосуда Дьюара. Концентрацию парамагнитных центров определяли методом двойного интегрирования сигналов ЭПР, используя в качестве стандартного образца замороженный раствор М-ДНКЖ-GSH с известной концентрацией.

Статистический анализ. Экспериментальные результаты представляли в виде средних величин $\pm$ среднее отклонение (по трем-четырем измерениям).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образование МНКЖ-ДЭТК в ткани печени животных, обработанных Б-ДНКЖ-НАС или Б-ДНКЖ-GSH. Внутрибрюшинное введение мышам Б-ДНКЖ-НАС в дозе 0.12–0.15 мМ/кг массы животных приводило к появлению в их печени М-ДНКЖ, концентрация которых, судя по интенсивности характерного для этих комплексов сигнала 2.03 (рис. 2а), практически не изменялась в течение часа после введения Б-ДНКЖ и составляла 90 ± 20 микромолей на 1 кг влажной ткани печени. Дополнительное внутрибрюшинное введение этим животным ДЭТК в дозе

500 мг/кг (3 мМ/кг) через полчаса после инъекции им Б-ДНКЖ-НАС на полчаса вызывало полное исчезновение в печени этих животных сигнала 2.03. Вместо него регистрировался интенсивный ЭПР-сигнал МНКЖ-ДЭТК со значениями $g_{\perp} = 2.035$, $g_{\parallel} = 2.02$ и триплетной сверхтонкой структурой при $g_{\perp}$ (рис. 2д). В соответствии с этим сигналом концентрация МНКЖ-ДЭТК существенно превышала уровень М-ДНКЖ и составляла 400 ± 30 микромолей на 1 кг влажной ткани печени.

Иная ситуация наблюдалась в опытах, в которых образцы печени, взятые у мышей через полчаса после введения им Б-ДНКЖ-НАС, инкубировали на воздухе в 15 мМ HEPES-буфере при pH 7.4, содержащем 200 мМ ДЭТК. Такая обработка также приводила к исчезновению в препаратах печени М-ДНКЖ и появлению в них МНКЖ-ДЭТК (рис. 2в). Однако в этом случае концентрация последних не превышала уровня исходных М-ДНКЖ. Обработка этих препаратов сильным восстановителем — дитионитом натрия, вводившемся в препараты в порошкообразной форме, не влияла на содержание МНКЖ-ДЭТК (данные не приводятся).

В аналогичных опытах на животных, в которых Б-ДНКЖ-НАС были заменены на Б-ДНКЖ-GSH, были получены идентичные результаты (рис. 2, правая панель). Различие состояло лишь в том, что при внутрибрюшинном введении мы-

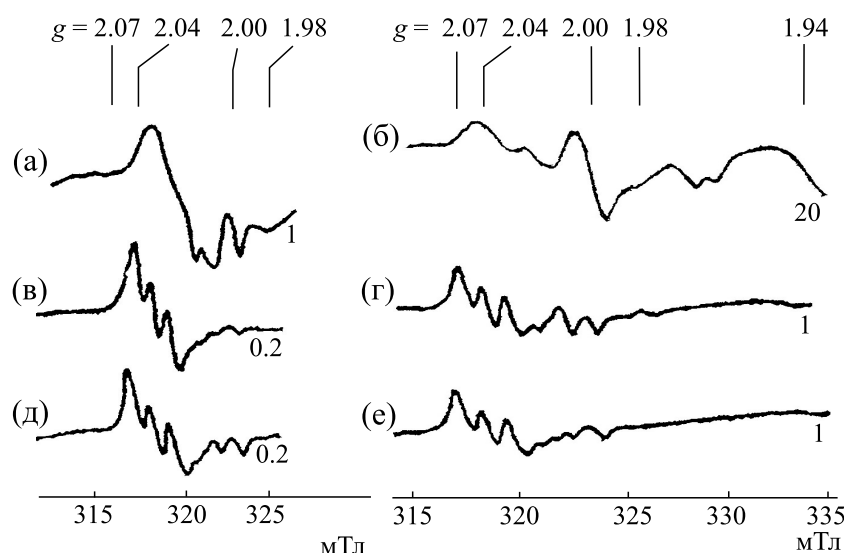


Рис. 3. Слева: спектры ЭПР препаратов печени мышей: (а) — обработанных *in vitro* газообразным NO при давлении 150 торр, (в) — с последующей 30-минутной инкубацией этих препаратов в 200 мМ растворе ДЭТК, (д) — затем обработанных дитионитом. Справа: (б) — спектры ЭПР, зарегистрированные в печени мышей через 30 мин после внутрибрюшинного введения им GS-NO, (г) — с последующей 30-минутной обработкой этих препаратов 200 мМ раствором ДЭТК, (е) — далее обработанных дитионитом. Спектры зарегистрированы при 77 К.

шам Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК в тех же дозах, что и в опытах с использованием Б-ДНКЖ-NAC, уровень образующихся М-ДНКЖ и МНКЖ-ДЭТК был существенно ниже, достигая соответственно концентраций 15 ± 5 и 80 ± 15 микромолей на 1 кг влажной ткани (рис. 2б,е). Это снижение могло быть обусловлено более слабым проникновением Б-ДНКЖ-GSH из брюшины в кровеносные сосуды, возможно, из-за существенно более низкой проницаемости клеточных мембран для глутатиона по сравнению с уникально эффективным проникновением сквозь мембраны N-ацетил-L-цистеина. При выдерживании изолированных образцов печени в 200 мМ растворе ДЭТК уровень образующихся МНКЖ-ДЭТК составлял 20 ± 5 микромолей на 1 кг влажной ткани (рис. 2г).

Не обнаружено никаких различий в результатах вышеописанных экспериментов при введении животным Б-ДНКЖ с GSH или NAC, синтезированных с использованием либо соответствующих S-нитрозотиолов (GS-NO или S-нитрозо-NAC), либо газообразного NO.

Образование МНКЖ-ДЭТК в ткани печени мышей, обработанной *in vitro* газообразным NO и дитионитом. Как и в нашем предыдущем исследовании [8], обработка изолированной печени мышей последовательно газообразным NO, а затем ДЭТК путем 30-минутной инкубации ткани в 200 мМ растворе ДЭТК при нейтральном значении pH приводила к появлению в ткани МНКЖ-ДЭТК в концентрации, в среднем достигавшей 250 ± 50 микромолей/кг влажной ткани

при средней концентрации М-ДНКЖ, равной 40 ± 10 микромолей/кг влажной ткани (рис. 3а,в). Характерно, что и в этом случае обработка препаратов печени, содержащих МНКЖ-ДЭТК, дитионитом натрия не влияла на уровень этих комплексов (рис. 3д). Как и в работе [8], приведенный выше высокий уровень образующихся МНКЖ-ДЭТК достигался в образцах печени мышей, которым до их забоя внутрибрюшинно вводили цитратный комплекс железа. Без такой обработки животных концентрация МНКЖ-ДЭТК в образцах печени снижалась в три-пять раз.

Следует отметить, что обработка препаратов печени *in vitro* газообразным NO приводила к образованию в них, кроме ДНКЖ, нитрозильных комплексов гемсодержащих белков (преимущественно гемоглобина), характеризующихся сигналом ЭПР с крайними значениями g-фактора, равными 2.07 и 1.98 (рис. 3а).

Образование МНКЖ-ДЭТК в ткани печени мышей, обработанных *in vivo* S-нитрозоглутатионом. При одновременном введении мышам GS-NO и Fe-цитратного комплекса через 30 мин в печени этих животных, как и в опытах с введением им Б-ДНКЖ с NAC или GSH, регистрировали сигнал 2.03, интенсивность которого соответствовала концентрации М-ДНКЖ, не превышавшей 1–2 микромолей на 1 кг влажной ткани (рис. 3б). При последующей 30-минутной инкубации этих препаратов в 200 мМ растворе ДЭТК в них возникали МНКЖ-ДЭТК в концентрации 10–5 микромолей на 1 кг влажной ткани (рис. 3г). При последующей обработке дитионитом препаратов пече-

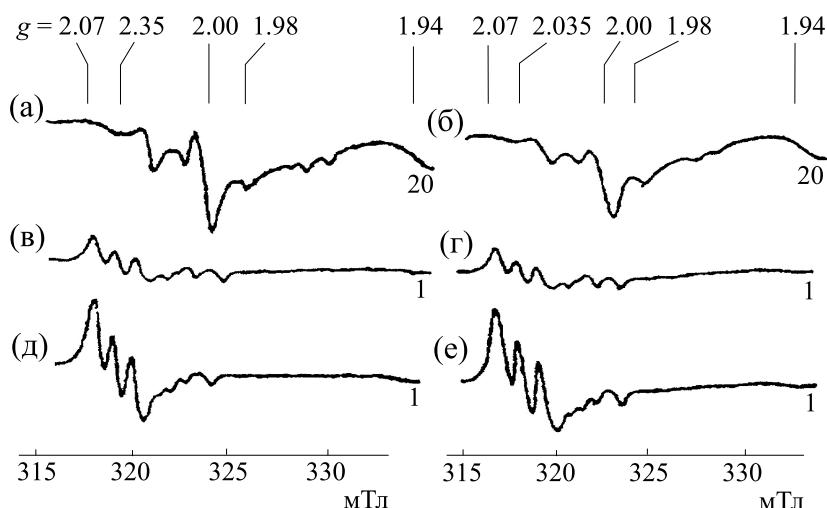


Рис. 4. (а, б) — Спектры ЭПР, зарегистрированные в печени мышей через 30 мин после внутрибрюшинного введения им нитрита натрия или изокета; (в,г) — в препаратах печени таких же животных при последующем 30-минутном внутрибрюшинном введении мышам ДЭТК; (д) — после последующей обработки этих препаратов в растворе ДЭТК, а затем (е) дитионитом.

ни, содержащих МНКЖ-ДЭТК, уровень последних практически не изменялся (рис. 3е). Следует отметить, что в отличие от результатов опытов с введением мышам «готовых» Б-ДНКЖ, с последующим действием ДЭТК на печень этих животных *in vivo* или *in vitro*, количество МНКЖ-ДЭТК, образующихся в печени *in vitro*, было существенно меньше, чем в опытах *in vivo* (рис. 2); в аналогичных опытах с введением мышам GS-NO существенных различий в количестве МНКЖ-ДЭТК в препаратах печени не обнаруживалось.

Без добавления цитратных комплексов железа мышам одновременно с GS-NO в печени этих животных, во-первых, не обнаруживалось образования М-ДНКЖ, а во-вторых, уровень МНКЖ-ДЭТК, возникавших в этом органе под действием ДЭТК, не превышал 0.15 микромолей на 1 кг

Образование МНКЖ-ДЭТК в ткани печени мышей, обработанных *in vivo* нитритом натрия или изокетом. При введении мышам нитрита натрия вместе цитратным комплексом железа с последующей через полчаса обработкой печени ДЭТК *in vivo* или *in vitro* — соответственно путем дополнительной инъекции животным раствора ДЭТК в дозе 500 мг/кг (3 мМ/кг) с последующим через полчаса забоем животных или получасовой инкубацией печени мышей в 200 мМ растворе ДЭТК — в обоих случаях в печени возникали, судя по характерному для них сигналу ЭПР (рис. 4в), МНКЖ-ДЭТК в примерно равной концентрации — 20 ± 5 микромолей на 1 кг влажной ткани. Без контакта с ДЭТК в препаратах печени, судя по их спектрам ЭПР (рис. 4а), нитрит инициировал появление только нитрозильных комплексов гемо-

глобина. Что касается образования М-ДНКЖ в этих препаратах, наблюдавшегося в опытах с введением животным Б-ДНКЖ или GS-NO, инъекция нитрита не сопровождалась, судя по отсутствию в спектрах ЭПР сигнала 2.03, появлением этих комплексов (рис. 4а). Этот результат, демонстрирующий неспособность нитрита инициировать при однократном введении образования в тканях животных *in vivo* М-ДНКЖ, многократно регистрировался нашей группой на всем более чем 50-летнем протяжении наших исследований ДНКЖ в живых организмах [5, 6, 12–16].

Обнаружилось и другое существенное отличие результатов опытов с введением мышам нитрита и опытов с введением им Б-ДНКЖ или GS-NO, а также опытов по обработке печени мышей газообразным NO — а именно ~ трехкратное повышение содержания МНКЖ-ДЭТК в препаратах печени мышей с нитритом при их обработке сильным восстановителем — дитионитом (рис. 4д).

Трехкратное увеличение содержания МНКЖ-ДЭТК под действием дитионита наблюдалось (рис. 4е) и в опытах на препаратах печени мышей, в организм которых вводили водорастворимую форму нитроглицерина — изокет (ISDN) — практически в той же дозе, что и нитрит (рис. 4б,г,е). Не исключено, что это сходство с препаратами печени мышей, которым вводили нитрит, могло быть обусловлено тем, что при распаде в организме изокет высвобождал не только NO, но и, как указывается в его описании как лекарства [17], преимущественно анионы нитрита.

Следует отметить, что в экспериментах с введением нитрита и изокета без добавления животным цитратного комплекса железа уровень обра-

зующихся в печени мышей МНКЖ-ДЭТК был в три-четыре раза ниже приведенных выше величин (данные не приводятся).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перед тем как перейти к обсуждению полученных результатов, обсудим возможные механизмы образования парамагнитных МНКЖ-ДЭТК, которые могли бы реализоваться в наших опытах при введении мышам Б-ДНКЖ-GSH(NAC), GS-NO, нитрита или изокета, а также при обработке изолированных препаратов печени газообразным NO. В соответствии с многочисленными результатами изучения этого процесса, МНКЖ с производными дитиокарбамата (ПДК), например, с ДЭТК или МГД [18–27], могут возникать по двум следующим механизмам. Во-первых, при наличии в органах животных ДНКЖ производные дитиокарбамата могут, как это показано на рис. 1, перехватывать на себя железо-моонитрозильные фрагменты из «уже готовых» железо-динитрозильных групп с образованием парамагнитных, ЭПР-детектируемых МНКЖ, характеризующихся формулой $(\text{ПДК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ (или $(\text{ПДК})_2\text{-Fe}^{+}\text{-NO}^{+}$) [18, 20, 23, 25, 26]. Во-вторых, в отсутствие ДНКЖ, но при появлении в ткани NO, последний может равноэффективно связываться с ионами двух- или трехвалентного железа с последующим образованием соответственно парамагнитных $[(\text{ПДК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}]$ или диамагнитных (ЭПР-недетектируемых) $[(\text{ПДК})_2\text{-Fe}^{3+}\text{-NO}]$ комплексов [19, 21–24, 26, 27]. Последние легко переходят в парамагнитную форму под действием различных восстановителей, например, дитионита, цистеина или аскорбата [19, 21, 23–27]. Поскольку в тканях животных *in vivo* значительная часть ионов железа — слабосвязанного железа, включаемого в МНКЖ с ПДК, — находится в трехвалентном состоянии [26], именно резкое, трехкратное увеличение содержания МНКЖ-ПДК под действием различных восстановителей должно отличать второй механизм образования этих комплексов от первого.

Такое различие в ответ на обработку изолированных препаратов печени дитионитом наблюдалось нами на препаратах мышей, с одной стороны, обработанных *in vivo* нитритом натрия или изокетом, а с другой — обработанных *in vivo* Б-ДНКЖ-GSH(NAC) или GS-NO, а также после обработки препаратов печени *in vitro* газообразным NO. Этот результат, собственно, и позволяет нам говорить о наличии в печени в первом случае преимущественно NO или во втором случае преимущественно Б-ДНКЖ. Действительно, если бы через полчаса после введения животным Б-ДНКЖ-GSH(NAC) или GS-NO эти соедине-

ния в печени полностью бы распадались, а образование МНКЖ-ДЭТК было бы обусловлено связыванием с ДЭТК оксида азота, высвободившегося из вводимых соединений или включением в этот процесс нитрита как продукта окисления NO, то дитионит как сильнейший восстановитель должен был повышать уровень парамагнитных, ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК. Факт полного отсутствия этого феномена в экспериментах на всех препаратах печени мышей, обработанных *in vivo* Б-ДНКЖ-GSH(NAC) или GS-NO, а также препаратов, обработанных *in vitro* газообразным NO, с большой вероятностью свидетельствует о том, что во всех этих случаях в печени мышей *in vivo* возникали ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Об образовании их мооядерной формы свидетельствовала регистрация сигнала 2.03 (рис. 2а,б и 3а,б); о появлении Б-ДНКЖ, причем в концентрации, в несколько раз превышающей уровень М-ДНКЖ, можно было судить по соответственно более высокой интегральной интенсивности сигнала ЭПР МНКЖ-ДЭТК по сравнению с аналогичной характеристикой сигнала 2.03.

Повышение в три раза уровня МНКЖ-ДЭТК под влиянием дитионита в препаратах печени мышей, обработанных *in vivo* нитритом или изокетом (рис. 4д,е), свидетельствует о наличии в этих препаратах двух типов МНКЖ-ДЭТК. Первый (парамагнитный, ЭПР-детектируемый) характеризуется формулой $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$, второй (диамагнитный, ЭПР-недетектируемый) — формулой $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{3+}\text{-NO}$. Именно взаимодействие последнего с дитионитом обеспечивало трехкратное повышение уровня ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК. Что касается МНКЖ-ДЭТК, ЭПР-детектируемых без добавления дитионита и составляющих ~30% от общего количества МНКЖ-ДЭТК, они могли возникать в результате взаимодействия ДЭТК с Б-ДНКЖ, возможно образующихся в печени при ее контакте с нитритом.

Такого рода предположение абсолютно не согласуется с результатами сравнительных исследований гипотензивной активности Б-ДНКЖ-GSH и нитрита натрия. Было показано, что в дозовом отношении нитрит как гипотензивный агент более чем в 100 раз менее активен, чем Б-ДНКЖ [28]. Это означает, что нитрит при введении в организм животных не способен эффективно инициировать образование ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, так что никоим образом 30% молекул NO, продуцируемых нитритом, не могли включиться в образование ДНКЖ. Очевидно, эти молекулы связывались с Fe^{2+} -ДЭТК-комплексами, что и обеспечивало образование исходно па-

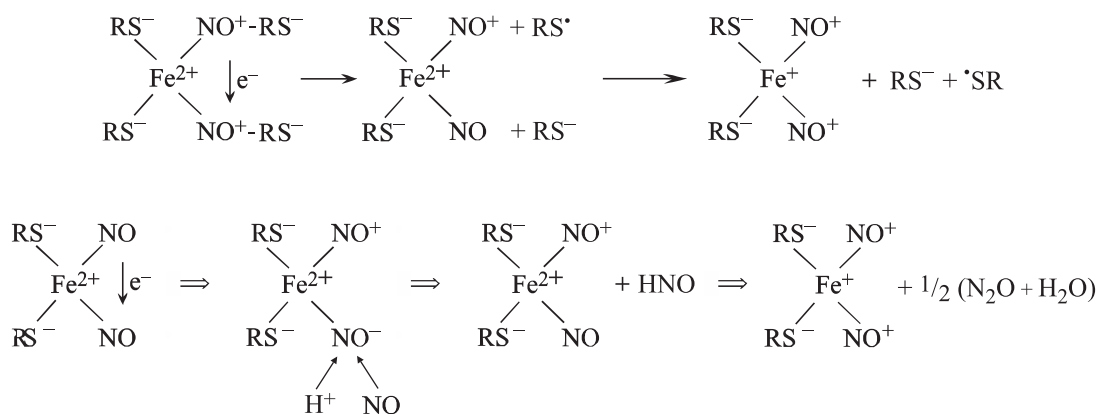


Рис. 5. Механизмы образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, инициируемого в присутствии Fe^{2+} и тиолов S-нитрозотиолами (а) или газообразным NO (б) [5, 6].

рамагнитных, ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК, не взаимодействующих с дитионитом.

Встает вопрос, почему GS-NO, введённый мышам в дозе в три раза меньшей, чем нитрит, тем не менее мог, судя по нашим результатам, обеспечивать образование в печени *in vivo* как М-, так и Б-ДНКЖ. При этом количество ЭПР-детектируемых МНКЖ-ДЭТК, возникших в препаратах печени при взаимодействии ДНКЖ с ДЭТК (10–15 микромолей на кг ткани) было примерно равно количеству тех же МНКЖ, возникших в печени мышей, обработанных *in vivo* нитритом, в результате взаимодействия образовавшегося NO с Fe^{2+} -ДЭТК-комплексами (20 ± 5 микромолей на 1 кг ткани). Другими словами, почему фактически при одинаковом количестве NO его было достаточно для образования ДНКЖ при введении мышам GS-NO, но недостаточно при введении мышам нитрита?

Столь разное влияние GS-NO и нитрита на образование ДНКЖ в организме животных можно объяснить исходя из предложенных нами механизмов синтеза этих комплексов при участии в этом процессе S-нитрозотиолов (RS-NO) или свободных молекул NO, приведенных на рис. 5.

Существенное различие этих механизмов состоит в том, что для образования одной железо-динитрозильной группы в ДНКЖ при участии RS-NO и свободных молекул NO требуются соответственно две и три молекулы этих агентов. В обоих случаях этот процесс инициируется реакцией диспропорционирования (взаимного одноэлектронного окисления-восстановления) двух молекул RS-NO и NO. Его достаточно для образования железо-динитрозильной группы при участии RS-NO, тогда как для реализации этого процесса при участии NO необходима его третья молекула, включающаяся в координационную сферу железа вместо высвобождающейся из нее

молекулы нитроксила (HNO) [5, 6, 9, 29–32]. Очевидно, что в этом случае вероятность образования железо-динитрозильной группы, обусловленного трехстадийным характером этого процесса (сначала связыванием с ионом железа двух молекул NO, затем выходом из координационной сферы железа молекулы нитроксила и последующим включением на его координационное место третьей молекулы NO), должно существенно увеличивать время образования указанной группы по сравнению со временем ее синтеза при участии только двух молекул GS-NO. Более того, с учетом возможной нестабильности промежуточных продуктов оно может делать невозможным образование в ткани печени железо-динитрозильной группы при участии молекул NO, появляющихся в этой ткани в сравнительно небольшом количестве (~ 0.1 мМ), как это имело место в наших опытах. Ясно, что только при существенном повышении уровня NO в ткани, как это имело место при обработке изолированных препаратов печени мышей газообразным NO, можно было достигнуть образования М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (рис. 3а,в,д). В этом случае образцы печени мышей, помещенные при давлении газообразного NO 100–150 торр в 100-миллилитровые аппараты Тунберга, находившиеся в контакте с этим газом в количестве 1 ммоль. Если учесть, что объем одного препарата печени равен $\sim 1 \text{ см}^3$, указанного количества NO могло хватить для образования в этом препарате до 0.3 моля железо-динитрозильных групп на 1 кг влажной ткани.

При обсуждении этой проблемы следует иметь ввиду тесную взаимосвязь между RS-NO и ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. В соответствии с работами [5, 6, 30] не исключено, что оба типа этих соединений, будучи взаимопревра-

шаемыми, могут образовывать в клетках и тканях живых организмах самоподдерживающуюся, саморегулирующуюся химическую систему, обеспечивающую в колебательном режиме появление преимущественно или ДНКЖ или RS-NO.

Следует отметить, что в работах [7, 8] мы сообщали о возможном образовании Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при участии NO, продуцируемого в печени мышей индуцибельной NO синтазой (iNOS). Синтез этого фермента мы инициировали обработкой мышей бактериальным липополисахаридом как мощным воспалительным агентом, а о появлении Б-ДНКЖ в печени мышей судили по появлению в ней МНКЖ-ДЭТК. Для этого в организм животных на полчаса вводили комплексы Fe^{2+} с цитратом, после чего ткань печени обрабатывали *in vitro* ДЭТК. Предполагалось, что добавленное железо будет связывать эндогенное NO и образовывать вместе с эндогенными тиолами Б-ДНКЖ. Оказалось, что эти комплексы могли включать в себя до 70% NO, выработанного iNOS. О полном количестве NO, продуцируемым этим ферментом, мы судили по количеству образующихся в печени *in vivo* МНКЖ-ДЭТК при введении в организм этих животных избирательных ловушек NO — комплексов железа с ДЭТК.

Вместе с тем в последующей работе [26] мы обнаружили, что уровень образующихся в этих опытах МНКЖ-ДЭТК повышался в три-четыре раза под действием дитионита (как это имело место в вышеописанных опытах с введением животным нитрита или изокета). В связи с этим нельзя было исключить того, что в препаратах печени при появлении в них эндогенного NO последний мог включаться не в Б-ДНКЖ, а сразу в МНКЖ-ДЭТК, часть которых, характеризующаяся формулой $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$, регистрировалась методом ЭПР без предварительной обработки дитионитом, а другая часть, ЭПР-недетектируемая и характеризующаяся формулой $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{3+}\text{-NO}$, становилась ЭПР-детектируемой после ее одноэлектронного восстановления дитионитом.

Реализация такого сценария исключается, исходя из полученных к настоящему времени многочисленных данных о способности иммунокомпетентных клеток, например макрофагов, продуцировать при их активации тем же бактериальным липополисахаридом значительного количества М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [33–39], переходящих из активированных макрофагов в клетки-мишени их действия [36]. Поскольку, в соответствии с работой [39], М-ДНКЖ, возникавшие в активированных мак-

рофагах, включали в себя все слабосвязанное («свободное») железо в этих клетках (а именно оно включается в ДНКЖ), вряд ли можно говорить о наличии в них и биядерной формы этих комплексов. В этом отношении отдельные клетки, продуцирующие ДНКЖ, существенно отличаются от клеток, составляющих ткани и органы животных. Как показывают наши исследования, в последних ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами представлены *in vivo* преимущественно их биядерной формой. Поэтому есть все основания полагать, что эта же форма возникала и в иммунной системе мышей, активированной липополисахаридом, так что именно она определяла появление в препаратах печени мышей, обработанных ДЭТК, парамагнитной формы МНКЖ-ДЭТК, ЭПР-детектируемой вне зависимости от добавления к препаратам дитионита. Другая форма МНКЖ-ДЭТК, характеризующаяся формулой $[(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{3+}\text{-NO}]$, т.е. та, которая становилась ЭПР-детектируемой в присутствии дитионита, могла возникать при участии нитрита — продукта окисления NO, продуцируемого iNOS, и представлять наибольшую часть МНКЖ-ДЭТК в препаратах печени мышей, обработанных липополисахаридом.

Недавно появилась публикация [40], в которой были изучены стабильность и превращения *in vitro* NO, нитрита, GS-NO и Б-ДНКЖ- GSH при их добавлении к препаратам гомогената плаценты человека, овец и мышей. Эта работа фактически находится в русле наших вышеизложенных исследований превращений тех же агентов (за исключением NO) как *in vitro* в ткани препаратов печени мышей, так и их метаболизма в печени тех же животных *in vivo* в течение 30 мин до их забоя. Сопоставление результатов, описанных в работе [40] и полученных нашей группой, свидетельствует как об их совпадении, так и об их различии. В обеих работах наблюдался распад М- и Б-ДНКЖ-GSH в изученных биопрепаратах *in vitro*. В работе [40] об этом распаде судили по снижению количества этих комплексов, определявшемуся по уровню газообразного NO, выделявшегося из ДНКЖ в условиях распада этих комплексов под действием феррицианида. В нашей работе о таком распаде можно было судить по значительному снижению количества МНКЖ-ДЭТК, образующихся *in vitro* в препаратах печени, содержащих ДНКЖ, при их выдерживании в растворах ДЭТК, по сравнению с количеством МНКЖ-ДЭТК, образующихся *in vivo* в печени мышей, после внутрибрюшинного введения сначала Б-ДНКЖ-NAC(GSH), а затем ДЭТК (рис. 2в,д и 2г,е соответственно). Исходя из ре-

зультатов работы [40] и наших данных, полученных в 1960–1980 гг. [5, 6], можно утверждать, что обнаруженное нами снижение уровня МНКЖ-ДЭТК не имело отношения к ДЭТК, а было обусловлено распадом непосредственно ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, возникшими *in vivo* в ткани печени в результате введения в организм мышей Б-ДНКЖ-НАС(GSH) и последующей инкубацией этой ткани вне организма при комнатной температуре. Не исключено, что этот распад инициировался ацидозом, развивавшимся в ткани в этих (анаэробных) условиях. Ацидоз, т.е. подкисление внутриклеточной среды, мог обеспечивать протонизацию тиоловых групп тиолсодержащих лигандов в ДНКЖ и тем самым распад последних.

Если это так, то почему в наших опытах мы наблюдали значительное возрастание МНКЖ-ДЭТК при выдерживании в растворе ДЭТК изолированных препаратов печени, предварительно обработанных газообразным NO (рис. 3а,в)? Пока ответить на этот вопрос однозначно мы не можем. Возможно, как это предполагается в работе [40], в тканях животных имеются активирующиеся в анаэробных условиях ферментные системы, вызывающие распад ДНКЖ. Не исключается и более простая причина этого явления, а именно подщелачивание внутриклеточной среды в ходе синтеза ДНКЖ в ткани печени под действием газообразного NO, нейтрализующее процесс ацидоза. Как следует из приведенного на рис. 5 механизма образования ДНКЖ в этих условиях, появление аниона нитроксила (NO^-) в результате предполагаемого диспропорционирования молекул NO как основополагающей стадии синтеза ДНКЖ должно приводить к подщелачиванию среды из-за акцептирования протонов анионами нитроксила с последующим необратимым превращением молекул нитроксила (HNO) в закись азота и воду. Аналогичным образом, подщелачивание внутриклеточной среды могло происходить при синтезе ДНКЖ из соответствующих RS-NO. В соответствии с приводимым на рис. 5 механизмом образования этих комплексов протонирование высвобождающегося из RS-NO тиолового аниона и могло приводить к подщелачиванию окружающей ДНКЖ внутриклеточной среды.

Как в нашей работе, так и в работе [40] полученные результаты свидетельствуют о возможности превращения в ДНКЖ одного из представителей RS-NO – GS-NO, естественно при участии слабосвязанного железа и тиолов (экзогенного или эндогенного происхождения). Характерно, что в наших опытах ДНКЖ и соответственно МНКЖ-ДЭТК в печени мышей при введении им

GS-NO возникали только в присутствии экзогенного железа. Что касается опытов с нитритом, то, как было показано в работе [40], добавление этого агента к гомогенату плаценты человека приводило к заметному его превращению в ДНКЖ. В наших опытах такое превращение при введении животным значительного количества нитрита (в дозе 0.7 ммоль/кг веса животного) не обнаруживалось. Вероятнее всего, в этих опытах МНКЖ-ДЭТК возникали в препаратах печени не в реакции ДЭТК с ДНКЖ, а в результате связывания NO, образующегося из нитрита, с комплексами $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ –ДЭТК.

Вместе с тем, как было продемонстрировано в нашей предыдущей работе [8], при замене ДЭТК в опытах *in vitro* на глутатион, цистеин или НАС в препаратах печени мышей, обработанных *in vivo* нитритом, возникало заметное количество ДНКЖ с указанными тиолсодержащими лигандами (особенно, при замене ДЭТК на НАС, тиолсодержащее соединение, эффективно проникающее сквозь клеточные мембраны). Аналогичная ситуация имела место и в наших исследованиях 1970–1980 гг., в которых было продемонстрировано образование *in vitro* значительного количества М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в ткани печени и ее гомогенате при их контакте с 0.5–1.0 mM нитрита натрия [5, 6]. При обоих подходах образование заметного количества ДНКЖ инициировалось повышением уровня компонентов этих комплексов – соответственно либо тиолов, либо NO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты позволяют утверждать, что при появлении в тканях животных *in vivo* ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, либо введенных в организм, либо продуцируемых при участии эндогенного NO, эти комплексы «предпочитают» находиться в этих тканях в диамагнитной, ЭПР-недектируемой форме. Выявить ее наличие можно, вводя животным производные дитиокарбамата (например, ДЭТК) или обрабатывая изолированные органы и ткани этим агентом в водном растворе. Такой подход обеспечивает превращение диамагнитных ДНКЖ в парамагнитные, ЭПР-детектируемые МНКЖ с использованными производными дитиокарбамата как лигандами.

ВКЛАД АВТОРОВ В РАБОТУ

Все авторы внесли существенный вклад в публикуемую работу. В.Д. Микоян и А.Ф. Ванин определили основное направление исследова-

ний, В.Д. Микоян и Е.Н. Бургова осуществили все эксперименты на животных, В.Д. Микоян и Р.Р. Бородулин проводили синтез Б-ДНКЖ-GSH(НАС), А.Ф. Ванин осуществил полное написание статьи и ее оформление для печати.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания (темы № АААА-А17-117040610310-6 и № АААА-А17-170403100008-5), а также при финансовой поддержке Российского академического проекта «5-100» и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00059а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Р. М. Налбандян, А. Ф. Ванин и Л. А. Блюменфельд, *Тез докл. конф. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах»* (Москва, 1964), с. 18.
2. А. Ф. Ванин и Р. М. Налбандян, *Биофизика* **10**, 167 (1965).
3. А. Ф. Ванин, *Биохимия* **32**, 228 (1967).
4. А. Ф. Ванин, Л. А. Блюменфельд и А. Г. Четвериков, *Биофизика* **12**, 829 (1967).
5. А. Ф. Ванин, *Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физхимия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, Ижевск, 2015).
6. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, 2019).
7. А. Ф. Ванин, В. Д. Микоян, Л. Н. Кубрина и др. *Биофизика* **60**, 735 (2015).
8. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **62**, 1 (2017).
9. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 136 (2010).
10. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 110 (2013).
11. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004).
12. А. Ф. Ванин и А. Г. Четвериков, *Биофизика* **13**, 608 (1968).
13. А. Ф. Ванин, Дисс. ... канд. физ.-мат. наук (МГУ им. М.В. Ломоносова, М., 1968).
14. Ф. Ванин, Л. Н. Кубрина, И. Л. Лисовская и др., *Биофизика* **16**, 650 (1971).
15. A. F. Vanin, A. N. Osipov, L. N. Kubrina, et al., *Studia Biophys.* **49**, 13 (1975).
16. А. Ф. Ванин, Дисс. ... докт. биол. наук (Институт Хим. Физики АН СССР, М., 1980).
17. *Description of the drug form of isosorbide dinitrate (Isoket)* (UCB Manufacturing Island Limited Shannon Industrial Estate Co., Clair, Ireland).
18. A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, and A. L. Kleschyov, *Studia Biophys.* **102**, 135 (1984).
19. S. Fujii, T. Yoshimura, and H. Komada, *Chem. Lett.* **9**, 785 (1996).
20. A. F. Vanin, *Methods Enzymol.* **301**, 269 (1999).
21. K. Tsuchiya, J.-J. Jang, M. Yoshizumi, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 347 (1999).
22. L. Kleschyov, H. Mollnau, V. Oelze, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **275**, 262 (2000).
23. F. Vanin, X. Liu, A. Samouilov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1474**, 365 (2000).
24. S. Fujii and T. Yoshimura, *Coord. Chem. Rev.* **198**, 89 (2000).
25. A. F. Vanin, A. Huisman, and E. van Faassen, *Methods Enzymol.* **359**, 27 (2002).
26. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **15**, 295 (2006).
27. A. F. Vanin and A. A. Timoshin, *Methods Mol. Biol.* **704**, 135 (2011).
28. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **26**, 148 (2012).
29. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **1**, 191, (1997).
30. A. F. Vanin, A. A. Papina, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **10**, 60 (2004).
31. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1 (2009).
32. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.* **14**, 818836 (2011).
33. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmac. Chem.* **5** (4), id 1109 (2018).
34. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **54**, 15 (2018).
35. J. R. Lancaster and J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1223 (1990).
36. J.-C. Drapier, C. Pellat, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.* **266**, 10162 (1991).
37. A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, S. Hauschildt, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1177**, 37 (1993).
38. C. A. Bosworth, J. C. Toledo, J.W. Zmiewski, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4671 (2009).
39. J. R. Hickok, S. Sahni, H. Shen, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **51**, 1558 (2011).
40. G. K. Mukosera, T. C. Clark, L. Ngo, et al., *J. Physiol.* **598** (11), 2223 (2020).

Dinitrosil Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands are Predominantly Represented by The Binuclear Form in Living Organisms

V.D. Mikoyan, E.N. Burgova, R.R. Borodulin, and 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, Ministry of Health of the Russian Federation, Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia*

The number of mononitrosyl iron complexes with diethyldithiocarbamate, formed in the liver of mice in vivo and in vitro after intraperitoneal injection of binuclear dinitrosyl iron complexes with N-acetyl-L-cysteine or glutathione, S-nitrosoglutathione, sodium nitrite or the vasodilating drug Isoket[®] was assessed by electron paramagnetic resonance (EPR). The number of the said complexes, in contrast to the complexes, formed after nitrite or Isoket administration, the level of which sharply increased after treatment of liver preparations with a strong reducing agent — dithionite, did not change in the presence of dithionite. It was concluded that, in the first case, EPR-detectable mononitrosyl iron complexes with diethyldithiocarbamate in the absence and presence of dithionite appeared as a result of the reaction of NO formed from nitrite with Fe²⁺-diethyldithiocarbamate and Fe³⁺-diethyldithiocarbamate complexes, respectively. In the second case, mononitrosyl iron complexes with diethyldithiocarbamate appeared as a result of the transition of iron-mononitrosyl fragments from ready-made iron-dinitrosyl groups of binuclear dinitrosyl complexes, which is three to four times higher than the content of the mononuclear form of these complexes in the tissue. The results obtained suggest that when dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands, either introduced into the body or produced with the participation of endogenous NO, appear in animal tissues in vivo, these complexes are presented in these tissues mainly by their diamagnetic, EPR-undetectable binuclear form.

Keywords: mononitrosyl iron complexes, dinitrosyl iron complexes, binuclear form of dinitrosyl complexes