

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ КАК ИСТОЧНИКИ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ЦИТОТОКСИНОВ – КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ

© 2023 г. А.Ф. Ванин^{*,#}, Н.А. Ткачев^{*}

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

[#]E-mail: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 15.03.2023 г.

После доработки 15.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Показано, что высвобождение половины нитрозильных лигандов из железо-динитрозильных фрагментов в биядерных динитрозильных комплексах железа с тиолсодержащими лигандами в форме катионов нитрозония (NO^+) при распаде этих комплексов в кислотных растворах повышается при понижении стабильности этих комплексов и полностью прекращается при повышении концентрации свободных тиолов (не включившихся в биядерные динитрозильные комплексы железа) до уровня, превышающего концентрацию железо-динитрозильных фрагментов в два и более раз. Первый фактор проявляется в том, что менее устойчивые комплексы с меркаптосукцинатом распадаются в кислотной среде при комнатной температуре, тогда как распад более устойчивых комплексов с глутатионом происходит только при прогреве их растворов при 80°C . Прекращение высвобождения катионов NO^+ из комплексов при повышении уровня свободных тиолов в растворе определяется способностью последних инициировать восстановление катионов NO^+ до NO .

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, S-нитрозотиолы, катион нитрозония, нитрит, оксид азота.

DOI: 10.31857/S0006302923030018, EDN: FPGKAY

В последние годы усилился интерес к динитрозильным комплексам железа (ДНКЖ) как экзогенным производным одного из универсальных регуляторов метаболических процессов – оксида азота (NO) [1–3]. Большинство исследователей полагает, что включение NO в эти комплексы обеспечивает его стабилизацию в живых организмах и тем самым перенос к удаленным мишеням биологического действия этого агента. Наши многолетние исследования позволяют предполагать большее, а именно, что ДНКЖ, в особенности, включающие в себя, наряду с нит-

розильными лигандами тиолсодержащие соединения, следует рассматривать в качестве «рабочей формы» оксида азота, функционирующей в живых организмах [4, 5]. Включение NO в эти комплексы обеспечивает не только его стабилизацию, но и превращение половины молекул NO в катионы нитрозония (NO^+), а также стабилизацию последних в составе ДНКЖ и перенос их на соответствующие мишени, например, на тиоловые группы, превращающиеся при связывании с NO^+ в соответствующие S-нитрозотиолы (RS-NO) [6–8].

В соответствии с нашими представлениями превращение молекул NO в катионы нитрозония происходит в ходе образования моноядерной формы ДНКЖ (М-ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами по механизму, приведенному на схеме 1:

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, RS-NO – S-нитрозотиолы, М-ДНКЖ – моноядерная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ – биядерная форма динитрозильных комплексов железа, ЖДНФ – железо-динитрозильные фрагменты, GSH – восстановленный глутатион, NAC – N-ацетил-L-цистеин, MS – меркаптосукцинат, Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом.

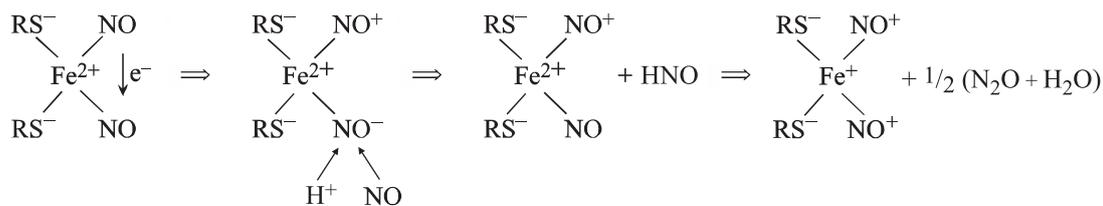


Схема 1. Механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции Fe^{2+} с молекулами NO и тиолсодержащими соединениями [6–10].

Согласно этому механизму, появление катиона нитрозония в ДНКЖ обеспечивается попарным связыванием молекул NO с ионами Fe^{2+} с последующей реакцией диспропорционирования этих молекул, превращающихся соответственно в анион нитроксила (NO^-) и катион нитрозония. После протонирования первого образующаяся молекула нитроксила (HNO) выходит из комплекса и ее место занимает другая (третья) молекула NO. В результате вместо исходного ЭПР-неактивного комплекса $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO})_2]$ с четным (равным 8) числом электронов на верхних молекулярных орбиталях комплекса (шесть d-электронов от Fe^{2+} и двух – от свободно-радикальных молекул ?NO) возникает ЭПР-регистрируемый комплекс с нечетным (равным 7) числом электронов, характеризующийся резонансной структурой $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}^+)]$ с равным соотношением NO и NO^+ в железо-динитрозильном фрагменте ДНКЖ.

Сохранение катиона нитрозония в составе ДНКЖ определяется наличием в нем тиолсодержащих лигандов, атомы серы в которых характеризуются высокой электрон-донорной активностью. Перенос электронной плотности с этих атомов на катион нитрозония приводит к снижению положительного заряда на этом катионе. В результате предотвращается его взаимодействие с анионами гидроксидов и тем самым гидролиз катиона нитрозония, который приводил бы к превращению этого катиона в анион нитрита (при сохранении нейтральных значений pH) и тем самым к распаду ДНКЖ. Этот эффект лежит в основе высокой стабильности ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, определяющей их существование в живых организмах, что и позволило выявить их наличие в этих организмах по характерному для М-ДНКЖ сигналу ЭПР с $g_{\text{cp}} = 2.03$ [10].

В живых организмах ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут быть представлены также и в биядерной форме (Б-ДНКЖ), характеризующейся в соответствии с М-ДНКЖ резонансной

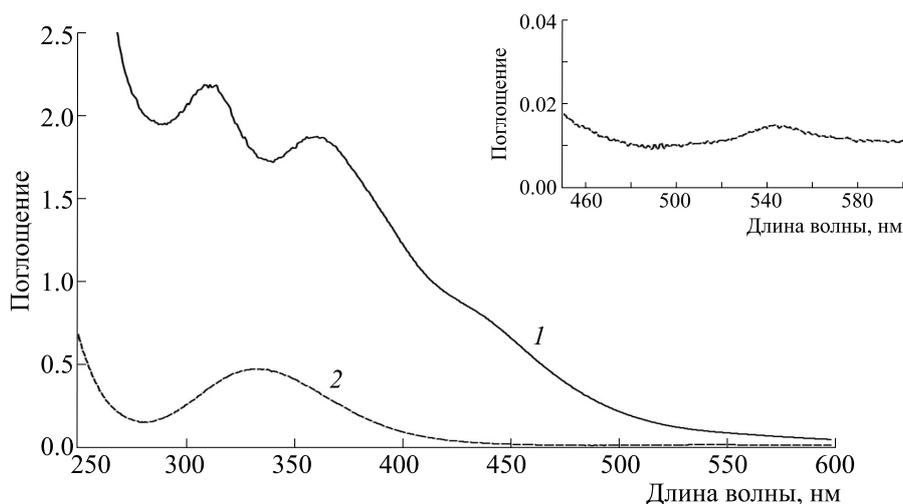


Рис. 1. Стандартные спектры поглощения Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (спектр 1) и S-нитрозотиолов (спектр 2). На врезке демонстрируется слабое оптическое поглощение S-нитрозотиолов в области 540 нм [11].

структурой $[(RS^-)_2Fe^{2+}_2(NO)_2(NO^+)_2]$. Она ЭПР-неактивна и характеризуется спектром поглощения с полосами на 310 и 360 нм, представленным на рис. 1 (кривая 1) [11, 12].

Ранее мы привели экспериментальные данные, свидетельствующие о наличии в составе Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (а следовательно и в составе М-ДНКЖ) катионов нитрозония [5–8]. Высвобождение последних при распаде Б-ДНКЖ с глутатионом или N-ацетил-L-цистеином, вызванном подкислением их раствора до pH 1.0 с последующим его прогревом при 80°C в аэробных и анаэробных условиях, прослеживалось по образованию соответствующих S-нитрозотиолов, определявшихся по характерной для них полосе спектра оптического поглощения на 334 нм, приведенного на рис. 1 (кривая 2).

При этом оказалось, что концентрация S-нитрозотиолов (а следовательно, катионов нитрозония), появлявшихся в этих опытах, по крайней мере в аэробных условиях, в соответствии с вышеприведенной резонансной структурой железодинитрозильных фрагментов (ЖДНФ) динитрозильных комплексов железа, была точно равна половине нитрозильных лигандов, входивших в состав этих фрагментов. В анаэробных условиях S-нитрозотиолы появлялись в этих опытах только в растворах Б-ДНКЖ, в которых молярное соотношение количества свободных (не включенных в Б-ДНКЖ) тиолов и самих Б-ДНКЖ не превышало 1 : 1 [7, 8]. При этом, как правило, уровень высвобождавшихся из Б-ДНКЖ катионов нитрозония, был ниже половины нитрозильных лигандов, входивших исходно в состав железодинитрозильных фрагментов в этих комплексах. При соотношении свободных тиолов и Б-ДНКЖ, равном 2 : 1 и выше, все нитрозильные лиганды в опытах, проводившихся с их растворами в анаэробных условиях, высвобождались из Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами только в форме нейтральных молекул NO, определявшихся измерениями уровня газообразного NO оптическим методом [5, 7, 13].

Естественно, что при распаде Б-ДНКЖ, вызванном в анаэробных условиях окислением их тиолсодержащих лигандов феррицианидом или блокированием в них тиоловых групп пара-хлормеркурийбензоатом, высвобождающиеся из этих комплексов катионы нитрозония, как это было показано нами в работах [7, 13], из-за отсутствия тиолов начинали гидролизываться, превращаясь в анионы нитрита. Концентрацию последних можно было оценить оптическим методом по концен-

трации S-нитрозотиолов, образующихся в реакции нитрита с тиолами в кислой среде.

При проведении всех этих исследований остались безответными следующие вопросы. Во-первых, не могли ли S-нитрозотиолы в наших опытах с обработкой Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами кислотой и нагреванием возникать в аэробных условиях в результате окисления NO, выделявшегося из Б-ДНКЖ, до диоксида азота с последующим образованием триоксида азота, способного S-нитрозировать тиолы? Во-вторых, осталось непонятным, почему при соотношении свободных тиолов и Б-ДНКЖ, равном или выше 2 : 1, катионы нитрозония не обнаруживались при кислотном распаде этих комплексов в анаэробных условиях? В-третьих, можно ли было, снижая это соотношение, включить в S-нитрозотиолы все катионы нитрозония, входившие в Б-ДНКЖ в состав ЖДНФ?

В настоящей публикации мы попытались ответить на эти вопросы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ферросульфат ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион (GSH), N-ацетил-L-цистеин (NAC) и меркаптосукцинат (MS) – все от Sigma (США).

Синтез Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Синтез всех ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (GSH, NAC и MS) проводили по методике, описанной в работе [14] по реакции между соответствующими S-нитрозотиолами, Fe^{2+} и тиолами, приведенной на схеме 2, демонстрирующей образование в этой реакции моноядерной формы таких комплексов (М-ДНКЖ). Для этого в 10 мл дистиллированной воды вводили тиол (20, 30 или 40 мМ), далее после добавления в раствор 0.05 мл серной кислоты в него вводили 20 мМ ферросульфата железа и, наконец, 20 мМ нитрита натрия. Введение последнего инициировало образование в кислой среде соответствующих S-нитрозотиолов ($RS-NO$) – GS-NO, NAC-NO и MS-NO в концентрации, равной концентрации нитрита – 20 мМ, заканчивавшееся за полтора часа для GS-NO и за несколько минут для NAC-NO и MS-NO. После этого в растворы вводили каплями концентрированный раствор щелочи (NaOH), повышая pH раствора до нейтральных значений. В результате розовая окраска раствора, обусловленная RS-NO, сменялась на оранжево-коричневую, характерную для образующихся в результате обратимой конденсации двух М-ДНКЖ, образующихся по схеме 2, в биядерные ДНКЖ (Б-ДНКЖ). Этот процесс для Б-ДНКЖ с NAC или MS занимал при комнатной температуре по-

рядка одного часа, тогда как образование Б-ДНКЖ с GSH заканчивалось лишь через четыре-пять часов, после чего нерастворимые в воде гидроокисные комплексы железа, не включившегося в Б-ДНКЖ, удаляли фильтрацией раствора через фильтровальную бумагу.

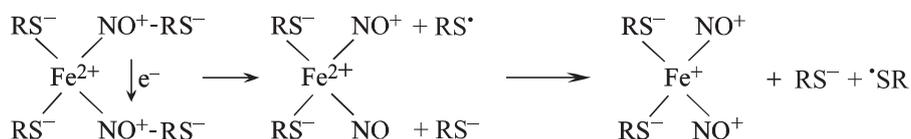


Схема 2. Механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции S-нитрозотиолов, ионов Fe^{2+} и тиолов [15].

Эта стадия сразу же приводит к образованию парамагнитных (ЭПР-активных) М-ДНКЖ с высвобождением одной молекулы тиола и одного тиольного радикала с последующей, о чем уже было сказано, конденсацией М-ДНКЖ в биядерную форму этих комплексов. Поскольку на синтез одного ЖДНФ в этих комплексах уходило по две молекулы RS-NO, 20 мМ концентрация последних должна была обеспечивать образование 10 мМ ЖДНФ. Их связывание по два через посредство двух тиолсодержащих мостиков и должно было приводить, в соответствии с вышеприведенной формулой этих комплексов – $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}_2(\text{NO})_2(\text{NO}^+)_2]$, к возникновению в растворе Б-ДНКЖ, что и имело место в ходе использованного нами метода синтеза этих комплексов

При использовании при синтезе Б-ДНКЖ тиолсодержащих соединений, превышающих количество нитрита – 30 или 40 мМ (вместо 20 мМ), в растворе появлялись «свободные» (не включенные в Б-ДНКЖ) тиолы, в молярном соотношении свободный тиол : Б-ДНКЖ, равным соответственно 1 : 1 или 2 : 1. При исходной концентрации в 20 мМ тиолов в свободной форме (не включенной в Б-ДНКЖ) в растворе эти комплексы не обнаруживались. В этом случае синтез Б-ДНКЖ обеспечивался тиолами, высвобождавшимися из RS-NO в ходе синтеза М-ДНКЖ, приведенного на схеме 2.

Как следует из вышесказанного, концентрация синтезированных Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (Б-ДНКЖ-GSH) теоретически должна была в пересчете на один ЖДНФ составлять в среднем 10 мМ. Последнее можно было проверить по полосе поглощения на 360 нм в оптическом спектре синтезированного Б-ДНКЖ с коэффициентом экстинкции, равным $3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [11].

В соответствии со схемой 2 основной стадией в образовании М-ДНКЖ является реакция диспропорционирования (взаимного одноэлектронного окисления-восстановления) молекул RS-NO, попарно связывающихся с ионом Fe^{2+} :

Оптические измерения. Оптические измерения растворов проводили при комнатной температуре на спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu, Eugora GmbH, Германия), используя плоскую кювету с длиной оптического пути 10 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Описание полученных препаратов Б-ДНКЖ. Регистрация спектров поглощения полученных препаратов Б-ДНКЖ показала (рис. 2б), что при снижении молярного соотношения свободных тиолов (глутатиона, НАС или цистеина) и Б-ДНКЖ ниже 1 : 1, т.е. при понижении содержания свободных тиолов в растворе Б-ДНКЖ обнаруживалось отклонение формы этих спектров от «стандартного» (приведенного на рис. 1) спектра поглощения Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами.

Это отклонение проявлялось в уплощении спектра поглощения синтезированных Б-ДНКЖ между полосами на 310 и 360 нм, т.е. уплощением минимума между этими полосами (рис. 2б, спектр 1). Оно могло быть обусловлено наложением на этот спектр полосы оптического поглощения на 334 нм соответствующих S-нитрозотиолов, «не успевших» включиться в образование сначала соответствующих М-, а затем и Б-ДНКЖ из-за быстрого осаждения железа в форме гидроокисных комплексов (и, как следствие этого, выключения части железа из реакции по схеме 2). Это предположение полностью подтвердилось при сложении спектров поглощения Б-ДНКЖ с глутатионом, полученных по схеме 2, при разных количествах GS-NO, «не успевших» включиться в Б-ДНКЖ-GSH. Например, если в эти комплексы не включилось бы 10 из 20 мМ GS-NO, то включение в них остальных 10 мМ (50%) GS-NO должно было привести к образованию 5 мМ Б-ДНКЖ-GSH. Соответственно при распаде этих комплексов выделилось бы 5 мМ катионов нитрозония,

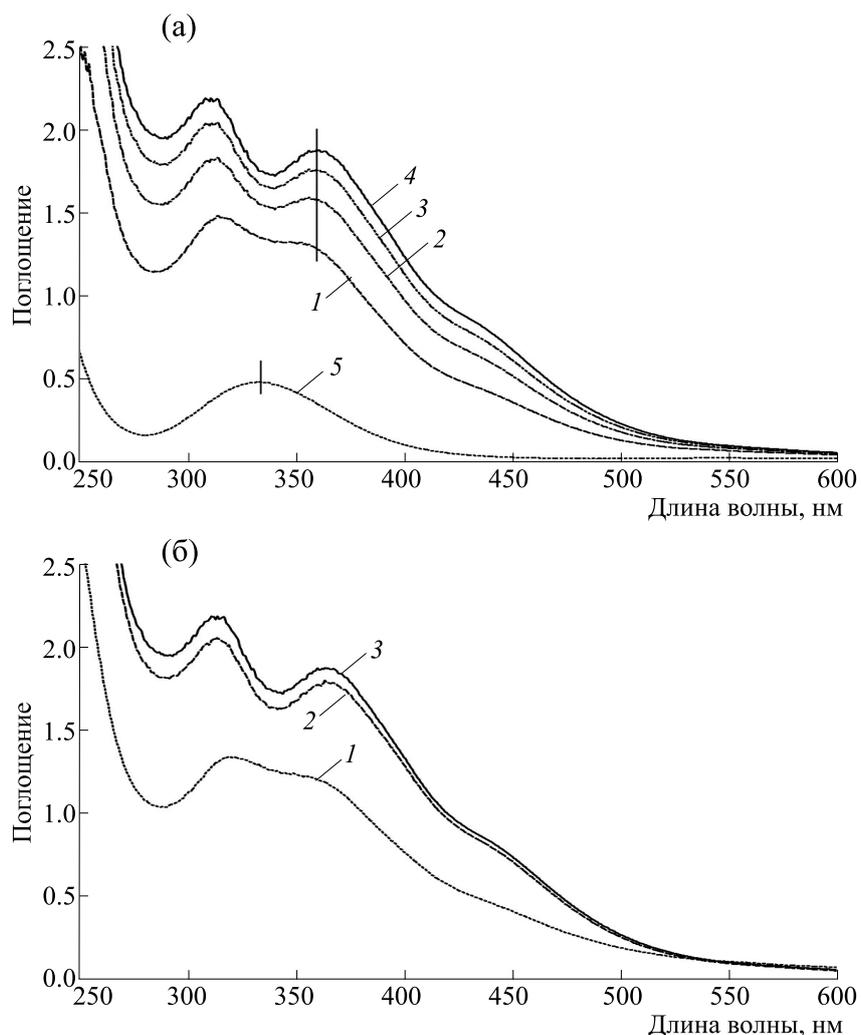


Рис. 2. (а) – Форма спектров поглощения растворов Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO, полученных путем сложения спектров поглощения Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO, при включении в комплексы Б-ДНКЖ-GSH 10, 5 и 2 мМ GS-NO (соответственно спектры 1–3). Спектры 4 и 5 – стандартные спектры, характерные соответственно для Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO и использованные для расчета кривых 1–3. (б) – Экспериментально зарегистрированные спектры поглощения комплексов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношении GSH : Fe²⁺ : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ, 30 : 20 : 20 мМ или 40 : 20 : 20 мМ (соответственно кривые 1–3). Экспериментальные и рассчитанные спектры приведены для растворов, соответствующих их 20-кратному разбавлению.

образующих такое же количество GS-NO. В результате в растворе должно было бы аккумулироваться 15 мМ этого соединения, а форма спектра поглощения раствора, полученного наложением полосы поглощения GS-NO (10 мМ), не включившегося в Б-ДНКЖ, на спектр поглощения возникшего в этом растворе Б-ДНКЖ-GSH (5 мМ) должен иметь форму, приведенную на рис. 2а (спектр 1). На том же рис. 2 приведены полученные таким же путем спектры растворов, содержащих 5 мМ (25%) или 2 мМ (10%) GS-NO из его общего количества в 20 мМ, не включившегося в Б-ДНКЖ-GSH. Соответственно концентрация этих комплексов должна была составлять 7.5 и 9 мМ (рис. 2а, соответственно спектры 2 и 3).

Очевидно, что такого рода спектры оптического поглощения при тех же количествах NAC-NO должны наблюдаться для растворов Б-ДНКЖ-NAC.

Сопоставление этих спектров с экспериментально полученными для растворов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношении GSH : Fe²⁺ : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ, 30 : 20 : 20 мМ или 40 : 20 : 20 мМ (рис. 2б, соответственно спектры 1–3) показывает, что наложение спектра поглощения GS-NO на спектр поглощения Б-ДНКЖ-GSH наиболее четко проявляется для комплексов, синтезированных при соотношении GSH : Fe²⁺ : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ.

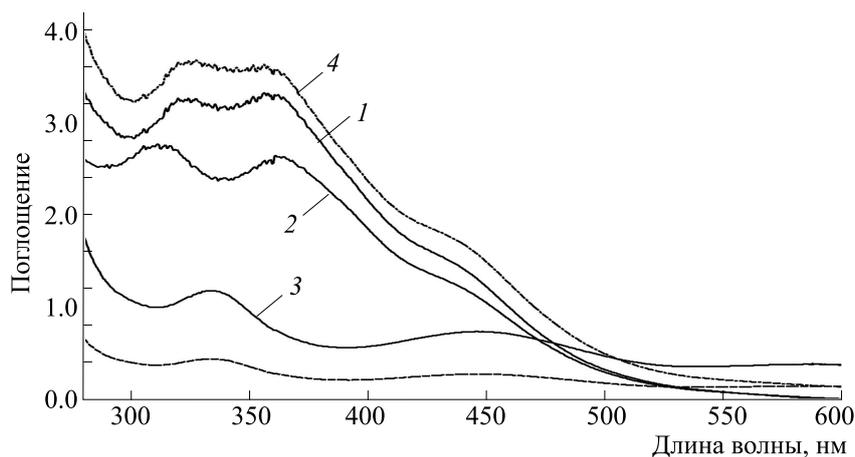


Рис. 3. Форма спектра поглощения раствора комплексов Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при соотношении MS : Fe²⁺ : нитрит, равном 40 : 20 : 20 мМ (спектр 1), с последующим подкислением до pH 1.0 (спектр 2). Спектр 3 – ЭПР-спектр МНКЖ с ЭДТА [16]. Его наложение на спектр 2 дает новый спектр, обозначенный как спектр 4. Спектры комплексов Б-ДНКЖ-MS зарегистрированы при 20-кратном разбавлении растворов.

Что касается Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-MS), то такие построения спектров провести не удалось. Дело в том, что в спектре поглощения этого комплекса не удалось наблюдать «обычный» (стандартный) спектр Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Для Б-ДНКЖ-MS наблюдался сдвиг полосы на 310 нм к полосе на 360 нм (рис. 3, спектр 1). И лишь при подкислении раствора этого комплекса до pH 1–2 спектр поглощения Б-ДНКЖ-MS становился идентичным «обычному», стандартному спектру Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (рис. 3, спектр 2).

Не исключено, что указанный сдвиг мог определяться наложением на спектр Б-ДНКЖ-MS оптического поглощения высокоспинового ($S = 3/2$), мононитрозильного комплекса железа (МНКЖ), включающего в себя лиганды нетиоловой природы, например карбоксильные группы в молекуле MS. О такой возможности свидетельствуют результаты сложения стандартного спектра поглощения Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и спектра поглощения МНКЖ с этилендиаминовыми (ЭДТА) лигандами, взятого из работы [16], с интенсивной полосой на 340 нм и менее интенсивными полосами на 435 и 630 нм. При некоторой интенсивности полосы на 334 нм (при трехкратном снижении ее амплитуды) ее наложение на спектр поглощения Б-ДНКЖ приводило к заметному сдвигу полосы на 310 нм к полосе на 360 нм ((рис. 3, спектр 4). Тем не менее мы считаем, что приводимое объяснение является все еще гипотетическим и требует дальнейшей проверки.

Изучение действия кислотной обработки синтезированных Б-ДНКЖ при комнатной температуре или при 80°C в присутствии и в отсутствие

кислорода в растворах этих комплексов проводилось после 20-кратного разбавления этих растворов, так что исходная концентрация Б-ДНКЖ в них в среднем составляла 0.5–0.6 мМ.

Соединения, появившиеся при кислотном разрушении Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в аэробных и анаэробных условиях. Судя по сохранению спектра поглощения Б-ДНКЖ с GSH или NAC, синтезированных при различных соотношениях тиола, Fe²⁺ и нитрита, при подкислении растворов этих комплексов до pH 1.0 они сохранялись при комнатной температуре без изменения по крайней мере в течение 1 часа. Такая стабильность не наблюдалась для Б-ДНКЖ-MS – при комнатной температуре в кислой среде они распадались за 2–15 мин, а при 80°C – за 20–50 с. Во всех этих экспериментах распад Б-ДНКЖ-MS сопровождался появлением полосы поглощения на 334 нм и слабой полосы на 543 нм, характерных для RS-NO (рис. 4, спектры 3).

Концентрация RS-NO, соответствующая интенсивности полосы на 334 нм, была практически равна концентрации ЖДНФ в Б-ДНКЖ-MS, содержавших по одному катиону NO⁺ и одной молекуле NO. Отсюда можно было сделать вывод о том, что распад Б-ДНКЖ-MS на воздухе приводит к высвобождению из каждого ЖДНФ по одному катиону нитрозония, связывающемуся с тиоловой группой MS с образованием одной молекулы MS-NO. Однако результат последующей обработки этого раствора избытком глутатиона поставил под сомнение этот вывод. Оказалось, что интенсивность полосы на 334 нм заметно, в среднем в полтора раза, усиливалась, что свидетельствовало о наличии в растворе еще одного агента, ответственного за образование дополни-

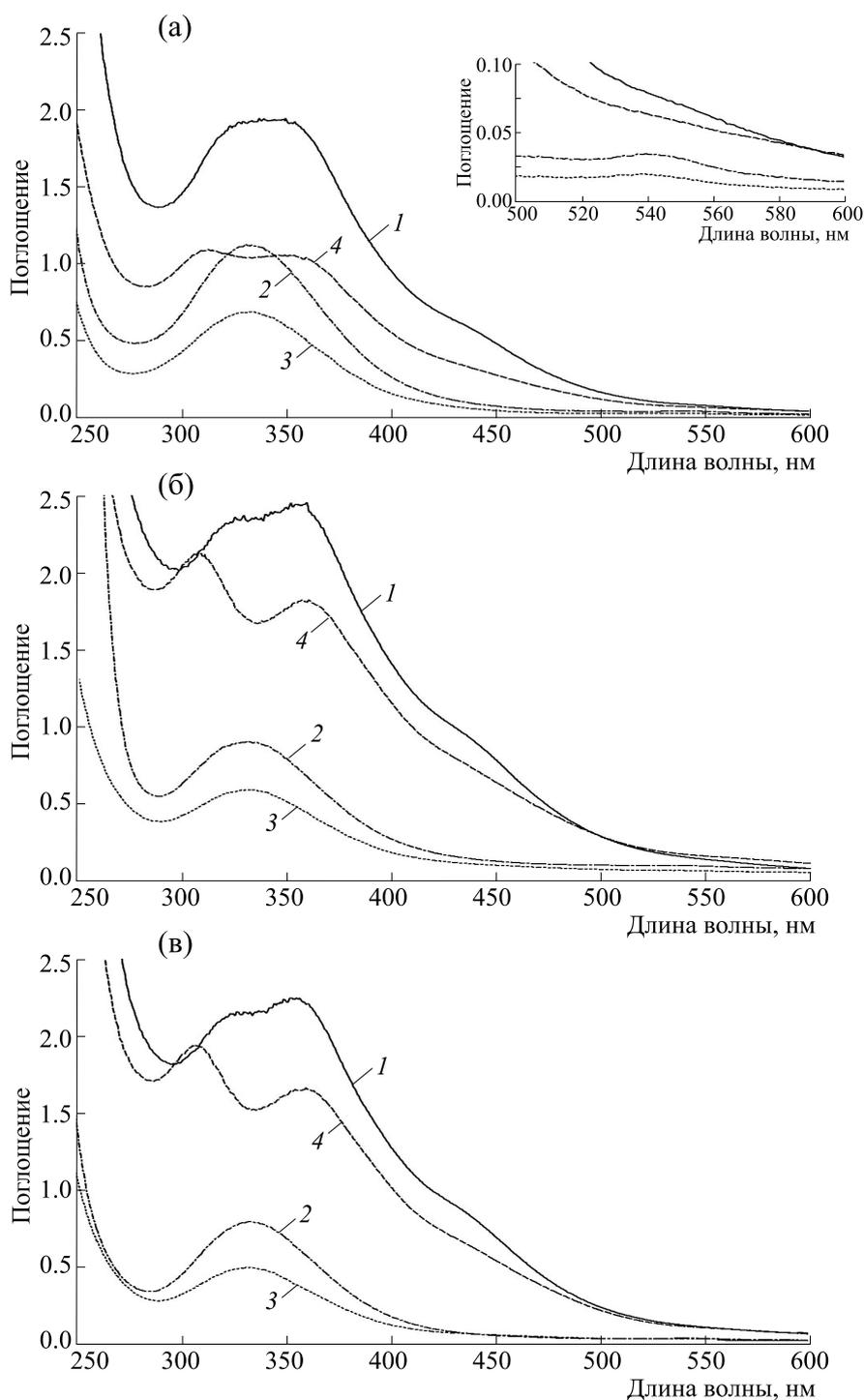


Рис. 4. Эволюция спектров поглощения комплексов Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при соотношении MS : Fe²⁺ : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ (а), 30 : 20 : 20 мМ (б) или 40 : 20 : 20 мМ (в), с последующей их инкубацией в аэробных условиях при комнатной температуре после подкисления растворов до pH 1.0. Спектры 1 – исходные, спектры 4 зарегистрированы через 1 мин после подкисления, спектры 3 – зарегистрированы соответственно через 2, 5 и 15 мин. Спектры 2 – к предыдущим растворам добавлен избыток глутатиона. На врезке (рис. (а)) показано слабое оптическое поглощение на 540 нм, характерное для RS-NO. Аналогичное поглощение обнаруживалось и для растворов, спектры которых показаны на рис. (б) и (в). Спектры зарегистрированы для растворов Б-ДНКЖ-MS, разбавленных в 20 раз.

тельного количества RS-NO (рис. 4, спектры 4). Им могла быть азотистая кислота (HNO_2), возникавшая в кислой среде в результате гидролиза триоксида азота (N_2O_3) – аддукта NO, выделявшегося из Б-ДНКЖ, и диоксида азота (NO_2), образующегося при окислении NO кислородом воздуха. Но если это так, то нельзя было исключить и того, что полоса поглощения на 334 нм в целом могла быть обусловлена только появлением в растворе триоксида азота, так что никакого высвобождения катионов нитрозония из ЖДНФ (да и самих этих катионов в данных фрагментах) не было! Что касается совпадения концентрации MS-NO, образующихся перед добавлением глутатиона, и концентрации ЖДНФ в Б-ДНКЖ-MS (10 мМ), оно могло быть обусловлено равенством концентрации этих фрагментов и молекул MS, входящих в состав Б-ДНКЖ и образующих затем MS-NO с катионом нитрозония, высвобождающимся из триоксида азота. (Последний можно представить как аддукт катиона нитрозония и аниона нитрита – $\text{NO}^+ \cdot \text{NO}_2^-$.)

Очевидно, что для того, чтобы разобраться в этом диссонансе экспериментальных результатов, необходимо было изучить распад Б-ДНКЖ-MS в растворе в отсутствие воздуха, т.е. провести эксперименты с предварительной откачкой воздуха из этого раствора – в анаэробных условиях. Такого рода эксперименты показали, что и в отсутствие воздуха распад Б-ДНКЖ-MS в кислой среде приводил к появлению в растворе MS-NO в концентрации, равной концентрации ЖДНФ в этих комплексах. Таким образом, эти фрагменты действительно могли выступать в качестве доноров катионов нитрозония, причем в соотношении один катион на один ЖДНФ или на один атом железа в Б-ДНКЖ-MS.

Такого рода распад наиболее четко и воспроизводимо наблюдался для растворов Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при соотношении MS : Fe^{2+} : нитрит, равном равном 20 : 20 : 20 мМ или 30 : 20 : 20 мМ. Эксперименты проводили следующими образом. Из 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-MS откачивали воздух, затем к нему в анаэробных условиях добавляли 0.01 мл крепкой серной кислоты, после чего раствор прогревали при 80°C с последующей откачкой вышедшего из распадающихся комплексов газообразного NO, и только после этого раствор открывали на воздух для оптических измерений. Последние проводили сразу после обесцвечивания раствора.

Существенно, что последующее добавление избытка глутатиона практически не сказывалось на интенсивности полосы на 334 нм, характерной для RS-NO ((рис. 5а,б, кривые 2 и 1). Это означает, что из-за откачки воздуха высвобождающийся из Б-ДНКЖ-MS газообразный NO не мог произ-

водить триоксид азота, как это имело место при кислотном распаде Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на воздухе (рис. 4). Следовательно, единственными S-нитрозирующими агентами могли выступать катионы нитрозония, высвобождающиеся из распадающегося Б-ДНКЖ-MS.

Что касается Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при высоких концентрациях MS, например, при соотношении MS : Fe^{2+} : нитрит, равном равном 40 : 20 : 20 мМ, то в этом случае распад комплексов в анаэробных условиях, даже при 80°C, не сопровождался появлением в растворе MS-NO ((рис. 5в, кривые 2 и 1).

Аналогичные результаты были получены в опытах с кислотным разрушением при 80°C в анаэробных условиях Б-ДНКЖ с GSH (рис. 6а) или NAC (данные не приводятся). При комнатной температуре инкубации комплексы в кислой среде сохранялись без изменения по крайней мере в течение часа.

Как и в опытах с Б-ДНКЖ-MS, распад Б-ДНКЖ с GSH или NAC в кислой среде в анаэробных условиях при 80°C не сопровождался образованием соответствующих RS-NO, если в экспериментах использовали Б-ДНКЖ, синтезированные при высоких концентрациях тиолов, например, при соотношении тиол : Fe^{2+} : нитрит, равном равном 40 : 20 : 20 мМ (рис. 6б). В этом случае в соответствии со схемой 2 синтез Б-ДНКЖ должен был сопровождаться сохранением в растворе тиолов, не включившихся в Б-ДНКЖ, – назовем их свободными тиолами. Соотношение этих тиолов и Б-ДНКЖ в растворе при 40 мМ исходной концентрации тиолов должно в соответствии со схемой 2 составлять 2 : 1, тогда как при соотношении в ходе синтеза Б-ДНКЖ тиола, Fe^{2+} и нитрита, равном 20 : 20 : 20 мМ, свободные тиолы в растворе синтезированных таким образом Б-ДНКЖ должны были отсутствовать, т.е. концентрации свободных тиолов и Б-ДНКЖ должны были соотноситься как 0 : 1. Поскольку только при таком соотношении в анаэробных условиях инкубации Б-ДНКЖ-GSH распад этих комплексов достоверно сопровождался высвобождением из них катионов нитрозония, а в присутствии свободных тиолов этот процесс блокировался, есть основание предполагать, что именно свободные тиолы, как восстановители катионов нитрозония, могли подавлять этот процесс. Каким образом – эту сложную проблему мы рассмотрим при обсуждении полученных результатов.

Характерно, что блокирующее действие свободных тиолов на высвобождение катионов нитрозония из Б-ДНКЖ-GSH полностью устранялось при проведении тех же экспериментов в аэробных условиях (рис. 6в). Вероятнее всего, это

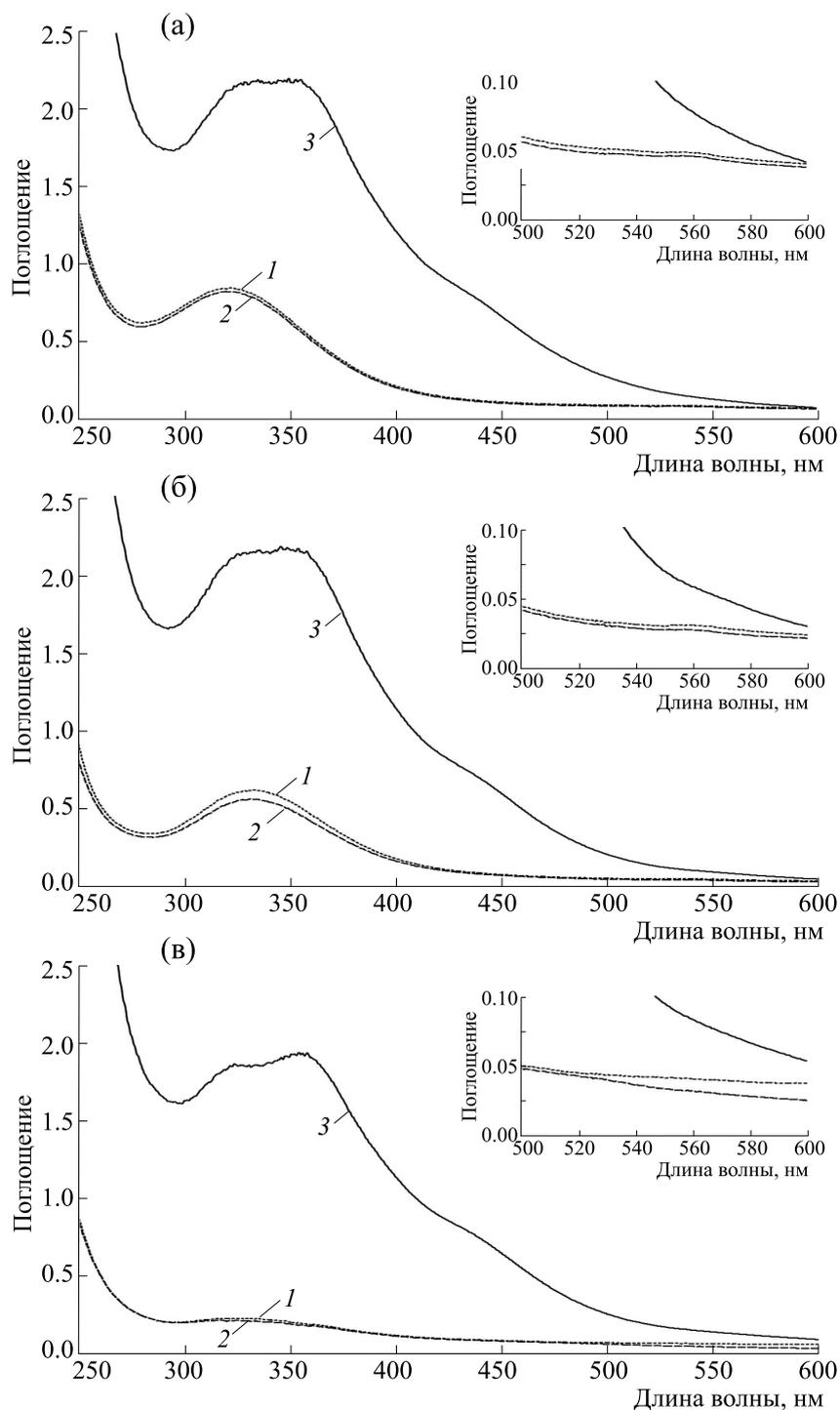


Рис. 5. Эволюция спектров поглощения комплексов Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при соотношении MS : Fe²⁺ : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ (а), 30 : 20 : 20 мМ (б) или 40 : 20 : 20 мМ (в), с последующей инкубацией растворов этих комплексов в анаэробных условиях после их подкисления до рН 1.0 при 80°С. Спектры 3 – исходные растворы комплексов Б-ДНКЖ-MS, спектры 2 – для тех же растворов через 1, 7 и 15 мин при 80°С, спектры 1 – после добавления к предыдущим растворам избытка глутатиона. На врезках на рис. (а) и (б) указано слабое поглощение на 500 нм, характерное для RS-NO; на врезке на рис. (в) оно отсутствует. Спектры зарегистрированы для растворов комплексов Б-ДНКЖ-MS, разбавленных в 20 раз.

эффект был обусловлен окислением тиолов до дисульфидов, не способных восстанавливать катионы нитрозония до молекулярного NO. Об эффективности окислительных процессов в этих условиях свидетельствует смещение максимума полосы на 334 нм, характерной для GS-NO, до 330 нм, обусловленное, как это было показано в наших предыдущих работах, появлением полосы оптического поглощения ионов Fe^{3+} на 302 нм, накладывающейся на полосу поглощения RS-NO [17]. Причиной появления этих ионов было, очевидно, окисление кислородом воздуха ионов Fe^{2+} , выходящих из Б-ДНКЖ.

В заключение этого раздела обратим внимание на один факт, характерный для распада Б-ДНКЖ с GSH и MS, синтезированных при низкой (20 мМ) концентрации GSH и MS. При этой концентрации скорость реакции образования обоих Б-ДНКЖ могла быть недостаточно высокой, так что из-за быстрого осаждения железа в форме гидроокисных комплексов (и, как следствие этого, выключения части железа из реакции, приведенной на схеме 2) в Б-ДНКЖ могла «не успеть» включиться часть соответствующих RS-NO, участвующих в соответствии со схемой 2 в образовании этих комплексов. В результате спектр поглощения растворов Б-ДНКЖ мог представлять собой, как это показано на рис. 2а, сумму спектра поглощения Б-ДНКЖ с пониженной концентрацией и полосы поглощения RS-NO на 334 нм. Совпадение формы такого суммарного спектра, приведенного на рис. 2а (спектр 1), и спектра, приведенного на рис. 2б (спектр 1), позволяет говорить о сохранении в растворе Б-ДНКЖ-GSH значительного количества GS-NO, не включившегося в комплекс. В результате появляющаяся после распада Б-ДНКЖ-GSH полоса поглощения на 334 нм (рис. 2б, спектр 3) могла определяться не только GS-NO, обусловленным высвобождением из Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония, но и исходным GS-NO, сохранившимся в растворе. К счастью, в нашем случае вклад последнего в полосу поглощения оказался, судя по материалу, иллюстрируемому на рис. 2, примерно равным вкладу GS-NO, возникшему при участии катионов нитрозония, так что и в этом случае можно утверждать, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами сами по себе способны выступать в качестве источников катионов нитрозония.

ОБСУЖДЕНИЕ

Главный результат проведенных исследований состоит в том, что он полностью согласуется с нашим, ранее сделанным утверждением о том, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут выступать в качестве источников (доноров) катио-

нов нитрозония (NO^+) (5–8, 13). Наиболее убедительно об этом говорят результаты наших опытов, в которых было продемонстрировано высвобождение NO^+ из Б-ДНКЖ в кислотной среде в анаэробных условиях, сопровождавшееся образованием соответствующих RS-NO. Поскольку концентрация последних практически была равна концентрации ЖДФ, есть основание полагать, что в этих фрагментах половина из двух нитрозильных лигандов может находиться в форме катиона нитрозония, а вторая – в форме нейтральной молекулы NO.

Главным препятствием, затруднявшим обнаружение катионов NO^+ , высвобождавшихся в анаэробных условиях из ДНКЖ, была способность этих катионов восстанавливаться по одноэлектронному механизму, очевидно, под действием имевшихся в растворе тиолов до нейтральных, «летучих» молекул NO. Этот процесс начинал ослабляться при снижении соотношения свободные тиолы : Б-ДНКЖ до 1 : 1 и полностью подавлялся при отсутствии свободных тиолов в растворе, что и позволило обнаружить катионы нитрозония, высвобождающиеся из этих комплексов по полосе оптического поглощения RS-NO, возникающих при связывании катионов нитрозония с тиолами, также высвобождающимися из Б-ДНКЖ.

Следует отметить, что одноэлектронное восстановление NO^+ тиолами самими по себе без участия в этом процессе других агентов невозможно из-за нарушения закона сохранения спина в этой реакции [18]. Если бы такая реакция имела место, то исходно диамагнитная пара реагентов (RS^- и NO^+) с суммарным спином $S = 0$ давала бы продукты – тиольный радикал и молекулу NO со спином для обоих $S = 1/2$, так что их суммарный спин был бы равен 1, т.е. не равен суммарному спину исходных реагентов. Преодолеть это неравенство можно при включении в эту реакцию спиновых катализаторов, способных изменить спин одного или обоих реагентов. В качестве такого катализатора, обеспечивавшего одноэлектронное восстановление NO^+ тиолсодержащим лигандом в ходе распада Б-ДНКЖ, могли бы выступать атомы железа, все еще сохранявшие химическую связь с тиолами и катионом нитрозония. Спиновая плотность на атоме железа могла инициировать спиновую поляризацию неподеленной пары электронов в атоме тиоловой серы, инициируя переход этого атома в триплетной состоянии (с $S = 1$) [18]. В результате одноэлектронное восстановление NO^+ до NO тиоловой группой полностью бы соответствовало закону сохранения спина в химической реакции и это превращение должно было реализоваться. Поскольку согласно закону действующих масс эф-

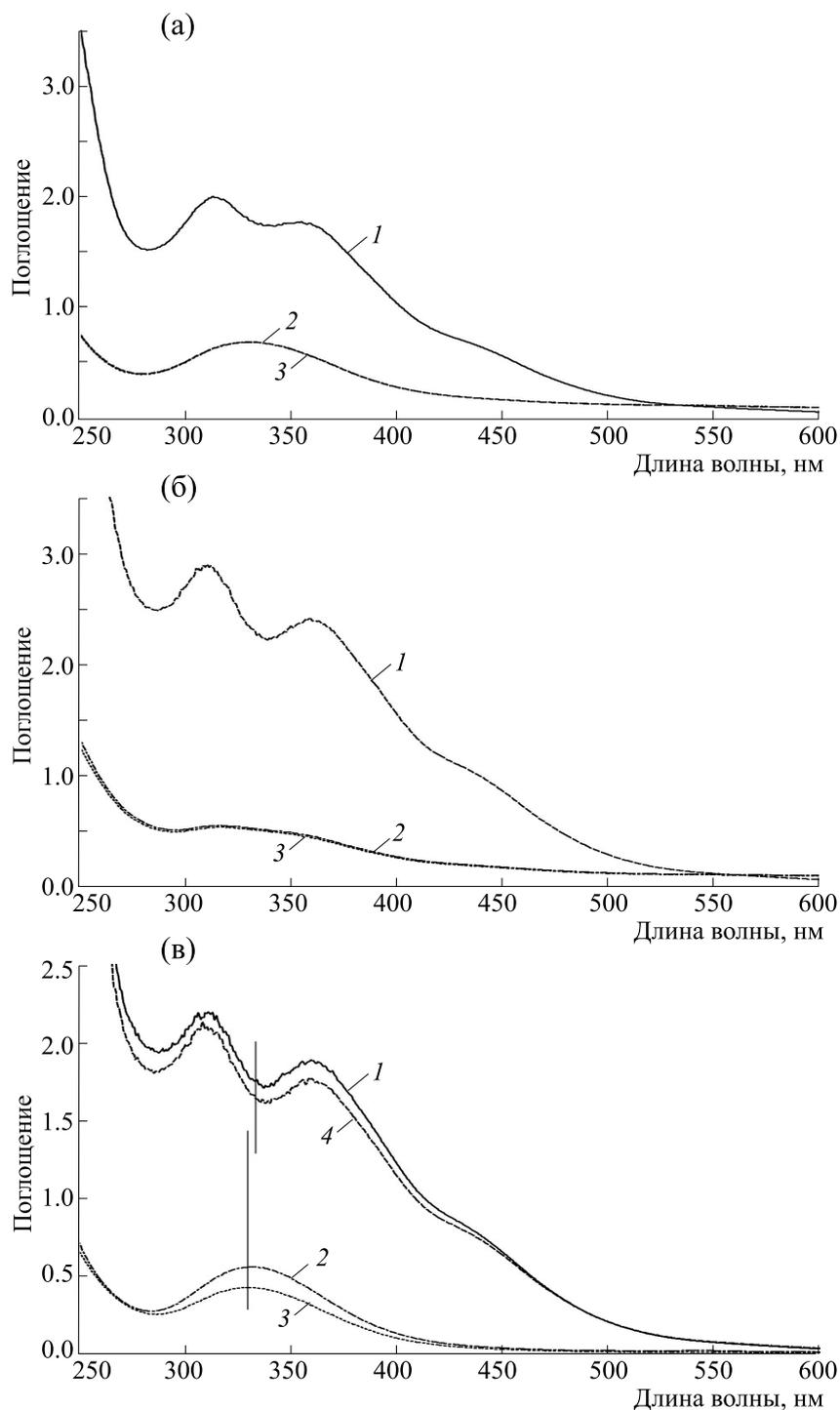


Рис. 6. Эволюция спектров поглощения комплексов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношении $MS : Fe^{2+} : \text{нитрит}$, равном 20 : 20 : 20 мМ (а) или 40 : 20 : 20 мМ ((б) и (в)) с последующей инкубацией растворов этих комплексов после их подкисления до pH 1.0 при 80°C в анаэробных (рис. (а) и (б)) или в аэробных условиях (рис. (в)). На рис. (а) и (б) спектры 1 – исходные растворы комплексов Б-ДНКЖ-GSH, спектры 3 и 2 – соответственно через 5 и 15 мин после прогрева растворов при pH 1.0 с последующим добавлением к растворам избытка глутатиона; на рис. (в) спектры 4, 3 и 2 – соответственно через 1 мин после подкисления раствора, последующего прогрева в течение 1 мин при 80°C и добавления избытка глутатиона. Спектры зарегистрированы для растворов Б-ДНКЖ-GSH, разбавленных в 20 раз. На рис. (в) вертикальные линии проведены на 330 и 334 нм.

фективность этой реакции должна возрастать при повышении концентрации тиолов в растворе, восстановление NO^+ до NO должно было в этом случае усиливаться, что мы и наблюдали в растворах Б-ДНКЖ при повышении в них соотношения свободный тиол : Б-ДНКЖ до 2 : 1 и более. Проведенные нами ранее измерения оптического поглощения NO в газовой фазе показали, что, действительно, при таком соотношении оба нитрозильных лиганда в ЖДНФ высвобождаются из них в форме молекул NO [7, 8, 13]. Результаты же настоящей работы показывают, что при снижении соотношения свободный тиол : Б-ДНКЖ до нуля только половина нитрозильных лигандов высвобождается в этой форме, тогда как другая половина — в форме катионов нитрозония.

Этот результат позволяет разобраться в обнаруженном нами диссонансе результатов опытов по распаду использованных Б-ДНКЖ в кислой среде в аэробных условиях. Из этих опытов можно было сделать два взаимоисключающих вывода: либо катионы нитрозония действительно могут высвобождаться из Б-ДНКЖ, образуя значительную часть соответствующих RS-NO , либо их в Б-ДНКЖ вообще нет, а RS-NO образуются при распаде Б-ДНКЖ в реакции тиолов с азотистой кислотой, появившейся в кислой среде в результате гидролиза аддукта NO и диоксида азота ($?\text{NO}_2$) — продукта окисления кислородом воздуха NO , высвободившегося из Б-ДНКЖ. Поскольку опыты с распадом Б-ДНКЖ в анаэробных условиях показали, что катионы нитрозония в этих комплексах, действительно, существуют и высвобождаются из этих комплексов при низкой концентрации свободных тиолов, есть основание утверждать, что и в аэробных условиях, приводящих к окислению свободных тиолов до дисульфидной формы, этот процесс идет и обеспечивает появление в растворе RS-NO в концентрации, равной уровню ЖДНФ. Что же касается дополнительной части RS-NO , появляющейся при добавлении в раствор избытка глутатиона, эта часть RS-NO образуется в реакции добавленного глутатиона с азотистой кислотой, возникающей при гидролизе триоксида азота — аддукта NO , высвобождающегося из ДНКЖ, и NO_2 , образующегося при окислении части молекул NO .

Ранее мы показали, что наиболее эффективное высвобождение катионов нитрозония достигается обработкой М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами производными дитиокарбамата ($\text{R}_2\text{N-CS}_2^-$). Последние способны эффективно акцептировать из ЖДНФ железо-мононитрозильную ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$) группу с образованием устойчивых мононитрозильных комплексов железа

(МНКЖ) с производными дитиокарбамата и высвобождением из ДНКЖ катионов нитрозония [14, 19, 20].

Такого рода обработка сирийских хомячков, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, распыленными в небулайзере растворами сначала Б-ДНКЖ-GSH, а затем диэтилдитиокарбамата приводила к резкому подавлению размножения вируса в носовой и легочной ткани этих животных [21], тогда как обработка животных только Б-ДНКЖ приводила к существенно более слабому лечебному эффекту. Сам диэтилдитиокарбамат не влиял на этот процесс [21]. Столь слабое лечебное действие Б-ДНКЖ-GSH было, по-видимому, обусловлено высокой стабильностью этих комплексов, затруднявшей их распад в организме животных. В связи с этим есть основание предполагать, что Б-ДНКЖ-MS из-за их слабой устойчивости и без диэтилдитиокарбамата могут оказать, как доноры NO^+ , заметное лечебное действие на животных, а возможно, и человека, инфицированных SARS-CoV-2.

Не исключено, что такая же биологическая активность может появиться и у Б-ДНКЖ-GSH при снижении соотношения свободный GSH : Б-ДНКЖ-GSH до 1 и ниже (ранее мы использовали в наших опытах на сирийских хомячках растворы Б-ДНКЖ-GSH при двукратном превышении свободного глутатиона над уровнем комплексов). Это снижение, во-первых, в соответствии с законом действующих масс снизит устойчивость этих комплексов, а во-вторых, ослабит процесс восстановления катионов нитрозония до NO и тем самым повысит эффективность токсического действия Б-ДНКЖ-GSH на патогенный вирус.

В настоящее время нет данных, которые позволили бы достоверно говорить о механизме этого действия. Наиболее вероятным представляется предположение о том, что мишенью действия катионов нитрозония являются тиоловые группы жизненно важных для размножения вируса протеаз — протеазы хозяина и протеазы, продуцируемой в организме хозяина вирусом. S-нитрозирование этих групп катионами нитрозония приводит к ингибированию этих белков и тем самым к ослаблению размножения вируса [21].

Впервые экспериментальные данные о более эффективном цитотоксическом действии катионов нитрозония по сравнению с аналогичным действием молекулярного NO , а точнее — продукта его конденсации с анионом супероксида — пероксинитрита, — были получены в работе [22]. В экспериментах на культуре фибробластов было показано, что в дозовом отношении катионы нитрозония, высвобождающиеся из анионов

нитропрусида $[(CN^-)_5Fe^{3+}NO^+]^{2-}$, в 40 раз более цитотоксичны, чем молекулы NO. Более того, катионы NO^+ при концентрации 20 мкМ вызывали апоптоз у 50% фибробластов уже через 2 ч после добавления нитропрусида, тогда как аналогичное действие на клетки молекулы NO при концентрации 800 мкМ оказывали лишь через 24 ч после добавления в клеточную культуру газообразного NO или его доноров – GS-NO или NAC-NO. Однако в этих экспериментах остался без ответа вопрос – не было ли цитотоксическое действие нитропрусида обусловлено высвобождением из него анионов цианида. Более убедительные данные о цитотоксическом действии катионов нитрозония были получены в работе [20] в экспериментах по одновременной обработке опухолевых клеток Jurkat человека M-ДНКЖ с тиосульфатом и производным дитиокарбамата – N-метил-D,L-глукаминдитиокарбаматом. Оказалось, что при действии этой смеси эффективность цитотоксикоза существенно превышала суммарное действие M-ДНКЖ и N-метил-D,L-глукаминдитиокарбамата, рассчитанное при условии, что эти агенты не вступают в реакцию друг с другом. Между тем такая реакция, как было сказано выше, должна была иметь место и должна была приводить с одной стороны к образованию устойчивых МНКЖ с N-метил-D,L-глукаминдитиокарбаматом, «выводящих из игры» молекулы NO, исходно входившие в состав M-ДНКЖ с тиосульфатом, а с другой стороны – к высвобождению из этих комплексов катионов нитрозония, которые, очевидно, и оказывали, как полагают авторы, эффективное цитотоксическое действие на клетки Jurkat [20].

Подход с использованием производного дитиокарбамата для синэнергетического усиления цитотоксического действия этого агента и ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на биосистемы был использован нами при изучении влияния этих агентов на организм животных, о чем было сказано выше, а также на культуру опухолевых клеток MCF-7 человека [19] и бактерии *Escherichia coli* [23]. Обнаруженное в этих работах необычайно резкое (синэнергетическое) усиление цитотоксического действия ДНКЖ на эти биосистемы под влиянием производных дитиокарбамата – N-метил-D,L-глукаминдитиокарбамата и диэтилдитиокарбамата свидетельствует о том, что именно катионы нитрозония как одно из производных одного из универсальных регуляторов метаболических процессов – оксида азота – ответственны за цитотоксическое действие системы оксида азота, функционирующей во всех представителях живого мира.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T.-T. Lu, Y.-M. Wang, C.-H. Hung, et al., *Inorg. Chem.*, **57**, 12425 (2018).
2. S.-L. Cho, C.-J. Liao, and T.-T. Lu, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **24**, 495 (2019).
3. N. Lehnert, E. Kim, H.T. Dong, et al., *Chem. Rev.*, **121**, 14682 (2021).
4. A. F. Vanin, *Dinitrosyl iron complexes as a “working form” of nitric oxide in living organisms* (Cambridge Scholar Publishing, Cambridge, UK, 2019).
5. A. F. Vanin, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10356 (2021).
6. A. F. Vanin, *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 279 (2019).
7. А. Ф. Ванин, *Биофизика*, **65**, 421 (2020).
8. A. F. Vanin, *Appl. Magn. Res.*, **51**, 851 (2020).
9. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 191 (1997).
10. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.*, 878236 (2011).
11. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **23**, 136 (2010).
12. В. Д. Микоян, Е. Н. Бургова, Р. Р. Бородулин и др., *Биофизика*, **65**, 1142 (2020).
13. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmac. Chem.*, **5**, 1109 (2018).
14. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **66**, 1 (2013).
15. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 191 (1997).
16. J. A. Farrar, R. Grinter, D. L. Pountney, et al., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2703 (1993).
17. А. Ф. Ванин, В. Д. Микоян и Н. А. Ткачев, *Биофизика*, **67**, 1047 (2022).
18. A. L. Buchachenko and V. L. Berdinsky, *J. Phys. Chem.*, **100**, 1988 (1996).
19. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, *Cell Biochem. Biophys.*, **79**, 93 (2021).
20. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., *Free Rad. Biol. Chem.*, **40**, 1349 (2006).
21. А. В. Шиповалов, А. Ф. Ванин, О. В. Пьянков и др., *Биофизика*, **67**, 969 (2022).
22. S. Khan, M. Kayahara, U. Joashi, et al., *J. Cell Sci.*, **110**, 2315 (1997).
23. А. Ф. Ванин, Д. И. Телегина, В. Д. Микоян и др., *Биофизика*, **67**, 938 (2022).

Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as Sources of Universal Cytotoxins – Nitrosonium Cations

A.F. Vanin* and N.A. Tkachev*

**N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

It was shown that the release of a half of nitrosyl ligands from dinitrosyl iron units in the form of nitrosonium cation (NO^+) from binuclear dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (B-DNIC) during DNIC decomposition in acid solutions is increased with the decrease of the stability of these complexes and completely blocked with the increase of the concentrations of free thiols (non-included into B-DNIC) up to the level that was two times and more than that of dinitrosyl iron units. It was demonstrated that the less stable B-DNIC with mercaptosuccinate degrade in an acidic environment at ambient temperature, while the decomposition of more stable B-DNIC with glutathione was only marked when the solution was heated at 80°C. The inhibition of NO^+ release from B-DNIC in the presence of elevated free thiol level in the solution was due to the ability of free thiols to induce the reduction of NO^+ to NO.

Keywords: iron dinitrosyl complexes, S-nitrosothiols, nitrosonium cation, nitrite, nitric oxide