

Взаимодействие феррицитохрома С с нитрозильным комплексом железа $\{\text{Fe}_2[\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3]_2(\text{NO})_4\}\text{SO}_4 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$

Н. А. Санина, Л. А. Сырцова,* Н. И. Шкондина, Т. Н. Руднева, А. И. Котельников, С. М. Алдошин

Институт проблем химической физики Российской академии наук,
Российская Федерация, 142432 Черноголовка Московской обл., просп. Акад. Семенова, 1.
Факс: (496) 524 9676. E-mail: syrsova@icp.ac.ru

На примере нитрозильного цистеаминового комплекса железа $\{\text{Fe}_2[\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3]_2(\text{NO})_4\}\text{SO}_4 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (ЦАК) впервые показано, что в результате гидролиза донора NO в присутствии феррицитохрома С (cyt c^{3+}) образуется железонитрозильный комплекс NO— cyt c^{3+} . Установлено, что cyt c^{3+} может служить «депо» для NO, выделяющегося при гидролизе ЦАК. В присутствии ЦАК скорость разложения комплекса NO— cyt c^{3+} на NO и cyt c^{3+} зависит от мольного отношения $[\text{cyt c}^{3+}] : [\text{ЦАК}]$ и при $[\text{cyt c}^{3+}] : [\text{ЦАК}] = 0.3$ оказывается меньше, чем та, которая реализуется при разложении ЦАК в отсутствие cyt c^{3+} . В результате суммарный процесс выделения NO становится более пролонгированным в 5.6 раза. По реакции ЦАК с cyt c^{3+} в присутствии феррицианида можно определить число групп NO, которые выделяются из ЦАК: при самопроизвольном гидролизе ЦАК (pH 7.0) в раствор высвобождается не более одной группы NO, а из окисленного ЦАК — не менее трех.

Ключевые слова: цитохром С, феррицитохром С, нитрозильные комплексы железа, доноры NO, нитрозильные комплексы цитохромов.

Интенсивные исследования по поиску новых экзогенных доноров монооксида азота (NO), проводимые в последние годы, направлены на создание новых способов генерации NO — одного из необходимых и универсальных регуляторов функций клеточного метаболизма¹. Использование в клинике препаратов, которые в физиологических условиях продуцируют NO, имеет существенные недостатки, связанные с их нитратной толерантностью, необходимостью дополнительной активации и др. Синтезированные в Институте проблем химической физики РАН^{2,3} модели активных центров негемовых железо-серных белков — нитрозильные комплексы железа (НКЖ) с функциональными серосодержащими лигандами — генерируют NO в водном растворе самопроизвольно в результате гидролиза и являются перспективными пролекарствами нового поколения^{4,5}. Представляет интерес изучение механизмов действия соединений этого класса как доноров NO на функцию гемовых белков с целью возможного использования их в качестве потенциальных лекарственных препаратов вазодилаторного, антигипертензивного и антиагрегационного действия.

Ранее^{2,3} установлено, что НКЖ нитрозилируют гемоглобин (Hb). Образующийся комплекс HbNO обеспечивает стабилизацию NO (поскольку время жизни свободного NO в клетке составляет секунды⁶) и определяет пролонгированность действия НКЖ как доноров NO. Кроме Hb образовывать достаточно прочные нитрозильные комплексы может цитохром С (cyt c), несмотря на то что атом Fe в геме cyt c полностью координирован четырьмя атомами N порфирина,

а также аминокислотами гистидином-18 и метионином-80 (см. лит.⁷).

Реакции NO с цитохромом С имеют большое значение. Комплекс NO— cyt c^{3+} является временным «депо» оксида азота в организме и при определенных условиях может высвобождать NO. Известно, что cyt c — важнейший компонент дыхательной цепи — играет значительную роль в процессах клеточного энергообразования, являясь регулятором окислительных процессов в клетке⁷. Он осуществляет перенос электрона в терминальном звене дыхательной цепи митохондрий. Блокирование этого процесса нарушает нормальное энергообеспечение клетки. Цитохром С принимает активное участие в транспортных процессах через внутреннюю мембрану митохондрий. Ферри- и ферро-формы cyt c (cyt c^{3+} и cyt c^{2+} соответственно) способны избирательно связывать различные катионы и анионы, АТФ и АДФ⁷ и регулировать их транспорт в митохондриях. Ионотранспортная функция cyt c имеет большое значение для поддержания физиологического — электрохимического — потенциала сопрягающей мембраны и связанного с ним процесса образования АТФ. Установлено, что содержание cyt c изменяется при различных заболеваниях — оно понижено при хронической гипохромной анемии, злокачественных новообразованиях и при острой кровопотере. Кроме того, известно, что нитрозильные комплексы cyt c обладают фоточувствительностью и могут разрушаться под действием излучения видимого диапазона. Это имеет терапевтический эффект: лазерное излучение служит инструментом, при помощи которого можно воздей-

ствовать на пероксидазную активность сурь с и на апоптоз⁷. Таким образом, из изложенного выше следует, что образование нитрозильных комплексов сурь с способно влиять на процессы метаболизма в очень широких границах. Это может обусловить различные свойства НКЖ как лекарств, если они будут включены в качестве доноров NO в метаболизм сурь с. Целью данной работы является исследование взаимодействия нового представителя НКЖ — водорастворимого катионного нитрозильного цистеаминового комплекса $\{Fe_2[S(CH_2)_2NH_3]_2(NO)_4\}SO_4 \cdot 2.5H_2O$ (ЦАК)⁸ с сурь с³⁺. До настоящего времени ни один из доноров NO не исследовался в реакциях нитрозилирования сурь с.

Экспериментальная часть

В работе использовали цитохром С из сердца лошади («Serva», Германия), сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция), $Na_2HPO_4 \cdot 6H_2O$ и $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ («MP Biomedicals», Германия), $Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ и $NaNO_2$ («Aldrich», США), $K_3Fe(CN)_6$ («х.ч.», «Химмед», Россия). Воду очищали перегонкой в дистилляторе «Bi/Duplex» (Германия).

Спектры поглощения записывали на спектрофотометре «Specord M-40», снабженном интерфейсом для компьютерной регистрации спектров и термостатируемым кюветным отделением.

Все операции проводили в атмосфере азота высокой чистоты, который дополнительно очищали пропусканием через колонку с хромоникелевым катализатором. Для перевода в атмосферу азота буфера и рабочих растворов через них пропускали 30 мин азот при перемешивании на магнитной мешалке. Далее такие растворы будем называть анаэробными. Все используемые сосуды и кварцевые кюветы были герметизированы с помощью резиновых затворов «Rubber Septa» («Sigma»), позволяющих вводить через иглу газ или нужные компоненты. Растворы переносили из одного сосуда в другой либо с использованием шприцов с припаянными иглами, либо под избыточным давлением азота посредством двух игл, соединенных тефлоновыми капиллярами. Избыточное давление сбрасывали через другую иглу, на которую был надет тефлоновый капилляр, погруженный в воду. Кюветы и сосуды объемом 4 и 10 мл соответственно с навесками реагентов продували через иглы азотом в течение 30 мин.

Тетранитрозилбис(цистеаминилтио)дизелезо (ЦАК) синтезировали по описанной ранее методике⁸. Элементный анализ полученного поликристаллического порошка выполнен в Аналитическом центре Института проблем химической физики РАН. Найдено (%): С, 8.53; Н, 2.77; N, 15.70; S, 17.71. $C_4H_{19}Fe_2N_6O_{10.5}S_3$. Вычислено (%): С, 9.10; Н, 3.60; Fe, 21.25; N, 15.93; O, 31.87; S, 18.27.

Раствор сурь с³⁺ готовили из коммерческого препарата сурь с³⁺, содержащего 10% сурь с²⁺. На всех стадиях получения сурь с³⁺ и во всех экспериментах с ним использовали 0.05 М фосфатный буфер (рН 7.0). Коммерческий цитохром С (9 мг) растворяли при перемешивании в 3 мл 0.05 М фосфатного буфера (рН 6.5), затем прибавляли 0.1 мл раствора феррицианида калия ($2 \cdot 10^{-2}$ моль \cdot л⁻¹) в 0.05 М фосфатном буфере (рН 6.5). Окисление сурь с³⁺ проводили при перемешивании в течение 10 мин при 10 °С. Записывали спектр поглощения аликвоты раствора и по совпадению максимума поглощения и коэффициента экстинкции с литературными данными⁹ подтверждали, что получен сурь с³⁺. Избыток феррицианида калия удаляли на колонке (2 \times 15 см, се-

фадекс G-25), предварительно пропустив 3 объема колонки (150 мл) фосфатного буфера рН (7.0). На выходе из колонки собрали 5.8 мл сурь с³⁺ ($9.9 \cdot 10^{-5}$ моль \cdot л⁻¹). Хранили сурь с³⁺ замороженным в виде шариков в жидком азоте. Перед использованием сурь с³⁺ размораживали в сосуде объемом 5 мл в токе азота. Показателем нативности и гомогенности сурь с³⁺ служило совпадающее с литературными данными отношение экстинкций всех максимумов поглощения. В тех случаях, когда реакционные смеси исследовали в присутствии феррицианида, предварительного доокисления коммерческого сурь с³⁺ не проводили. Раствор феррицианида вносили в кювету с сурь с³⁺ и записывали спектр поглощения для проверки полноты окисления.

Взаимодействие NO с сурь с³⁺. В анаэробную опытную кювету объемом 4 мл (длина оптического пути 1 см) вводили 2.5 мл сурь с³⁺ (рН 7.0), приготовленного, как описано выше. Записывали спектр поглощения. Затем из газометра подавали NO в кювету в течение 3 мин, встряхивая раствор сурь с³⁺. Записывали спектр поглощения раствора и подтверждали, что получили NO—сурь с³⁺.

Гидролиз ЦАК при рН 7.0. В анаэробную опытную кювету объемом 4 мл (длина оптического пути 1 см) вводили 2 мл 0.05 М фосфатного буфера (рН 7.0). К навеске комплекса ЦАК в сосуде, заполненном азотом, прибавляли 0.05 М анаэробный фосфатный буфер (рН 7.0) с расчетом, чтобы получить раствор комплекса с концентрацией $6 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹. Далее раствор перемешивали 15 мин до полного растворения комплекса. Вводили 1 мл полученного раствора комплекса в опытную кювету. Кювета сравнения содержала 3 мл анаэробного буфера. Конечная концентрация ЦАК составляла $2 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹. Спектры поглощения записывали через 30 с после введения ЦАК и затем с интервалами 15 мин в течение 3 ч.

Гидролиз ЦАК при рН 7.0 (в присутствии феррицианида). В анаэробную опытную кювету объемом 4 мл (длина оптического пути 1 см) вводили 1.7 мл 0.05 М фосфатного буфера (рН 7.0) и 1 мл полученного раствора комплекса ЦАК. Кювета сравнения содержала 2.7 мл анаэробного буфера. Конечная концентрация ЦАК составляла $2 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹. Записывали спектр поглощения раствора. Затем вводили по 0.3 мл раствора феррицианида калия с концентрацией $2 \cdot 10^{-2}$ моль \cdot л⁻¹ в опытную кювету и в кювету сравнения. Спектры поглощения записывали через 30 с после введения феррицианида калия и затем с интервалами 2—3 мин в течение 1.5 ч.

Кинетика взаимодействия сурь с³⁺ с ЦАК. В анаэробную кювету объемом 4 мл (длина оптического пути 1 см) вводили 2 мл приготовленного ранее раствора сурь с³⁺ до концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ моль \cdot л⁻¹. Далее вводили по 1 мл раствора ЦАК ($6 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹) в кювету с сурь с³⁺ и в кювету сравнения, содержащую 2 мл анаэробного буфера. Конечная концентрация ЦАК составляла $2 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹. Спектры поглощения записывали через 30 с после введения ЦАК и затем с интервалами 15 мин в течение 1.5 ч.

Кинетика взаимодействия сурь с³⁺ с ЦАК в присутствии феррицианида калия. При изучении кинетики взаимодействия сурь с³⁺ с ЦАК в присутствии феррицианида калия использовали молярные отношения $[сурь с^{3+}] : [ЦАК] = 0.3, 4.3$ и 7.85 . Для этого в опытную кювету вводили 1.7, 2.0 и 2.36 мл раствора коммерческого сурь с³⁺ в фосфатном буфере (рН 7.0) с концентрацией $10^{-4}, 10^{-4}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹ соответственно, 0.3 мл раствора феррицианида калия с концентрацией $4 \cdot 10^{-2}$ моль \cdot л⁻¹ и такое количество буфера, чтобы после прибавления раствора ЦАК объем реакционного раствора составлял 3.0 мл. Записывали спектр поглощения раствора и подтверждали, что получили сурь с³⁺. Кювета сравнения содержала 0.3 мл

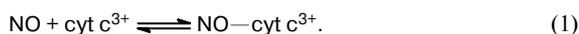
феррицианида калия ($4 \cdot 10^{-2}$ моль \cdot л $^{-1}$) и 1.7, 2.62 и 2.6 мл анаэробного буфера соответственно. Реакцию инициировали прибавлением одновременно в опытную кювету и кювету сравнения 1.0, 0.08 и 0.1 мл раствора ЦАК ($6 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л $^{-1}$) соответственно. Далее записывали разностные спектры поглощения через определенные интервалы времени. Регистрацию спектров проводили до полного превращения $\text{cyt } c^{3+}$ в комплекс $\text{NO—cyt } c^{3+}$, когда спектр переставал изменяться.

Определение количества комплекса $\text{NO—cyt } c^{3+}$. Для определения концентрации образовавшегося комплекса спектр поглощения реакционной системы, содержащей $\text{cyt } c^{3+}$ и $\text{NO—cyt } c^{3+}$, с помощью компьютерной обработки программой MathCad разлагали на составляющие — спектры $\text{cyt } c^{3+}$ и $\text{NO—cyt } c^{3+}$, как описано ранее².

Обсуждение полученных результатов

Рассмотрим основные свойства нитрозилированных цитохромов. Структурные исследования $\text{cyt } c$ показывают^{10–13}, что группа гема служит каркасом, на который наматывается пептидная цепь; числа аминокислотных остатков цитохрома С (104) хватает на образование полипептидной оболочки вокруг гема. Как в окисленной, так и в восстановленной формах белка кроме основных порфириновых лигандов, занимающих четыре координационных положения атома Fe, пятое и шестое координационные положения занимают метионин-80 (Met80) и гистидин-18¹⁴ (рис. 1). Редокс-потенциал $\text{cyt } c$ при 25 °С и pH 7.0 по отношению к водородному электроду равен 0.254 В (см. лит.¹⁵). Несмотря на то, что в геме $\text{cyt } c$ все координационные места заняты, он может реагировать с NO. При взаимодействии NO с гемом происходит разрыв связи между остатком метионина и ионом железа с последующим замещением метионина на NO в качестве шестого лиганда.

Происходит обратимое образование аддукта $\text{NO—cyt } c^{3+}$:



Для этой реакции^{9,16} константа ассоциации ($k_{\text{ас}}$) составляет $7.2 \cdot 10^2$ л \cdot моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$, константа диссоциации ($k_{\text{дис}}$) — $4.4 \cdot 10^{-2}$ с $^{-1}$, константа равновесия ($K_{\text{ср}}$) равна $1.6 \cdot 10^4$ л \cdot моль $^{-1}$.

Более низкие по сравнению с Hb скорости реакций и константы равновесия обусловлены энергетиче-

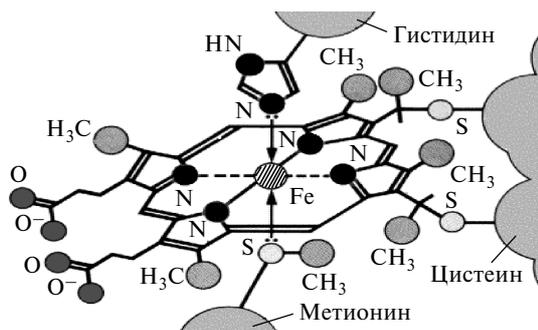


Рис. 1. Структура гема $\text{cyt } c$ (см. лит.¹⁴).

ратами, связанными с замещением шестого лиганда. Действительно, $\text{cyt } c$, в котором Met80 алкилирован и, следовательно, гемовое железо имеет пятикоординированную структуру, обладает на три порядка более высоким сродством к NO ($2 \cdot 10^7$ л \cdot моль $^{-1}$), чем нативный белок⁹. При взаимодействии $\text{cyt } c^{3+}$ с NO наблюдаются изменения в спектре поглощения¹⁷: спектр комплекса $\text{NO—cyt } c^{3+}$ имеет максимумы при $\lambda = 415$ ($\epsilon = 1.45 \cdot 10^5$ л \cdot моль $^{-1} \cdot$ см $^{-1}$), 527 ($\epsilon = 1.0 \cdot 10^4$ л \cdot моль $^{-1} \cdot$ см $^{-1}$) и 560 нм¹⁶.

В связи с поставленной в настоящей работе задачей исследовать взаимодействие ЦАК с $\text{cyt } c^{3+}$ нами были получены препаративные количества $\text{cyt } c^{3+}$ из коммерческого препарата $\text{cyt } c$. С этой целью коммерческий $\text{cyt } c$, представляющий собой смесь $\text{cyt } c^{3+}$ (90%) и $\text{cyt } c^{2+}$ (10%), доокисляли феррицианидом калия. Поскольку взаимодействие $\text{cyt } c^{3+}$ с NO при pH 7.0 сопровождается изменением спектра поглощения, можно было регистрировать кинетику и определять константу скорости реакции ЦАК с $\text{cyt } c^{3+}$ при pH 7.0 по количеству образовавшегося $\text{NO—cyt } c^{3+}$.

Несмотря на то, что $\text{cyt } c^{3+}$ в индивидуальном состоянии не реагирует с кислородом, всю работу с ЦАК, а также все последующие реакции ЦАК с $\text{cyt } c^{3+}$ проводили в атмосфере азота, так как NO быстро взаимодействует с O_2 , давая оксиды азота; константа скорости этой реакции составляет $2 \cdot 10^6$ (л \cdot моль $^{-1}$)² \cdot с $^{-1}$ (см. лит.¹⁸).

Прежде всего была оценена устойчивость ЦАК при pH 7.0. Для этого регистрировали изменения спектра поглощения раствора ЦАК в буфере (pH 7.0) в диапазоне $\lambda = 450–650$ нм. Далее строили кинетические зависимости изменения оптической плотности (A) при $\lambda = 450$ нм (рис. 2). Оказалось, что при pH 7.0

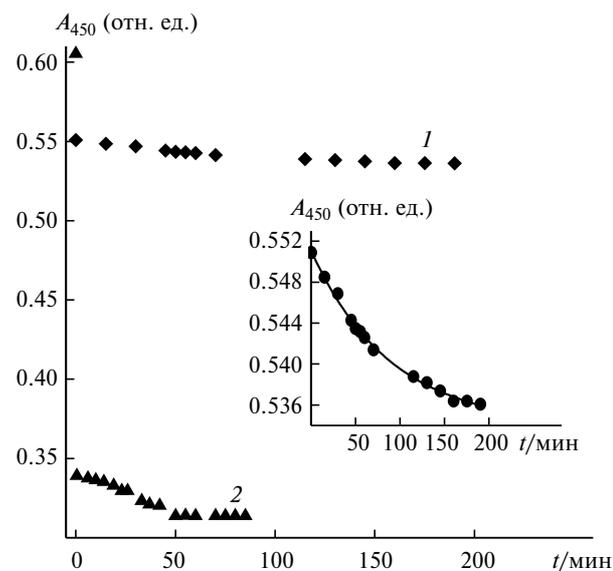


Рис. 2. Кинетика гидролиза ЦАК ($2 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л $^{-1}$) в отсутствие (1) и в присутствии феррицианида ($4 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$) (2). На врезке — кинетика реакции гидролиза ЦАК в отсутствие феррицианида после компьютерной обработки кривой 1. Условия реакции: 23 °С, растворитель — 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.0.

ЦАК довольно устойчив (см. рис. 2, кривая 1). Во врезке на рисунке 2 представлен результат обработки кинетических данных с помощью компьютерной программы MathCad. Кинетическая зависимость удовлетворяет реакции первого порядка, ее константа скорости равна $(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

На рисунке 3 представлены спектры поглощения $\text{сут } \text{с}^{3+}$ с максимумом при $\lambda = 531 \text{ нм}$ и $\text{NO—сут } \text{с}^{3+}$ с двумя максимумами при $\lambda = 530$ и 562 нм . Установлено, что даже в течение суток спектр поглощения $\text{NO—сут } \text{с}^{3+}$ (см. рис. 3) не изменяется, так как присутствует избыток NO .

Затем нами было исследовано непосредственно взаимодействие ЦАК с $\text{сут } \text{с}^{3+}$. Эта реакция должна включать по крайней мере две стадии: гидролиз ЦАК и дальнейшее обратимое взаимодействие выделившегося NO с $\text{сут } \text{с}^{3+}$ (см. уравнение (1)).

Для изучения этой реакции проводили инкубацию компонентов реакционных систем (см. Экспериментальную часть) в анаэробных условиях (в атмосфере азота) при $23 \text{ }^\circ\text{C}$. Записывали разностные спектры поглощения во времени реакционных систем и раствора в контрольной кювете, содержащих ЦАК в одинаковых концентрациях, поскольку ЦАК поглощает в видимой области спектра. Регистрацию прекращали, когда спектр поглощения переставал изменяться.

На рисунке 4 представлены результаты исследования реакции ЦАК с $\text{сут } \text{с}^{3+}$. Спектр 1 соответствует исходному $\text{сут } \text{с}^{3+}$. Видно, что сразу после добавления ЦАК в кювету с $\text{сут } \text{с}^{3+}$ регистрируется спектр $\text{сут } \text{с}^{2+}$ с двумя максимумами при $\lambda = 521$ и 551 нм (см. лит.^{9,16}). Это объясняется тем, что редокс-потенциал ЦАК при $\text{pH } 7.0$ по отношению к водородному электроду равен примерно -0.8 В по аналогии с близкими по структуре соединениями¹⁹, а редокс-потенциал $\text{сут } \text{с}^{3+}$ в этих же условиях составляет 0.254 В . Поэтому легко проходит реакция восстановления, и при такой большой разнице редокс-потенциалов весь $\text{сут } \text{с}^{3+}$ переходит в $\text{сут } \text{с}^{2+}$. Поскольку $\text{сут } \text{с}^{2+}$ при $\text{pH } 7.0$ реагирует с NO очень медленно²⁰, образования $\text{NO—сут } \text{с}^{2+}$ (максимумы в спектре поглощения при $\lambda = 541$

и 565 нм)^{9,16} не наблюдается (см. рис. 4). Небольшие изменения спектра обусловлены незначительным увеличением с течением времени концентрации $\text{сут } \text{с}^{2+}$.

Для того чтобы исключить возможность восстановления $\text{сут } \text{с}^{3+}$ соединением ЦАК, эту реакцию проводили в присутствии феррицианида. Использовали разные мольные отношения $[\text{сут } \text{с}^{3+}] : [\text{ЦАК}]$ (0.3, 4.3, 7.85), концентрация феррицианида составляла $4 \cdot 10^{-3} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$. Такая постановка эксперимента правомерна, поскольку ЦАК в условиях метаболизма, например, если он в виде лекарства вводится в организм, попадет в среду, где присутствует довольно много метаболитов (таких как все виды цитохромов, метгемоглобин, ферменты первого и второго участка дыхательной цепи), которые имеют гораздо более положительный редокс-потенциал, чем ЦАК, и последний, безусловно, будет окисляться этими веществами. В опытную кювету вносили $\text{сут } \text{с}^{3+}$ и феррицианид, а в контрольную — буфер и феррицианид и записывали спектр поглощения. Реакцию начинали, одновременно прибавляя ЦАК в опытную и контрольную кюветы. Результаты представлены на рисунке 5. Спектр 1 — спектр поглощения исходного $\text{сут } \text{с}^{3+}$. Спектр 2, записанный через 1 мин после прибавления ЦАК, представляет собой спектр поглощения $\text{NO—сут } \text{с}^{3+}$ с двумя максимумами при $\lambda = 530$ и 562 нм . После разложения спектра на составляющие установлено, что концентрация образовавшегося $\text{NO—сут } \text{с}^{3+}$ равна $60 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Поскольку концентрация ЦАК составляла $0.2 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$, можно сделать вывод, что в данном опыте из ЦАК выделилось 0.3 экв. NO (см. рис. 5). Регистрацию спектров поглощения в этом опыте проводили в течение 4 ч. Спектр изменялся незначительно, происходило небольшое уменьшение концентрации $\text{NO—сут } \text{с}^{3+}$. О быстром образовании $\text{NO—сут } \text{с}^{3+}$ свидетельствовал контрольный эксперимент, показавший, что при добавлении феррицианида в раствор ЦАК практически за время смешивания происходит резкое изменение спектра поглощения. Из рисунка 2 (кривая 2) видно,

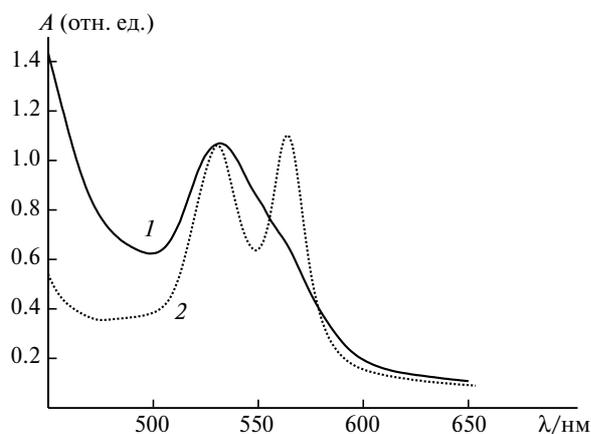


Рис. 3. Спектры поглощения $\text{сут } \text{с}^{3+}$ ($9.7 \cdot 10^{-5} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) в 0.05 M фосфатном буфере (1) и комплекса $\text{NO—сут } \text{с}^{3+}$ (2), полученного после уравнивания этого раствора $\text{сут } \text{с}^{3+}$ с газообразным NO . Условия: $\text{pH } 7.0$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 атм NO .

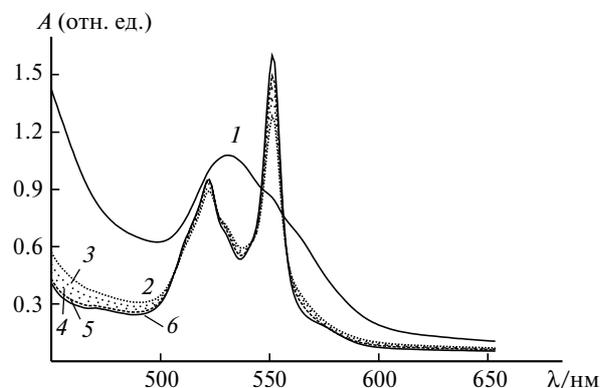


Рис. 4. Изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии ЦАК ($2 \cdot 10^{-4} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) с $\text{сут } \text{с}^{3+}$ ($9.8 \cdot 10^{-5} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$): спектр исходного $\text{сут } \text{с}^{3+}$ (1) и спектры, зарегистрированные через 0.5 (2), 10 (3), 20 (4), 60 (5) и 70 мин (6) после начала реакции. Условия реакции приведены в подписи к рисунку 2.

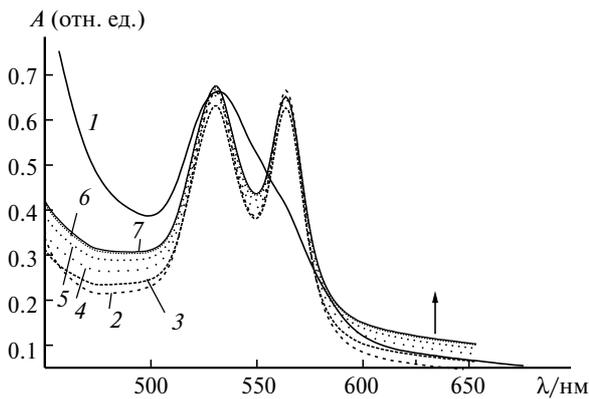


Рис. 5. Изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии ЦАК ($2 \cdot 10^{-4}$ моль·л $^{-1}$) с Cu^{2+} ($6 \cdot 10^{-5}$ моль·л $^{-1}$) в присутствии феррицианида ($4 \cdot 10^{-3}$ моль·л $^{-1}$): спектр исходного Cu^{2+} (1) и спектры, зарегистрированные через 1 (2), 15 (3), 45 (4), 130 (5), 220 (6) и 235 мин (7) после начала реакции. Условия реакции приведены в подписи к рисунку 2.

что оптическая плотность при $\lambda = 450$ нм уменьшается почти в 2 раза и далее происходит медленное изменение оставшейся окраски. Наблюдаемое быстрое образование $\text{NO}-\text{Cu}^{2+}$ при взаимодействии ЦАК с Cu^{2+} в этих условиях свидетельствует о том, что окисление ЦАК сопровождается высвобождением групп NO в раствор.

Последующие опыты по взаимодействию ЦАК с Cu^{2+} в присутствии феррицианида проводили в условиях избытка Cu^{2+} относительно ЦАК при мольных отношениях $[\text{Cu}^{2+}] : [\text{ЦАК}] = 0.3, 4.3$ и 7.85 . Одновременно в этих экспериментах определяли кинетику скорости реакций. Так же, как и в предыдущем эксперименте по изучению взаимодействия ЦАК с Cu^{2+} , регистрировали изменение разности спектров во времени (рис. 6–8). Затем каждый спектр поглощения раскладывали на составляющие компью-

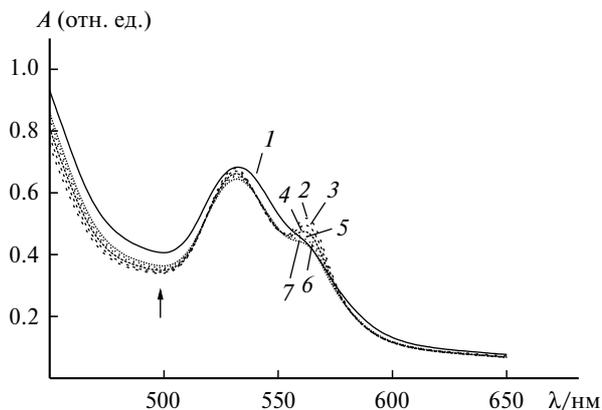


Рис. 6. Изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии ЦАК ($1.5 \cdot 10^{-5}$ моль·л $^{-1}$) с Cu^{2+} ($6.5 \cdot 10^{-5}$ моль·л $^{-1}$) в присутствии феррицианида ($4 \cdot 10^{-3}$ моль·л $^{-1}$): спектр исходного Cu^{2+} (1) и спектры, зарегистрированные через 1 (2), 15 (3), 36 (4), 66 (5), 96 (6) и 156 мин (7) после начала реакции. Условия реакции приведены в подписи к рисунку 2.

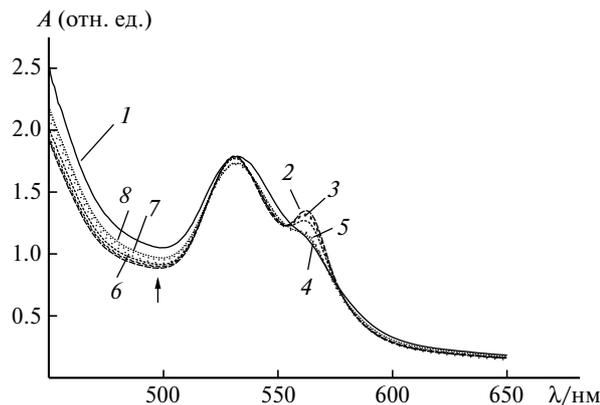


Рис. 7. Изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии ЦАК ($2 \cdot 10^{-5}$ моль·л $^{-1}$) с Cu^{2+} ($1.57 \cdot 10^{-4}$ моль·л $^{-1}$) в присутствии феррицианида ($4 \cdot 10^{-3}$ моль·л $^{-1}$): спектр исходного Cu^{2+} (1) и спектры, зарегистрированные через 0.5 (2), 5 (3), 7.5 (4), 19 (5), 64 (6), 94 (7) и 124 мин (8) после начала реакции. Условия реакции приведены в подписи к рисунку 2.

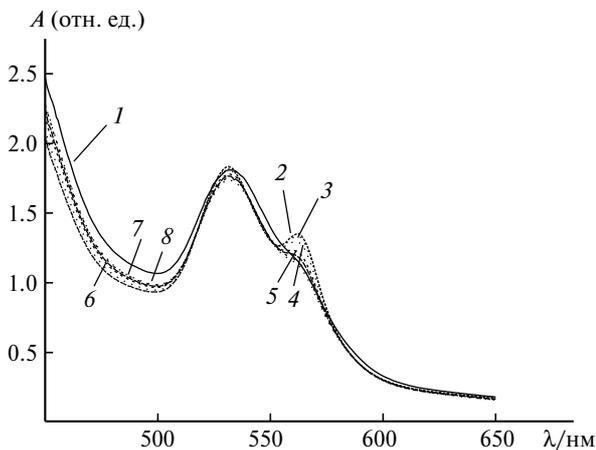


Рис. 8. Изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии ЦАК ($2 \cdot 10^{-5}$ моль·л $^{-1}$) с феррицианидом ($4 \cdot 10^{-3}$ моль·л $^{-1}$) и Cu^{2+} ($1.8 \cdot 10^{-4}$ моль·л $^{-1}$) после гидролиза ЦАК в течение 3 ч при 20°C : спектр исходного Cu^{2+} (1) и спектры, зарегистрированные через 1 (2), 3 (3), 6 (4), 13 (5), 43 (6), 133 (7) и 193 мин (8) после начала реакции ЦАК с Cu^{2+} . Условия реакции приведены в подписи к рисунку 2.

терной обработкой по программе MathCad и определяли концентрацию Cu^{2+} и степень конверсии. После разложения спектра 2 на рисунке 6 на составляющие установлено, что за 1 мин образуется $\text{NO}-\text{Cu}^{2+}$ в концентрации 31.4 мкмоль·л $^{-1}$. Поскольку концентрация ЦАК составляла 0.015 ммоль·л $^{-1}$, можно сделать вывод, что в данном опыте из ЦАК выделилось 2.1 экв. NO (см. рис. 6).

В следующем эксперименте (см. рис. 7) мольное отношение $[\text{Cu}^{2+}] : [\text{ЦАК}]$ было увеличено до 7.85 . Так же как и в предыдущем опыте, спектр поглощения раскладывали на составляющие. В данном случае через 30 с от начала реакции (рис. 7, спектр 2) концентрация образовавшегося $\text{NO}-\text{Cu}^{2+}$ была равна 61.6 мкмоль·л $^{-1}$. В этом опыте концентрация ЦАК

составляла $0.02 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$, следовательно, в раствор выделилось 3.08 группы NO. Так же как и в опыте, представленном на рисунке 6, наблюдается быстрое образование NO—сут c^{3+} в результате того, что при окислении феррицианидом происходит быстрое превращение ЦАК (см. рис. 2, кривая 2) с высвобождением NO в раствор, как это следует из наших экспериментов.

Представлялось интересным определить, сколько групп NO может выделить ЦАК в результате самопроизвольного гидролиза при pH 7. Такие данные в литературе отсутствовали. Поскольку, как видно из экспериментов, описанных выше, при окислении ЦАК феррицианидом происходит высвобождение NO в раствор, можно использовать реакцию ЦАК с сут c^{3+} как тест на число групп NO, выделившихся к определенному моменту при гидролизе ЦАК. Гидролиз ЦАК проводили при pH 7.0 в течение 3 ч в условиях опыта, представленного на рисунке 2, после чего из раствора удалили продуванием образовавшийся NO, затем прибавили сут c^{3+} и феррицианид в таких концентрациях, когда можно было определить, что из ЦАК выделяются три группы NO (см. рис. 7). Далее, как и в предыдущих опытах, регистрировали изменение спектра поглощения (рис. 8). В данном случае через 1 мин с начала реакции (см. рис. 8, спектр 2) концентрация образовавшегося NO—сут c^{3+} была равна $53 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$. В этом опыте концентрация ЦАК составляла $0.02 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$, следовательно, в раствор выделилось 2.65 группы NO, т.е. по сравнению с опытом, представленным на рисунке 7, на 0.43 группы NO меньше. Это свидетельствует о том, что в результате самопроизвольного гидролиза ЦАК при pH 7 в данном случае в раствор выделилось 0.43 группы NO.

Таким образом, спектрофотометрически по реакции ЦАК с сут c^{3+} в присутствии феррицианида можно определять число групп NO, которые могут выделиться из ЦАК. Установлено, что при самопроизвольном гидролизе ЦАК при pH 7.0 в раствор выделяется не более одной группы NO, а из окисленного ЦАК — не менее трех.

В экспериментах, представленных на рисунках 5—7, наблюдалось интересное явление — медленное разложение нитрозилированных цитохромов. Это достоверно установленный экспериментальный факт. Интересно было сравнить константы скорости этих процессов с константой скорости разложения ЦАК в отсутствие сут c^{3+} (см. рис. 2), равной $(1.8 \pm 0.8) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. На основании рассчитанных значений концентраций образовавшегося NO—сут c^{3+} нами построены кинетические зависимости (рис. 9, *a—c*). Константы скорости реакции получали посредством анализа кинетических зависимостей реакций сут c^{3+} с ЦАК. Установлено, что эти зависимости (см. рис. 9) хорошо описываются в рамках реакций первого порядка. Используя уравнение вида $y(t) = ae^{-kt}$, мы получили эффективные константы скорости первого порядка (k) изученных реакций (табл. 1).

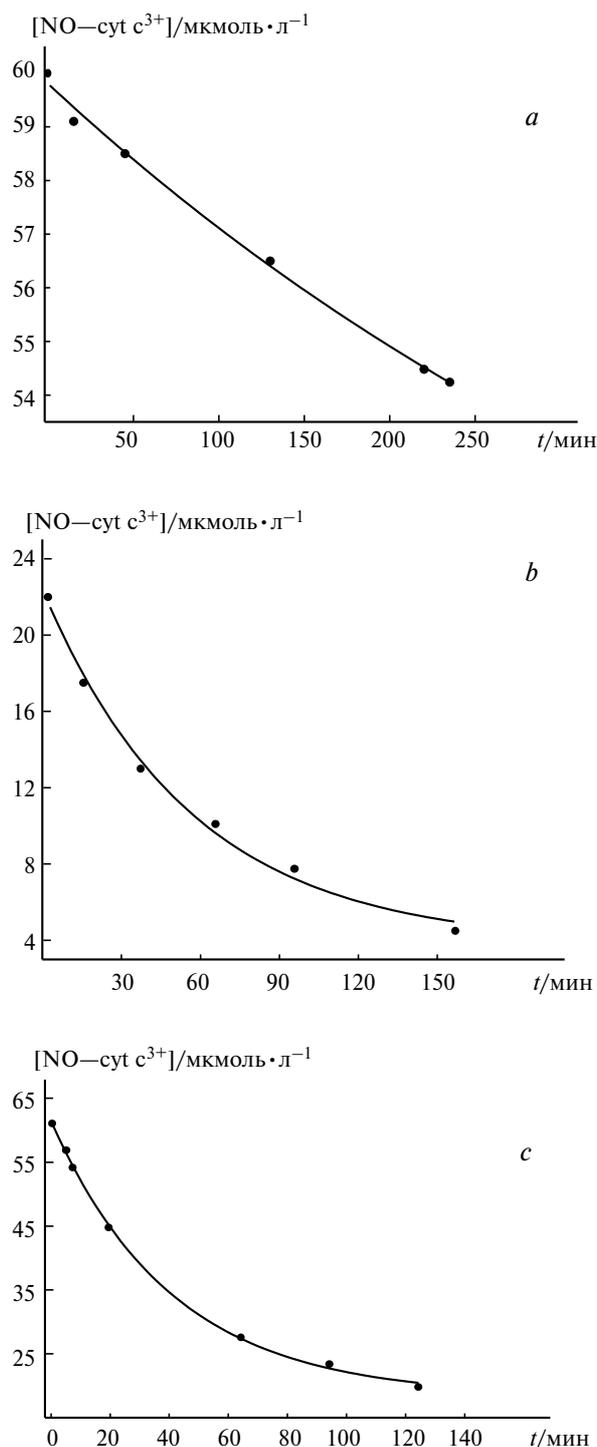


Рис. 9. Кинетика образования NO—сут c^{3+} в присутствии феррицианида ($4 \cdot 10^{-3} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$): при взаимодействии ЦАК ($2 \cdot 10^{-4} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) с сут c^{3+} ($6 \cdot 10^{-5} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) по данным опыта, представленного на рисунке 5 (*a*); при взаимодействии ЦАК ($1.5 \cdot 10^{-5} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) с сут c^{3+} ($6.5 \cdot 10^{-5} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) по данным опыта, представленного на рисунке 6 (*b*); при взаимодействии ЦАК ($2 \cdot 10^{-5} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) с сут c^{3+} ($1.57 \cdot 10^{-4} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) по данным опыта, представленного на рисунке 7 (*c*). Теоретические кривые построены с использованием уравнения вида $y(t) = ae^{-kt}$, точки — экспериментальные данные.

Как видно из данных таблицы 1, в присутствии ЦАК скорость разложения комплекса NO—сут c^{3+} на NO и сут c^{3+} зависит от мольного отношения

Таблица 1. Наблюдаемая скорость распада комплекса NO—cyt c³⁺ (см. рис. 5—7)

Рисун- нок	[ЦАК] /ммоль·л ⁻¹	[cyt c ³⁺] /мкмоль·л ⁻¹	[cyt c ³⁺] : [ЦАК]*	[NO—cyt c ³⁺] /мкмоль·л ⁻¹	Число групп NO	k ^{**} /с ⁻¹
5	0.200	60	0.30	60.0	0.30	(3.3±0.3)·10 ⁻⁵
6	0.015	65	4.30	31.4	2.10	(2.9±0.3)·10 ⁻⁴
7	0.020	157	7.85	61.6	3.08	(4.0±0.4)·10 ⁻⁴

* Мольное отношение; ** k — эффективная константа скорости суммарного процесса разложения NO—cyt c³⁺ в растворе.

[cyt c³⁺] : [ЦАК]. При [cyt c³⁺] : [ЦАК] = 0.3 она оказывается меньше, чем скорость разложения ЦАК в отсутствие cyt c³⁺ (см. рис. 2). Можно сказать, что в присутствии ЦАК суммарный процесс выделения NO становится более пролонгированным в 5.6 раза. Этот вывод необычайно важен для метаболизма ЦАК, поскольку, как следует из литературных данных⁷, cyt c³⁺ является «депо» NO, обеспечивающим его сохранение с последующим высвобождением.

Авторы выражают благодарность О. В. Шапошниковой за участие в работе, А. Ф. Топунову за помощь в работе и Б. Л. Психа за полезное обсуждение результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Отделения химии неорганических материалов Российской академии наук (Программа № 9 «Медицинская и биомолекулярная химия»).

Список литературы

1. J. A. McCleverty, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 403.
2. N. A. Sanina, L. A. Syrtsova, N. I. Shkondina, T. N. Rudneva, E. S. Malkova, T. A. Bazanov, A. I. Kotelnikov, S. M. Aldoshin, *Nitric Oxide: Biol. Chem.*, 2007, **16**, 181.
3. Н. А. Санина, Г. В. Шилов, С. М. Алдошин, А. Ф. Шестаков, Л. А. Сырцова, Н. С. Ованесян, Е. С. Чудинова, Н. И. Шкондина, Н. С. Емельянова, А. И. Котельников, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2009, 560 [*Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, 2009, **58**, 572].
4. А. А. Тимошин, Ц. Р. Орлова, А. Ф. Ванин, Н. А. Санина, Э. К. Рууге, С. М. Алдошин, Е. И. Чазов, *Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева)*, 2007, **LI**, №1, 88 [*Mendeleev Chem. J. (Engl. Transl.)*, 2007, **LI**, No.1].
5. Н. А. Санина, О. С. Жукова, З. С. Смирнова, Л. М. Борисова, М. П. Киселева, С. М. Алдошин, *Рос. биотерапевт. журн.*, 2008, **1**, 52.
6. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, in *Principles of Biochemistry*, 2nd ed., Ed. V. Neal, Worth Publishers, New York, 1993, 769.
7. А. Н. Осипов, Г. Г. Борисенко, Ю. А. Владимиров, *Успехи биол. химии*, 2007, **47**, 259 [*Biochemistry (Moscow), Special iss. Biol. Chem. Rev. (Engl. Transl.)*, 2007, **72**, 1491].
8. T. N. Rudneva, N. A. Sanina, K. A. Lyssenko, S. M. Aldoshin, M. Yu. Antipin, N. S. Ovanesyan, *Mendeleev Commun.*, 2009, **19**, 253.
9. P. Ascenzi, M. Coletta, R. Santucci, F. Polizio, A. Desideri, *J. Inorg. Biochem.*, 1994, **53**, 273.
10. D. French, J. F. Roby, *Abstrs 166th Nat. Meet. // Am. Chem. Soc. Abstrs Biol.*, 1973.
11. A. M. Adamany, R. G. Spiro, *J. Biol. Chem.*, 1975, **250**, 2842.
12. W. J. Lennarz, *Science*, 1975, **188**, 986.
13. W. W. Chen, W. J. Lennarz, A. L. Tarentino, F. Maley, *J. Biol. Chem.*, 1973, **250**, 7006.
14. Е. С. Северин, Т. А. Алейникова, Е. В. Осипов, *Биологическая химия*, Медицина, Москва, 2000.
15. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, in *Principles of Biochemistry*, 2nd ed., Ed. V. Neal, Worth Publishers, New York, 1993, 388.
16. M. Hoshino, K. Ozawa, H. Seki, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9568.
17. E. J. Rose, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 2866.
18. A. M. Miles, D. A. Wink, J. C. Cook, M. B. Grisham, in *Methods Enzymology*, Ed. L. Packer, Acad. Press, New York, 1996, 105.
19. О. В. Ракова, Н. А. Санина, Г. В. Шилов, В. В. Стрелец, И. Б. Борзова, А. В. Куликов, С. М. Алдошин, *Координац. химия*, 2001, **27**, 1 [*Russ. J. Coord. Chem. (Engl. Transl.)*, 2001, **27**].
20. Y. Orii, H. Shimada, *J. Biochem. (Tokyo)*, 1978, **84**, 1543.

Поступила в редакцию 18 февраля 2010;
после доработки — 27 апреля 2010