

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОМ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА, ВЫЗВАННОЙ ЭНДОТОКСИЧЕСКИМ ШОКОМ

© 2019 г. А.А. Тимошин, В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, А.Ф. Ванин*, Э.К. Рууге

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ,
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а*

**Институт химической физики имени Н.Н. Семенова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4*

E-mail: timoshin_a_a@mail.ru

Поступила в редакцию 06.11.18 г.

После доработки 06.11.18 г.

Принята к публикации 08.11.18 г.

Работа посвящена исследованию механизмов биологического действия такой стабилизированной формы оксида азота, как динитрозильные комплексы железа с лигандом глутатионом, на модели целого организма крыс в условиях гиперпродукции оксида азота, вызванной воспалением. Установлено, что введение динитрозильных комплексов железа с глутатионом в условиях эндотоксического шока не приводит к увеличению общего уровня оксида азота в органах животного, оказывает защитное действие, подавляя гиперпродукцию оксида азота в ткани печени, и вызывает накопление этих комплексов с белковыми лигандами в почках животного.

Ключевые слова: антиоксидант, воспаление, динитрозильные комплексы железа, оксид азота, спиновая ловушка, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.1134/S0006302919010137

Известно, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами являются одной из основных природных форм депонирования NO в организме животных и человека [1–6]. Такие соединения существуют в форме находящихся между собой в химическом равновесии моноядерных и биядерных ДНКЖ ($[(RS-)_2Fe(NO)_2]$ и $[(RS-)_2Fe_2(NO)_4]$, соответственно), в результате обратимого распада которых происходит высвобождение свободного NO, S-нитрозотиолов и ионов двухвалентного железа [2,4,5,7–9]. ДНКЖ способны формироваться в организме эндогенно [2,3,10], а кроме того, эти комплексы с низкомолекулярными лигандами (например, с глутатионом или цистеином) могут быть сравнительно легко синтезированы в лабораторных или промышленных условиях для последующего введения их в организм [2,6,11].

При введении этих соединений в организм происходит быстрый переход $Fe^+(NO^+)_2$ -групп с низкомолекулярных на белковые тиолсодержащие лиганды, которые далее могут сравнительно долго сохраняться в органах и тканях, подвергаясь далее относительно медленному спонтанному или индуцированному распаду, сопряженному с высвобождением NO. Следствием этого является инициирование продолжительного гипотензивного эффекта, причем наиболее существенный эффект наблюдается при внутривенном и подкожном введении данного соединения [12–14]. Показано также, что ДНКЖ с лигандом глутатионом (ДНКЖ-Глт), как гипотензивный препарат, может быть использован в клинической практике, и его действие было получено на пациентах-добровольцах [6, 11]. Известно также, что ДНКЖ обладают антиоксидантными свойствами, что объясняется их способностью перехватывать супероксидные анион-радикалы [10,15]. Следствием этого является их способность оказывать защитное действие в условиях нарушения кровоснабжения миокарда [16,17]. Кроме того, данные соедине-

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа; ДНКЖ-Глт – динитрозильные комплексы железа с лигандом глутатионом; ЛПС – липополисахариды; АСТ – аспартатаминотрансфераза; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

ния способны инициировать в организме и многие другие положительные эффекты [18–20].

Более сложную и существенно менее изученную задачу представляет собой анализ действия ДНКЖ в организме в условиях повышенного содержания NO. В этом случае образующийся в организме пул ДНКЖ с белковыми лигандами может действовать не только как донор NO, но и как регулятор его уровня. Так, на модели региональной ишемии миокарда крыс нами было показано, что кардиопротекторное действие этих комплексов является следствием не только перехвата этими соединениями короткоживущих супероксидных анион-радикалов, но также и подавления гиперпродукции свободного NO в ишемизируемой зоне [16]. Кроме того, ранее нами были получены предварительные данные о некотором снижении под действием ДНКЖ-Глт уровня общего NO в органах крыс в условиях воспаления [21].

Целью данной работы являлось комплексное исследование механизмов биологического действия ДНКЖ-Глт в организме крыс в условиях гиперпродукции NO, вызванной эндотоксическим шоком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на крысах линии Sprague Dawley (самцы массой 350–400 г). Все эксперименты проводили с соблюдением этических норм обращения с лабораторными животными. В начале опыта крыс анестезировали кетаминном, вживляли венозный и артериальный катетеры.

В ходе работы проводили серии экспериментов для анализа повреждения органов животных в результате эндотоксического шока и регистрация действия ДНКЖ-Глт в этих условиях. При этом оценивалось повреждающее действие липополисахаридов (оболочки бактерий *Salmonella typhimurium*; ЛПС) на ткань печени и почки после предварительной инъекции ДНКЖ-Глт или эквивалентного количества физиологического раствора. В этой части работы животных произвольным образом делили на две экспериментальные группы, по 10–12 особей в каждой. У всех крыс из обеих групп за 24 ч до введения им ЛПС или ДНКЖ-Глт совместно с ЛПС брали образцы цельной крови для определения в ее сыворотке активности фермента аспаратаминотрансферазы (АСТ) и содержания мочевины.

На следующий день крысам из первой группы внутривенно вводили 1,0 мл PSS, а через 15 мин после этого им инициировали эндотоксический шок путем внутривенного введения

ЛПС в дозе 15 мг/кг массы тела. Животным из другой группы вначале вводили ДНКЖ-Глт в дозе 1,6 мкмоль/кг массы тела в 1,0 мл физиологического раствора, а через 15 мин – ЛПС (15 мг/кг). Далее, через 6 ч после этого у животных снова брали кровь для определения в ее сыворотке этих же показателей.

Активность АСТ и концентрации мочевины производили на автоанализаторе Tagra 2000 с использованием китов DiaSys. Содержание мочевины определялось с помощью набора ЗАО «Диакон-ДС». При этом в работе использовали также препараты сыворотки сравнения Trulab N и Trulab P, полученные от фирмы DiaSys.

В другой части работы методом ЭПР проводили исследование влияния воспаления и/или введения ДНКЖ-Глт на образование связанных с белками ДНКЖ в крови и ткани органов, а также на общий уровень NO в органах животных.

Для регистрации общего уровня NO (включая его стабилизированные формы) в ткани органов применяли такую липофильную спиновую ловушку NO, как комплексы ионов железа и диэтилдитиокарбамата (Fe-DETC_2), способные переходить в форму парамагнитных спиновых аддуктов (NO-Fe-DETC_2) в результате взаимодействия с NO, причём как свободным, так и в составе своих стабилизированных форм [22]. Для регистрации таких аддуктов в ткани органов животных применяли метод ЭПР.

В этой части работы животных произвольным образом делили на четыре экспериментальные группы, по 5–20 особей в каждой. Крысам из первой группы в начале опыта инициировали эндотоксический шок путем внутривенного введения ЛПС в дозе 15 мг/кг массы тела. Через 6 ч после этого животным путем инъекций вводили компоненты спиновой ловушки NO: диэтилдитиокарбамат (DETC, 620 мг/(кг массы тела) в 1,0 мл физиологического раствора, внутривенно) и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с цитратом Na (25 и 125 мг/(кг массы тела), соответственно, в 1,0 мл физиологического раствора, подкожно в область левого плеча). Далее через 20 мин животных забивали и изолировали их сердце, печень и почку. Эти органы сразу промывали в физиологическом растворе и измельчали механически. После этого образцы размельченной ткани этих органов помещали в пластиковые трубки диаметром 5,0 мм, которые сразу же замораживали и хранили в жидком азоте, и использовали далее для регистрации их спектров ЭПР.

Животным из другой группы в начале опыта внутривенно вводили раствор ДНКЖ-Глт в дозе 1,6 мкмоль/кг массы тела. Далее через 6 ч этим крысам аналогичным образом вводили компоненты спиновой ловушки и после этого готовили образцы ткани их органов. Животным из третьей группы вначале внутривенно вводили аналогичную дозу ДНКЖ-Глт, а через 15 мин они получали стандартную дозу ЛПС. Через 6 ч после этого им также вводили компоненты спиновой ловушки и готовили образцы ткани их органов. Крысам из четвертой экспериментальной группы (контроль) вводили эквивалентную дозу физиологического раствора, через 6 ч после этого – компоненты спиновой ловушки и далее через 20 мин получали образцы ткани органов.

В другой части работы для регистрации сигналов ЭПР других парамагнитных центров в органах животных, принадлежащих к четырем экспериментальным группам, компоненты спиновой ловушки не вводились, и вместо этого сразу же проводилась изоляция органов с последующим приготовлением по стандартной процедуре и замораживанием в жидком азоте образцов ткани исследуемых органов.

Кроме того, у крыс, получавших инъекцию ДНКЖ-Глт (как с последующим введением ЛПС, так и без него), через артериальный катетер собирали образцы цельной крови для регистрации в них сигналов связанных с белками ДНКЖ. При этом в группе животных, получавших только ДНКЖ-Глт, данные образцы получали через 15 мин, 2 ч 15 мин, 4 ч 15 мин и 6 ч 15 мин после введения препарата. У крыс, получавших ДНКЖ-Глт, с последующим введением ЛПС пробы крови брались через 15 мин после введения препарата (до введения ЛПС), а также через 6 ч после введения ЛПС (т.е. в конце опыта). Во все образцы крови сразу же добавляли гепарин (конечная концентрация 10–20 МЕ/мл), после чего их сразу же замораживали и хранили при температуре жидкого азота и использовали далее для регистрации их спектров ЭПР.

Спектры ЭПР всех полученных образцов ткани органов регистрировали на спектрометре ЭПР X-диапазона типа E-109E (Varian, США) при температуре жидкого азота. Амплитуда высокочастотной модуляции магнитного поля составляла 0,2 мТл (регистрация сигналов аддуктов NO-Fe-DETC₂) или 0,4 мТл (при отсутствии в образцах спиновой ловушки NO) при частоте 100 кГц. Мощность сверхвысокочастотного поля спектрометра устанавливалась на уровне 10 мВт, а его частота составляла 9,33 ГГц. Сканирование магнитного поля при

записи сигналов ЭПР образцов осуществлялось с центром при $g = 2,03$. После записи сигналов все образцы размораживали и определяли массу ткани в активной зоне резонатора спектрометра. Спектры ЭПР цельной крови регистрировали при комнатной температуре в стеклянных капиллярах. В этом случае амплитуда высокочастотной модуляции магнитного поля составляла 0,4 мТл, а мощность сверхвысокочастотного поля спектрометра устанавливалась на уровне 10 мВт, при частоте 9,14 ГГц. Сканирование магнитного поля также осуществлялось с центром при $g = 2,03$.

В работе использовали стандартный препарат «Оксаком», содержащий в качестве активного вещества ДНКЖ-Глт, синтезированный по методике, описанной ранее [6,11,12], в Экспериментальном предприятии медико-биологических препаратов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России. Другие реактивы были получены от фирмы Sigma-Aldrich.

Все данные в статье представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. Кратность повторения опытов составляла не менее пяти-шести экспериментов. Для проверки статистической достоверности эффектов использовался t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы действие ДНКЖ-Глт на ткань в условиях воспаления изучали на двух органах – печени и почки. Для этого в различных физиологических состояниях в сыворотке крови определяли активности фермента АСТ и содержания мочевины. На рис. 1а, 1б представлены эти усредненные значения в образцах крови животных, принадлежащих к обеим экспериментальным группам. Из этих рисунков видно, что исходные значения, приведенные в левой части каждого рисунка, близки между собой и различаются только в пределах стандартной ошибки. Это означает, что крысы из обеих групп были стандартными, и никаких достоверных различий между ними в начале опыта, исходя из анализа их крови, не обнаружено.

Из рис. 1а видно, что в результате введения животным ЛПС регистрируется почти двукратное повышение активности АСТ в образцах крови, что отражает повреждение ткани печени в условиях эндотоксического шока. Из этого рисунка также видно, что через 6 ч после последовательного введения ДНКЖ-Глт и ЛПС в крови регистрируется существенно меньшая активность АСТ, по сравнению с введением

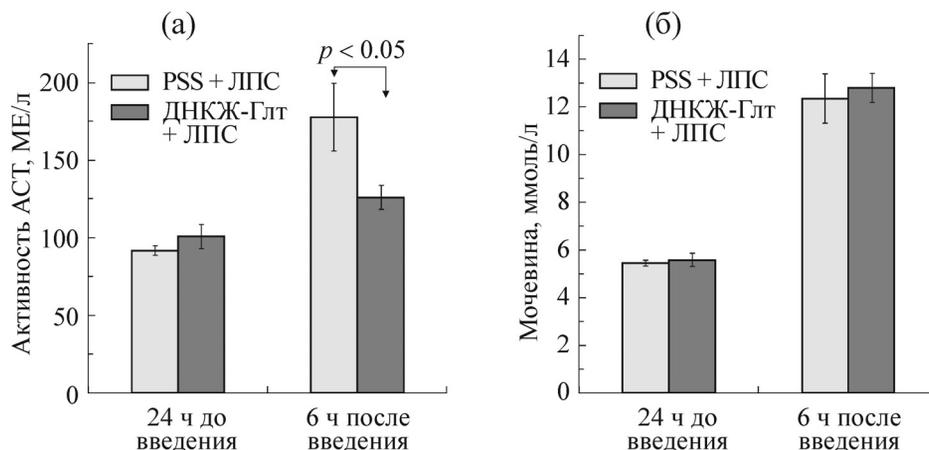


Рис. 1. Усредненные значения активности фермента АСТ (а) и содержания мочевины (б) в образцах цельной крови крыс в начале опыта, а также через шесть часов после последовательных инъекций физиологического раствора и ЛПС; или ДНКЖ-Глт и ЛПС.

только одного ЛПС, что свидетельствует о защитном действии ДНКЖ-Глт на печень животного.

Для регистрации повреждений ткани почки проводили определение содержания мочевины в крови, как в начале опыта, так и через 6 ч после введения ЛПС или последовательных инъекций ДНКЖ-Глт и ЛПС. Из рис. 1б видно, что в результате инъекции ЛПС в крови происходило увеличение содержания мочевины, что отражало повреждение ткани почки. Из этого рисунка также видно, что через 6 ч после последовательного введения ДНКЖ-Глт и ЛПС содержание мочевины в крови достоверно не отличалось от ее концентрации в группе, соответствующей введению только ЛПС и физиологического раствора. Следовательно, введение ДНКЖ-Глт оказывает статистически достоверное защитное действие в условиях эндотоксического шока на ткань печени, и при этом в почках оно не обнаруживается.

В другой части работы методом ЭПР проводилась регистрация связанных с белками ДНКЖ и других форм депонирования NO в организме животного при различных условиях после введения ДНКЖ-Глт. Для регистрации парамагнитных моноядерных ДНКЖ в крови проводилась запись сигналов ЭПР образцов крови на разных этапах опыта после введения крысам стандартной дозы ДНКЖ-Глт. Полученные спектры представлены на рис. 2.

Из этого рисунка видно, что сразу после введения препарата в крови регистрируются моноядерные ДНКЖ с белковыми лигандами. При этом сигналы ЭПР образцов крови в начале опыта, соответствующие двум экспериментальным группам (введение только ДНКЖ-Глт

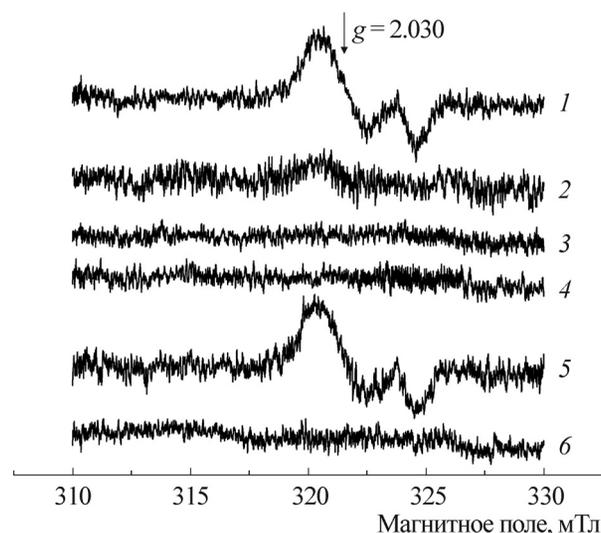


Рис. 2. Спектры ЭПР при комнатной температуре цельной крови крыс: 1 – введение ДНКЖ-Глт, + 15 мин; 2 – введение ДНКЖ-Глт, + 2 ч 15 мин; 3 – введение ДНКЖ-Глт, + 4 ч 15 мин; 4 – введение ДНКЖ-Глт, + 6 ч 15 мин; 5 – введение ДНКЖ-Глт, + 15 мин (перед введением ЛПС); 6 – последовательное введение ДНКЖ-Глт и ЛПС (с интервалом в 15 мин); + 6 ч 15 мин.

и последовательные инъекции ДНКЖ-Глт и ЛПС), очень близки друг к другу. Очевидно, что это было следствием того, что дозы введения ДНКЖ-Глт в обеих группах были стандартными, и в случае последовательного введения ДНКЖ-Глт и ЛПС забор крови проводился через 15 мин после введения ДНКЖ-Глт, т.е. перед инъекцией ЛПС.

Кроме того, из рис. 2 видно, что сразу после введения ДНКЖ-Глт содержание этих комплексов сразу достигало своих максималь-

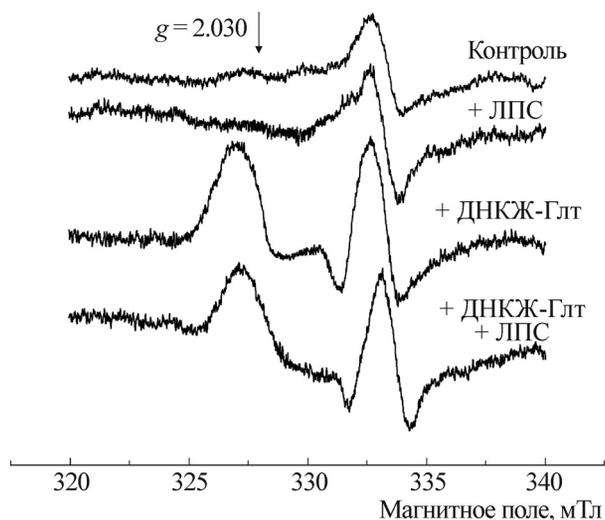


Рис. 3. Спектры ЭПР при температуре жидкого азота образцов ткани почки крыс, соответствующих разным экспериментальным группам.

ных значений и далее постепенно снижалось вследствие их распада с высвобождением NO, а также выходом их из кровотока в ткань органов. При этом к окончанию опыта (6 ч 15 мин после введения препарата) в цельной крови животных их сигналы практически не регистрировались. При последовательном введении ДНКЖ-Глт и ЛПС в начале опыта также регистрировались аналогичные сигналы связанных с белками ДНКЖ, а в конце опыта они практически отсутствовали. Тем не менее в данных условиях к окончанию эксперимента в крови могли сохраняться диамагнитные биядерные ДНКЖ и S-нитрозотиолы.

Следует отметить также, что после инъекции ЛПС без предварительного введения ДНКЖ-Глт в конце опыта в крови животного сигналы ДНКЖ в области $g = 2,03$ также отсутствовали (данные не приведены). Это означало, что в условиях воспаления, сопровождающимся ростом уровня NO вследствие активации iNOS, в крови не происходит формирования и/или накопления регистрируемого количества парамагнитных моноядерных ДНКЖ.

Для регистрации моноядерных ДНКЖ и других парамагнитных комплексов в ткани органов животных в конце опыта проводилась регистрация спектров ЭПР образцов ткани при температуре жидкого азота. Установлено, что через шесть часов после введения ДНКЖ-Глт наиболее заметные сигналы связанных с белками ДНКЖ с центром при $g = 2,03$ регистрируются в почках животного, в то время как в других органах они практически отсутствуют. На рис. 3 представлены спектры ЭПР ткани

почки животных, принадлежащих к различным экспериментальным группам. Из этого рисунка видно, что наиболее значительный асимметричный сигнал ДНКЖ с белковыми лигандами регистрируется в почках через 6 ч после введения ДНКЖ-Глт (без инъекции ЛПС). Из этого рисунка также видно, что в результате последовательного введения крысам ЛПС и ДНКЖ-Глт также регистрируется сигнал ДНКЖ с белковыми лигандами, но с меньшей амплитудой, по сравнению с введением только ДНКЖ-Глт.

Вероятно, что данные различия можно объяснить тем, что в условиях воспаления инициируется цепь свободнорадикальных реакций, следствием чего является увеличение уровня короткоживущих активных форм кислорода в органах. Учитывая то, что ДНКЖ способны эффективно взаимодействовать с кислородными радикалами [15], следствием этого является необратимый распад части этих комплексов, в результате чего регистрируется уменьшение амплитуды их сигнала в результате введения ЛПС. При этом следует отметить, что все спектры, представленные на рис. 3, в своей высокопольной части содержали также свободнорадикальные сигналы, представляющие собой суперпозицию сигналов полувосстановленных форм убихинона и флавиновых коферментов [23].

Как уже отмечалось ранее, наряду с моноядерными парамагнитными ДНКЖ, регистрируемыми главным образом в почках, в тканях всех органов могут присутствовать также и диамагнитные стабилизированные формы депонирования NO, такие как биядерные ДНКЖ и S-нитрозотиолы. В связи с этим, для оценки общего уровня NO в ткани органов было необходимо применение спиновой ловушки на основе комплексов Fe-DETC₂, способной взаимодействовать как со свободным NO, так и с его стабилизированными формами.

На рис. 4 представлены характерные спектры ЭПР образцов ткани органов животных из контрольной группы, полученных через 20 мин после введения им компонентов спиновой ловушки Fe-DETC₂. Из этого рисунка видно, что во всех случаях в спектрах присутствуют узкие эквидистантные триплетные сигналы, принадлежащие спиновым аддуктам NO-Fe-DETC₂, образующимся в результате взаимодействия данной спиновой ловушки с NO, включая его депонированными формами. Исходя из этих сигналов, оценивали содержание спиновых аддуктов в образцах ткани (параметр N), как количество парамагнитных центров в образце с нормировкой на массу ткани в активной зоне резонатора спектрометра. Далее все значения

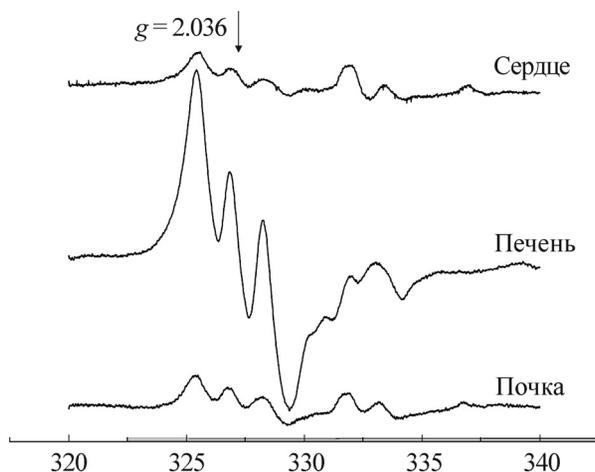


Рис. 4. Спектры ЭПР при температуре жидкого азота образцов ткани сердца, печени и почки крысы через 20 мин после введения компонентов спиновой ловушки NO.

N для разных органов животных, соответствующие введению ЛПС, ДНКЖ-Глт, а также последовательным инъекциям ДНКЖ-Глт и ЛПС, нормировались на величины $N_{\text{контр}}$, полученные для контрольной группы. Усредненные соотношения $N/N_{\text{контр}}$, соответствующие всем исследуемым органам животных, представлены на рис. 5.

Из этого рисунка видно, что в результате введения ЛПС для всех органов животного регистрируется существенный рост содержания спиновых аддуктов NO, что свидетельствует об аналогичном увеличении в них общего уровня NO в условиях воспаления, при этом наиболее значительный эффект наблюдается в печени крысы. При этом, как отмечалось выше, у животных, получавших ЛПС, в крови и ткани органов сигналы ДНКЖ не регистрировались, что говорило в пользу того, что рост общего уровня NO происходил вследствие увеличения содержания диамагнитных форм депонирования NO.

В другой экспериментальной группе, когда животным вводили ДНКЖ-Глт, регистрировались более слабые увеличения содержания аддуктов NO-Fe-DETC₂, по сравнению с действием ЛПС (рис. 5). Следует отметить, что регистрацию общего уровня NO проводили через 6 ч 15 мин после внутривенного введения ДНКЖ-Глт, когда парамагнитные ДНКЖ с белковыми лигандами наблюдались только в почках животного (рис. 3), в то время как диамагнитные стабилизированные формы NO могли присутствовать во всех компартментах организма.

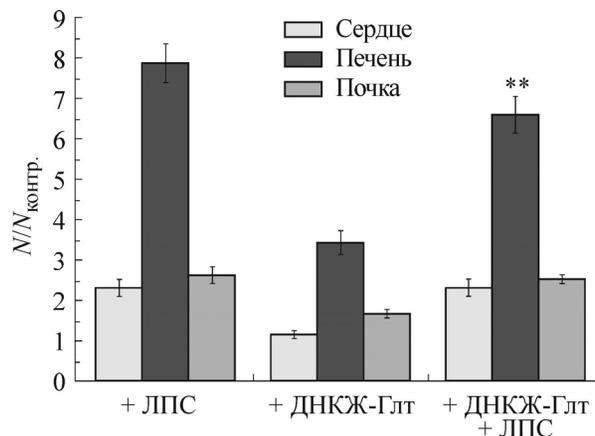


Рис. 5. Усредненные значения отношений $N/N_{\text{контр}}$ для разных экспериментальных групп животных: N – концентрация аддукта NO-Fe-DETC₂ в ткани органов животного (сердце, легкое, печень, почка); $N_{\text{контр}}$ – значения N , соответствующие животным из контрольной группы; + ЛПС – болюсное внутривенное введение ЛПС; + ДНКЖ-Глт – болюсное внутривенное введение ДНКЖ-Глт; + ДНКЖ-Глт + ЛПС – последовательное болюсное введение ДНКЖ-Глт и ЛПС (с интервалом в 15 мин); ** $p < 0,05$ относительно аналогичных значений, соответствующих введению ЛПС.

Из рис. 5 также видно, что в случае последовательного введения животным ДНКЖ-Глт и ЛПС эффект увеличения содержания спиновых аддуктов NO для печени был достоверно слабее, по сравнению с введением только ЛПС. Следовательно, в результате введения животным ДНКЖ-Глт эффект увеличения общего уровня NO, вызванный действием ЛПС, для этого органа был менее значительным, по сравнению с действием только одного ЛПС.

Следовательно, гиперпродукция NO в результате воспаления наибольшим образом проявляется в печени животных, и именно в этом органе наиболее заметно защитное действие ДНКЖ-Глт, результатом чего является подавление образования большого количества NO, включая его депонированные формы. При этом, как отмечалось выше, препарат ДНКЖ-Глт способен оказывать защитное действие именно на ткань этого органа (рис. 1а).

Исходя из полученных данных, полностью объяснить эффект ДНКЖ-Глт на уровень NO при воспалении не представляется возможным. Тем не менее полученные результаты позволяют сделать некоторые предположения о механизмах действия ДНКЖ в этих условиях. Вероятно, что это может быть связано с тем, что синтез iNOS в условиях воспаления инициируется в результате совокупности прооксидантных процессов, происходящих после введения ЛПС [24].

При этом ДНКЖ, как известно, обладают хорошо выраженными антиоксидантными свойствами [10,15], что несомненно приводит к подавлению синтеза iNOS, а следовательно, и к снижению избыточного уровня NO в данных экспериментальных условиях. При этом в печени данный эффект проявляется наиболее заметно, поскольку в ткани именно этого органа происходит наиболее интенсивный синтез NO в результате введения ЛПС (рис. 5).

Таким образом, введение ДНКЖ с глутатионом в условиях эндотоксического шока не приводит к увеличению общего уровня NO в органах крыс, оказывает защитное действие, подавляя гиперпродукцию оксида азота в ткани печени, и вызывает накопление этих комплексов с белковыми лигандами в почках животного.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00027).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. F. Vanin, Nitric Oxide: Biol. Chem. **21**, 1 (2009).
2. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **23**, 136 (2010).
3. Y. Suryo Rahmanto, D. S. Kalinowski, D. J. Lane, et al., J. Biol. Chem. **287** (10), 6960 (2012).
4. A. F. Vanin, Nitric Oxide: Biol. Chem. **54**, 156 (2016).
5. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **62**, 1 (2017).
6. А. Ф. Ванин, Биофизика **62** (4), 629 (2017).
7. S.-C. Wu, C.-Y. Lu, Y.-L. Chen, et al., Inorg. Chem. **55** (18), 9383 (2016).
8. С.-Н. Ке, С.-Н. Chen, М.-Л. Tsai, et al., J. Am. Chem. Soc. **139** (1), 67 (2017).
9. Т.-Т. Lu, Y.-М. Wang, С.-Н. Hung, et al., Inorg. Chem. (2018). DOI: 10.1021/asc.inorgchem.8b01818.
10. К. В. Shumaev, А. Л. Dudylina, М. V. Ivanova, et al., BioFactors **44** (3), 237 (2018).
11. Е. I. Chazov, О. V. Rodnenkov, А. V. Zorin, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **26**, 148 (2012).
12. V. L. Lakomkin, А. F. Vanin, А. А. Timoshin, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **16**, 413 (2007).
13. А. А. Timoshin, V. L. Lakomkin, А. А. Abramov, et al., Eur. J. Pharmacol. **765**, 525 (2015).
14. А. А. Тимошин, В. Л. Лакомкин, А. А. Абрамов и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **162** (8), 169 (2016).
15. К. В. Shumaev, А. А. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., Nitric Oxide: Biol. Chem. **18**, 37 (2008).
16. А. А. Тимошин, Д. Ю. Дроботова, О. В. Цикитшвили и др., Докл. РАН **432** (3), 416 (2010).
17. V. I. Kapelko, V. L. Lakomkin, А. А. Abramov, et al., Oxidative Medicine and Cellular Longevity **2017**, Article ID 9456163 (2017).
18. М. I. Remizova, N. I. Kochetygov, К. А. Gerbout, et al., Eur. J. Pharmacol. **662**, 40 (2011).
19. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика **60** (6), 1157 (2015).
20. К. Lepka, К. Voldracht, Е. Bill, et al., Glia **65** (9), 1521 (2017).
21. А. А. Тимошин, В. Л. Лакомкин, А. А. Абрамов и др., Докл. РАН **462** (2), 241 (2015).
22. А. F. Vanin and А. А. Timoshin, Methods Mol. Biol. **704**, 135 (2011).
23. А. А. Timoshin, О. I. Pisarenko, V. L. Lakomkin, et al., Exp. Clin. Cardiol. **5** (2), 59 (2000).
24. R. Schreck, B. Meier, D. E. Mannel, et al., J. Exp. Med. **175**, 1181 (1992).

Study of the Biological Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione during Nitric Oxide Overproduction, Induced by Endotoxin Shock

A.A. Timoshin*, V.L. Lakomkin*, A.A. Abramov*, A.F. Vanin**, and E.K. Ruuge*

*National Medical Research Centre for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

**Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow 119334 Russia

The objective of the present work is to study the biological effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione ligand as a stabilized form of nitric oxide in a rat model of nitric oxide overproduction induced by inflammatory stimuli. We have shown that after injection of dinitrosyl iron complexes with glutathione ligand during endotoxin shock total nitric oxide level in rat organs remains unchanged. Dinitrosyl iron complexes with glutathione ligand exert a protective effect; they induce suppression of nitric oxide overproduction in liver tissues and accumulate with protein ligands in mammalian kidney.

Keywords: antioxidant, inflammation, dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, spin trap, electron paramagnetic resonance