

ГАЗООБРАЗНЫЙ ОКСИД АЗОТА И ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ КАК ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, СПОСОБНЫЕ КУПИРОВАТЬ COVID-19

© 2021 г. А.Ф. Ванин*, **, А.В. Пекшев***, А.Б. Вагапов***, Н.А. Шарапов***, В.Л. Лакомкин****, А.А. Абрамов****, А.А. Тимошин****, В.И. Капелько****

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

**Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8/2

***«Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана» (национальный исследовательский университет), 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., 5/1

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

E-mail: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 02.12.2020 г.

После доработки 02.12.2020 г.

Принята к публикации 03.12.2020 г.

Показано, что ингаляционное введение животным и человеку газообразного NO или распыленных водных растворов биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом или N-ацетил-L-цистеином не оказывает на них заметного гипотензивного действия, что делает возможным их предполагаемое использование при лечении COVID-19. Установлено, что по мере повышения концентрации NO в газовом потоке, создаваемым аппаратом «ПЛАЗОН», с 100 до 2100 ppm уровень NO, включавшегося в комплексы с гемоглобином в крови, начинал снижаться, так что при 2000 ppm более половины этого газа включалось в динитрозильные комплексы, возникавшие в тканях легких и дыхательных путей. Таким образом ингаляционное введение газообразного NO может приводить к тому же, что и аналогичное введение растворов динитрозильных комплексов железа — к появлению в тканях легких и дыхательных цепей динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами. Поскольку эти комплексы как доноры катионов нитрозония могут (как это было предположено ранее — Биофизика, т. 65, с. 818, 2020) подавлять репликацию коронавируса, не исключено, что газообразный NO и синтезированные химическим путем биядерные динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут оказаться полезными при лечении COVID-19. При испытаниях на добровольцах (соавторах статьи) максимальная безопасная концентрация вдыхаемого в течение 15 мин газообразного NO составляла ~2000 ppm, при испытаниях на крысах при вдыхании ими распыленных водных растворов динитрозильных комплексов железа испытанная в опытах максимальная безопасная доза этих комплексов составляла ~0.4 ммоль/кг массы животного.

Ключевые слова: оксид азота, динитрозильные комплексы железа, COVID-19.

DOI: 10.31857/S0006302921010208

К настоящему времени показано, что для большинства патологий, вызванных в организме животных и человека вирусной инфекцией, характерно резкое повышение в клетках и тканях

хозяина уровня одного из универсальных регуляторов метаболических процессов — оксида азота (NO), а также активных форм кислорода и разнообразных цитокинов [1–7]. При этом именно повышение уровня NO обеспечивает в большинстве случаев защиту клеток и тканей хозяина от этой инфекции (2, 5–12). В частности, эта защита достигается дезактивацией важнейших вирусных белков, необходимых для репликации вирусов, таких как вирусные протеазы, обратные тран-

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ — моноядерные и биядерные формы ДНКЖ, GSH — восстановленный глутатион, NAC — N-ацетил-L-цистеин, Б-ДНКЖ-GSH — биядерные ДНКЖ с глутатионом, Б-ДНКЖ-NAC — биядерные ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином.

скриптазы, факторы транскрипции и др., причем в большинстве случаев подавление активности всех этих белков вызывается S-нитрозированием в них функционально важных тиоловых групп [2, 4–12]. Вместе с тем при некоторых вирусных инфекциях, например при гриппе или вирусном иммунодефиците человека, NO может усиливать заболевание [13, 14].

Интерес к роли NO в вирусных инфекциях резко возрос в условиях пандемии COVID-19. Было предположено, что ингаляция газообразного NO может явиться спасительной терапией в преодолении этой патологии [15–20]. Действительно, такой результат был получен при лечении шести беременных женщин с COVID-19 путем их ежедневной 30- и 60-минутной ингаляции потоком газообразного NO при концентрации 160–200 ppm в течение соответственно пятнадцати первых и пятнадцати последующих суток [20]. При меньшей концентрации газообразного NO (30 ppm), использованной в работе [21], при лечении больных с COVID-19 отмечалось только улучшение функционирования кровеносных сосудов из-за вазодилатирующего действия на них NO, а также из-за блокирующего действия последнего на агрегацию тромбоцитов. Таким образом, есть основание предполагать, что ингаляция пациентам газообразного NO при повышенных дозах этого агента может оказаться одним из подходов к лечению COVID-19.

Наряду с возможностью использования газообразного NO при лечении коронавирусной инфекции вполне естественным представляется возможность использования с той же целью соединений-доноров нейтральных молекул NO. Такого рода предположение о целесообразности проверки противовирусного действия широкого класса производных оксида азота — динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами — было высказано недавно одним из авторов настоящего сообщения [22]. Эти комплексы, моноядерные и биядерные формы которых (М- и Б-ДНКЖ) характеризуются резонансными структурами $[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO^+)(NO)]^+$ и $[(RS^-)_2Fe^{2+}_2(NO^+)_2(NO)_2]^{4+}$, способны в соответствии с этими структурами выступать в живых организмах не только в качестве доноров нейтральных молекул NO, но и в качестве доноров окисленной формы NO — катионов нитрозония (NO^+) [23–28]. Тем самым ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут воздействовать на разнообразные метаболические процессы, ответственные за проникновение коронавирусов во внутриклеточную среду и репликацию в ней этих вирусов. Что касается доставки ДНКЖ до тканей, инфицированных коронавирусом, наиболее оптимальной представляется ингаляция пациентам

с COVID-19 распыленных водных растворов этих комплексов [22].

В пользу того, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут подавлять репликацию вирусов, причем именно как доноры катионов нитрозония, в работе [22] приводится ссылка на результаты работы [29], в которой было продемонстрировано такого рода действие ДНКЖ с цистеином на репликацию вируса Coxsackie-B, инфицирующего ткани миокарда у крыс. Катионы нитрозония, высвобождающиеся из ДНКЖ, вызывали S-нитрозирование тиоловых групп вирусной протеазы 2A, что приводило к подавлению активности этого формента и как следствие этого к блокированию репликации вируса Coxsackie-B [29, 30]. Аналогичное цитотоксическое действие на опухолевые клетки Jurkat, обусловленное S-нитрозированием тиолсодержащих белков, расположенных на клеточной поверхности этих клеток, при их обработке ДНКЖ с тиосульфатом было продемонстрировано в работе [31].

Таким образом, не исключено, что подавление репликации коронавируса может быть обеспечено ингаляцией пациентов распыленными водными растворами ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при соответствующем выборе оптимальной дозы этих комплексов, оптимальном выборе тиолсодержащих лигандов и времени ингаляции.

Препятствием для использования газообразного NO и распыленных водных растворов ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами может оказаться следующее. При повышенной дозе этих агентов в ходе их ингаляции пациентам с COVID-19 поступление в организм газообразного NO может приводить как к значительному снижению артериального давления в малом и большом круге, так и к окислению значительной части гемоглобина до метгемоглобина [32–36], тогда как при введении ДНКЖ, характеризующихся чрезвычайно высокой гипотензивной активностью [37–40], их поступление в кровь может приводить к выраженной гипотонии. В связи с этим цель настоящей работы состояла в том, чтобы выяснить, действительно ли эти факторы могут существенно затруднить использование газообразного NO и распыленных водных растворов ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами для лечения COVID-19?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ферросульфат ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион (GSH) и N-ацетил-L-цистеин (NAC) (Sigma, США). Газообразный NO, использовавшийся при синтезе ДНКЖ, получали в реакции ферросульфата с нитритом натрия в 0.1 М HCl с последующей очисткой газооб-

разного NO методом низкотемпературной сублимации в вакуумированной камере [25].

Синтез биядерных ДНКЖ с глутатионом или N-ацетил-L-цистеином. Оба типа Б-ДНКЖ (Б-ДНКЖ-GSH и Б-ДНКЖ-NAC соответственно) синтезировали в аппарате Тунберга в реакции ферросульфата и глутатиона или N-ацетил-L-цистеина с газообразным NO при давлении 150 мм рт. ст. и молярном соотношении $\text{Fe}^{2+} : \text{GSH}$ или $\text{Fe}^{2+} : \text{NAC}$, равным 1 : 2, в соответствии с методом, описанным в работе [25]. После растворения ферросульфата в 0.5 мл дистиллированной воды и глутатиона или N-ацетил-L-цистеина в 4.5 мл 15 mM раствора HEPES-буфера при pH 7.4 приготовленные растворы помещали соответственно в верхнюю и нижнюю часть аппарата Тунберга с последующей его откачкой и напуском в него NO. После этого оба раствора смешивали в присутствии NO и встряхивали в течение 5 мин с последующей откачкой NO из аппарата. Концентрацию синтезированных таким путем Б-ДНКЖ оценивали оптическим методом по интенсивности характерных для этих комплексов полос поглощения на 310 и 350 нм с коэффициентами экстинкции, равными соответственно 4600 и $3700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (при расчете на один железо-динитрозильный фрагмент в Б-ДНКЖ) [25]. Концентрация полученных Б-ДНКЖ определялась уровнем ферросульфата (5 mM), использованным при синтезе этих комплексов.

Получение NO-содержащего газового потока и мониторинг NO, NO₂, O₂, давления крови, степени насыщения (сатурации) крови (гемоглобина) кислородом у добровольцев. Поток газаобразного NO, использовавшиеся для ингаляции животных (крыс) и добровольцев, получали на серийных образцах аппарата «ПЛАЗОН» с заводскими номерами 450 и 492 производства компании ООО «ЦВТМ при МГТУ имени Н.Э. Баумана» (Москва). Формирование NO-содержащих газовых потоков осуществлялось из атмосферного воздуха манипуляторами — плазмохимическими генераторами оксида азота, конструкции которых описаны в работах [41–43].

Для измерения параметров NO-содержащей газовой среды при ингаляционном воздействии использовали газовый анализатор OPTIMA 7 производства компании MRU GmbH (Германия), позволяющий измерять в газовых потоках температуру в диапазоне 0–650°C (погрешность 1%), содержание оксида азота C_{NO} и двуокиси азота C_{NO_2} в диапазоне 0–5000 ppm и 0–1000 ppm соответственно с погрешностью 5%, а также содержание в потоке кислорода в диапазоне 0–21.0 об. % с погрешностью $\pm 0.2\%$ об. %.

Измерение артериального давления и пульса у добровольцев осуществляли с помощью автома-

тического монитора кровяного давления OMRON M3 Expert (OMRON Healthcare Co., Япония), позволяющим определять систолическое и диастолическое давление в диапазоне 0–299 мм рт. ст. с абсолютной погрешностью ± 3 мм рт. ст. и частоту пульса в диапазоне 40–180 ударов/мин с относительной погрешностью $\pm 5\%$.

Уровни насыщения крови кислородом у добровольца при ингаляции оксидом азота определяли оксиметром C101A2 (Medical Technology Co., Китай), позволяющим измерять насыщение гемоглобина кислородом (сатурацию SpO_2) в диапазоне 70–100% с точностью 2%.

Ингаляция газообразного NO добровольцам. При ингаляции двух здоровых добровольцев (соавторов настоящей статьи — А.В.П. и А.Б.В., возраст 45 и 55 лет соответственно) использовали аппарат «ПЛАЗОН» с заводским номером 492, для получения различных концентраций оксида азота в ингаляционной области NO-содержащего газового потока, снабженный двумя различными типами манипуляторов. Использование манипулятора, описанного в работе [42], позволяло при изменении расстояния от выходного канала манипулятора от 120 до 400 мм получать в области дыхания на оси потока концентрацию оксида азота соответственно от 600 до 100 ppm с температурой в диапазоне 50–20°C. Использование манипулятора, описанного в работе [43], позволяло при изменении расстояния от 60 до 100 мм получать в области дыхания на оси потока концентрации оксида азота соответственно от 1000 до 2100 ppm с температурой в диапазоне 50–25°C.

Доброволец, удерживая манипулятор на определенном расстоянии от носа, осуществлял вдох через нос, а выдох через рот в гофрированную трубку с внутренним диаметром 16 мм, содержащую внутри себя датчик газового анализатора OPTIMA 7. Измерения содержания оксида азота ($C_{\text{NO}}^{\text{out}}$), двуокиси азота и кислорода в выдыхаемой газовой смеси производилось в течение 3 мин через каждые 30 с. Измерение содержания оксида азота ($C_{\text{NO}}^{\text{in}}$), двуокиси азота и кислорода во вдыхаемой газовой смеси проводили на работающем манипуляторе до и после ингаляции. Таким образом было проведено девять процедур в диапазоне изменения содержания оксида азота $C_{\text{NO}}^{\text{in}}$ от 100 до 2100 ppm.

Интенсивность поглощения оксида азота в дыхательной системе при частоте дыхания 12 вдохов/мин и объеме вдыхаемого воздуха 1 литр/вдох определяли по формуле:

$$\dot{m}_{\text{NO}} = 2.89 \cdot 10^{-4} (C_{\text{NO}}^{\text{in}} - C_{\text{NO}}^{\text{out}}), \quad (1)$$

где $C_{\text{NO}}^{\text{in}}$ и $C_{\text{NO}}^{\text{out}}$ измерены в ppm, — в мг/с [43].

До и после ингаляции в течение 15 мин при содержании оксида азота во вдыхаемой газовой

смеси 500 и 1000 ppm у добровольцев было проведено измерение артериального давления и пульса. Измерения сатурации крови кислородом у добровольца проводили в восьми экспериментах при длительности ингаляции 4 и 15 мин и при содержании оксида азота во вдыхаемом NO-содержащем газовом потоке, равном 164, 500, 1008 и 2090 ppm. Измерения проводили каждую минуту закрепленным на среднем пальце левой руки добровольца пульсоксиметром до (в течение 5–6 мин), во время (4 и 15 мин) и после ингаляции в течение времени, при котором величина сатурации возвращалась к начальному значению.

Ингаляция NO животным. Ингаляцию газообразным оксидом азота животных (крыс) осуществляли NO-содержащим газовым потоком, формируемым стандартным манипулятором [42] аппарата «ПЛАЗОН» с заводским номером 450. Ингаляцию проводили в течение 1 ч областью NO-содержащего газового потока, находившейся на расстоянии 180–200 мм от выходного канала манипулятора до экспериментального животного, осевые параметры ингаляционного потока в этой области: содержание оксида азота $C_{NO} = 400$ ppm, содержание двуокси азота $C_{NO_2} = 30$ ppm, температура 38°C.

Ингаляция животных распыленными водными растворами Б-ДНКЖ с глутатионом или с НАС. Эксперименты проводили на нормотензивных крысах-самцах Вистар массой 300–400 г. Животных анестезировали путем внутривенного введения им 5%-го раствора кетамина (100 мг/кг массы). Поскольку кетамин оказывает анестезирующее действие лишь на сравнительно короткое время, крысам через каждые 30–40 мин этот анестетик вводили дополнительно в дозе 5–10 мг/кг.

Среднее артериальное давление измерялось с использованием катетера, вводившегося в яремную артерию, с последующим его подключением к электроманометру P23 Db (Gould Statham, США), на котором регистрировали среднее артериальное давление на полиграфе Biograph-4 (Санкт-Петербургский госуниверситет аэрокосмического приборостроения, Санкт-Петербург). Запись на компьютер выполняли с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (National Instruments, США) и программы Data Acquisition, модифицированной д.б.н. Е.В. Лукошковой для обработки физиологических сигналов.

Ингаляцию распыленных растворов Б-ДНКЖ с GSH или с НАС проводили, используя для этой цели небулайзер фирмы Micrilife (Италия), который заполняли 10 мл 5 мМ раствора этих комплексов. Получаемый при этом поток этого распыленного раствора, включавший в себя микрокапли диаметром 2–3 мкм, направляли через специальную иглу в носовую полость животных, что и приводило к поступлению всего 10-мл раствора

Б-ДНКЖ в дыхательные пути животных и в ткань легких. В таком объеме, т.е. в дозе 50 микромолей, животным в течение часа вводили Б-ДНКЖ-НАС, тогда как Б-ДНКЖ-GSH вводили в дозе 100 микромолей в течение 2 ч (дважды по 10 мл раствора этого комплекса).

ЭПР-измерения на тканях животных. Спектры ЭПР замороженных препаратов тканей крыс регистрировали на ЭПР радиоспектрометре Model 109E (Varian, США) X-диапазона при 77 К. Образцы крови, печени и почек крыс перед замораживанием помещали в ампулы диаметром 4 мм с последующим быстрым замораживанием в жидком азоте. Для оценки концентрации парамагнитных центров, ответственных за регистрируемые в этих образцах сигналы ЭПР, применяли метод двойного интегрирования этих сигналов, в качестве стандартного образца использовали замороженный раствор парамагнитного М-ДНКЖ с глутатионом с известной концентрацией, характеризующийся сигналом ЭПР со значениями $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$ и $g_{cp} = 2.03$ – сигналом 2.03 [25], на котором мы остановимся ниже. Спектры ЭПР некоторых образцов регистрировали при комнатной температуре.

Статистический анализ результатов проводили, используя t -критерий Стьюдента с представлением экспериментальных данных как среднее $\pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ингаляция добровольцев газообразным NO сопровождалась почти 90%-м поглощением этого газа в организме человека, о чем свидетельствуют приведенные в табл. 1 данные экспериментальной оценки соотношения между концентрациями вдыхаемого и выдыхаемого оксида азота при содержании NO во вдыхаемом воздухе 500 и 1700 ppm в течение 3 мин.

Измеренное соотношение между содержанием оксида азота во вдыхаемом и в выдыхаемом воздухе в диапазоне содержания NO во вдыхаемом воздухе от 100 до 2100 ppm показано на рис. 1, а на рис. 2 приведен пересчет по формуле (1) соотношения между количеством вдыхаемого оксида азота и интенсивностью его поглощения в дыхательной системе добровольца.

Оценка степени насыщения крови кислородом у добровольцев при вдыхании ими газообразного NO в диапазоне концентраций 164–2090 ppm в течение 15 мин показала (рис. 3), что эта процедура приводила к быстрому снижению на несколько процентов содержания кислорода в крови, которое начинало повышаться до нормальных значений только через час и более. Обнаруженное снижение, очевидно, было обусловлено превращением гемоглобина в метгемоглобин в результате окисления гемового железа в его

Таблица 1. Результаты измерений содержания газов на вдохе (через нос) и выдохе (через рот)

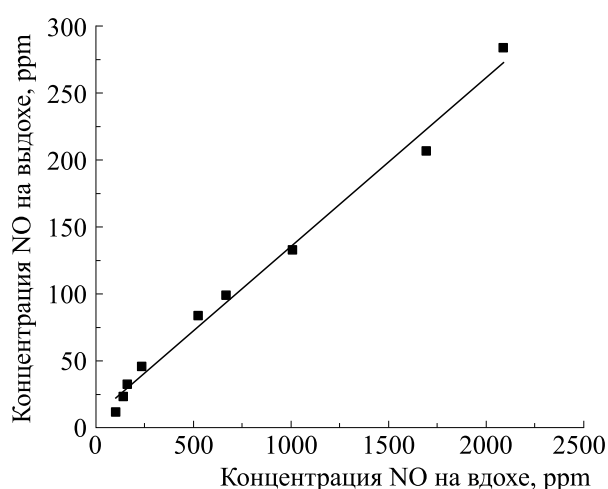
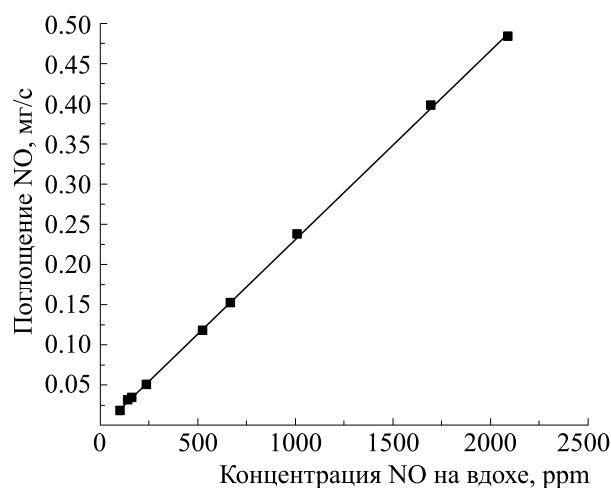
Время, с	NO, ppm	NO ₂ , ppm	O ₂ , %	NO, ppm	NO ₂ , ppm	O ₂ , %	Локализация
0	500	45	20.9	1700	211	20.8	На вдохе
30	74	0	17.6	166	3	17.8	В выдохе
60	68	0	17.7	184	3	17.8	
90	63	0	17.7	202	4	18.1	
120	64	0	17.7	215	4	18.2	
150	65	0	17.9	231	4	18.2	
180	67	0	17.8	243	5	18.2	
Средние значения	66.83	0	17.73	206.83	3.83	18.05	
Поглощение, %	86.61	100	3.17	87.79	98.18	2.75	В дыхательной системе

нитрозильном комплексе до трехвалентного состояния. Последующее восстановление гемового железа до двухвалентного состояния, в котором оно было способно оксигенироваться, происходило, судя по результатам, приведенным на рис. 3, в течение нескольких часов (в зависимости от степени насыщения крови кислородом).

Если учесть, что количество гемоглобина в 5 л крови взрослых мужчин составляет ~12 ммоль, а количество гемовых групп, способных связывать по одной молекуле NO, равно ~50 ммоль, то по степени снижения насыщения крови кислородом можно оценить количество нитрозильных комплексов гемоглобина, возникавших в крови добровольцев, в зависимости от концентрации NO в газовом потоке и времени его вдыхания. Как следует из табл. 2, количество NO, связавшегося в крови добровольцев с гемоглобином, варьировало от 6.5 до 1.5 ммоль при ингаляции доброволь-

цу в течение 15 мин газообразного NO в концентрации соответственно 2090–164 ppm.

Встает вопрос — в какой мере эти величины соответствовали общему количеству газообразного NO, поглощенного организмом добровольцев, которое можно было оценить, используя приведенное на рис. 2 соотношение между концентрацией вдыхавшегося NO и количеством поглощенного за одну секунду NO в мг. Как следует из данных, представленных в табл. 2, количество NO, поглощенного организмом добровольцев, по мере повышения концентрации NO в газовом потоке начинало существенно превышать количество этого агента, включавшегося в комплексы с гемоглобином — в 2.3 раза при наибольшей концентрации NO (2090 ppm). И только при наименьшей концентрации NO в газовом потоке (164 ppm) весь поглощенный организмом NO оказывался связанным с гемоглобином.


Рис. 1. Соотношение между содержанием оксида азота во вдыхаемом и в выдыхаемом воздухе.

Рис. 2. Интенсивность поглощения оксида азота в дыхательной системе в зависимости от его содержания во вдыхаемом воздухе.

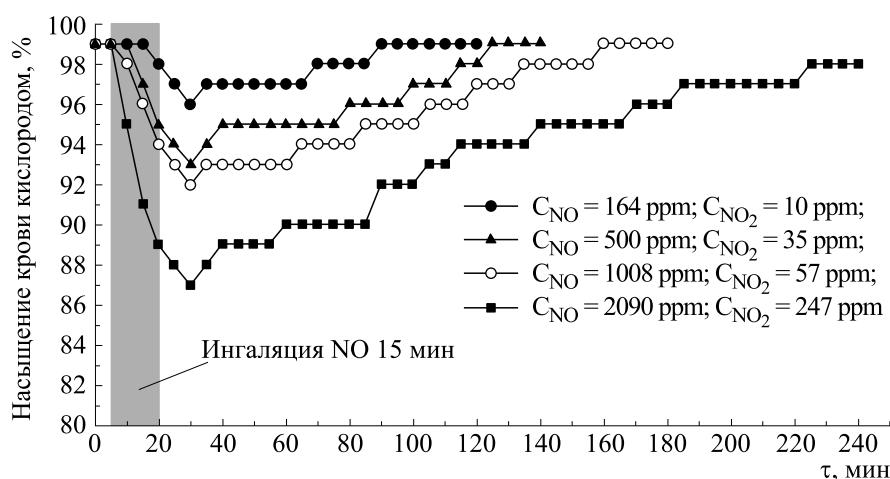


Рис. 3. Типичная кинетика изменения степени насыщения крови (гемоглобина) кислородом у добровольцев после вдыхания ими NO в течение 15 мин в диапазоне концентраций 164–2090 ppm.

Характерно, что, как показали соответствующие измерения, при понижении времени вдыхания газообразного NO до 4 мин различие между количеством этого агента, поглощенного организмом и включенным в гемоглобин, полностью нивелировалось даже при максимальной концентрации NO в газовом потоке, составлявшей 2100 ppm, — в обоих случаях оно снижалось до одинаковой величины ~4 ммоль.

Ясно, что молекулы NO, связавшиеся с гемоглобином с последующим их окислением до нитрата, не могли вызывать снижения артериального давления. Оно могло быть обусловлено только не связанным с гемоглобином NO, количество которого составляло при этом 8.5, 3.5 и 1.5 ммоль соответственно при вдыхании NO в концентрации 2000, 1000 и 500 ppm (табл. 2). Тем не менее оценка уровня артериального давления у добровольцев при таких сравнительно высоких концентрациях вдыхаемого NO не показала существенного

снижения у них системного давления (табл. 3). При концентрации NO, равной 500 ppm, и температуре газового потока 50°C артериальное давление у первого добровольца после 15-минутной ингаляции снижалось в среднем не более чем на 10%, а у второго при той же NO и температуре газового потока 30°C оно практически не изменялось, тогда как при концентрации 1000 ppm и температуре газового потока 25–30°C снижение артериального давления у обоих добровольцев не обнаруживалось (табл. 3).

Ингаляционное введение крысам газообразного NO, продуцируемого плазмохимическим генератором в течение 1 ч при содержании NO в газовой фазе ~400 ppm, также практически не сказывалось на артериальном давлении у животных (фиксировалось снижение менее чем на 5%). При этом в крови методом ЭПР обнаруживалось значительное количество нитрозильных комплексов гемоглобина (Hb-NO), обнаруживаемых по ха-

Таблица 2. Соотношение между полным количеством NO, поглощенным организмом добровольца, и количеством NO, связавшегося в крови добровольца с гемоглобином (в миллимолях) при 15-минутной ингаляции газообразным NO

Концентрация вдыхаемого NO	Полное количество поглощенного NO (A)	Количество NO, связавшегося с гемоглобином (B)	Соотношение A/B
2000 ppm	15	6.5	2.3
1000 ppm	7	3.5	2.0
500 ppm	4	2.5	1.6
160 ppm	1.5	1.5	1.0

Таблица 3. Артериальное давление у добровольцев до и после 15-минутной ингаляции NO в концентрации 500 и 1000 ppm

Доброволец 1	Артериальное давление и пульс			
Измерение	1	2	3	Среднее
До ингаляции $C_{NO} = 500$ ppm, $t = 50^\circ\text{C}$	131/86, 66	127/87, 67	127/84, 66	128/85, 66
После ингаляции сразу	128/76, 65	113/77, 68	118/74, 68	120/76, 67
После ингаляции через 20 мин	108/76, 66	118/77, 67	116/78, 66	114/77, 66
После ингаляции через 60 мин	134/87, 65	134/88, 65	128/87, 66	132/87, 65
До ингаляции $C_{NO} = 1000$ ppm, $t = 30^\circ\text{C}$	127/83, 64	128/82, 63	129/86, 63	128/84, 63
После ингаляции сразу	125/80, 64	125/79, 64	123/81, 64	124/80, 64
После ингаляции через 20 мин	121/80, 64	123/80, 65	124/84, 65	122/81, 65
После ингаляции через 60 мин	131/90, 65	134/87, 64	128/86, 65	131/87, 65
Доброволец 2	Артериальное давление и пульс			
Измерение	1	2	3	Среднее
До ингаляции $C_{NO} = 500$ ppm, $t = 25^\circ\text{C}$	155/96, 65	151/95, 65	146/93, 65	151/95, 65
После ингаляции сразу	149/92, 62	149/90, 62	150/91, 62	149/91, 62
После ингаляции через 20 мин	143/91, 64	142/89, 63	143/93, 63	143/91, 63
После ингаляции через 60 мин	148/95, 63	148/94, 63	147/91, 63	148/93, 63
До ингаляции $C_{NO} = 1000$ ppm, $t = 30^\circ\text{C}$	154/94, 63	154/97, 63	153/96, 65	154/96, 64
После ингаляции сразу	145/87, 60	146/89, 63	148/89, 61	146/88, 61
После ингаляции через 20 мин	144/90, 62	149/91, 63	150/92, 62	147/91, 62
После ингаляции через 60 мин	156/93, 62	155/96, 65	153/95, 65	155/95, 64

Примечание: t — температура NO-содержащего газового потока в области ингаляции.

рактерному для них сигналу ЭПР со значениями g -фактора $g_1 = 2.07$, $g_2 = 2.01$ и $g_3 = 1.98$ с триплетной сверхтонкой структурой с центром при $g_2 = 2.01$ (рис. 4а). Концентрация этих комплексов достигала 75 микромолей/л крови или 6 микромолей на кг массы животных.

Этот стационарный по своему происхождению уровень определялся соотношением скоростей поступления газообразного NO в кровь, с одной стороны, и, с другой стороны, скоростью окисления NO в составе нитрозильных комплексов Hb кислородом воздуха, приводившего к исчезновению этих комплексов [35, 36].

Появление значительного количества комплексов Hb-NO в крови показывает, что газообразный NO при ингаляционном введении достаточно легко проникал в кровь и далее в эритроциты, в которых, связываясь с гемовыми группами гемоглобина, образовывал ЭПР-регистрируемые моонитрозильные комплексы Hb-NO. По-

скольку заметного снижения системного артериального давления при этом не обнаруживалось, есть основание утверждать, что подавляющая часть газообразного NO, поступавшего через легкие в кровь, связывалась с гемоглобином, так что оставшейся части NO (несвязавшейся в крови с гемоглобином) было недостаточно для инициирования снижения артериального давления.

Сигнал ЭПР Hb-NO, обусловленный сохранением в органах животных остаточной крови, регистрировался практически во всех органах животных, прошедших процедуру ингаляции газообразным NO. На рис. 4 приведены такого рода сигналы, зарегистрированные в легких и почках крыс. Образование других парамагнитных нитрозильных комплексов железа, а именно М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, характеризующихся сигналом ЭПР с $g_{cp} = 2.03$, приводимым ниже на рис. 5 и 6, в исследованных препаратах крыс обнаружено не было.

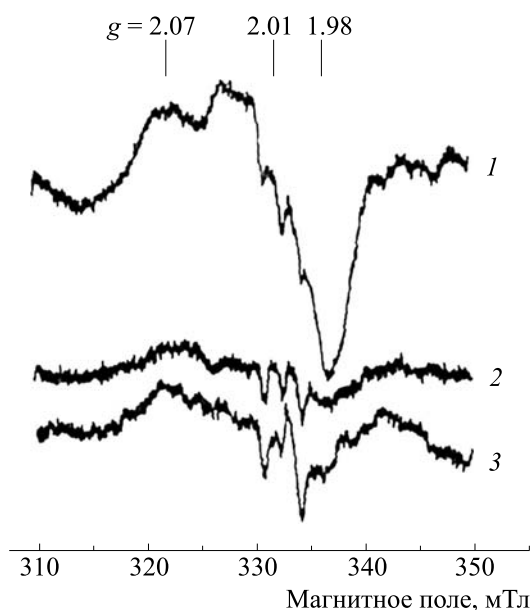


Рис. 4. Спектры ЭПР замороженных препаратов крови (1), легких (2) и почек (3) крысы, взятых после одночасовой ингаляции животного газообразным NO. Условия записи: $T = 77$ К, амплитуда модуляции 0.4 мТл, усиление радиоспектрометра $\times 10^4$.

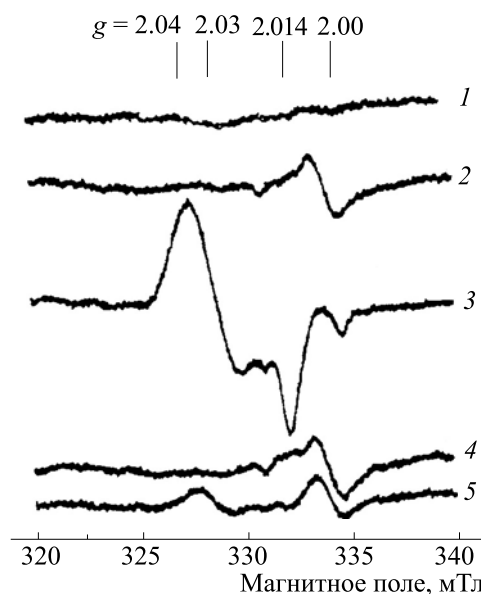


Рис. 5. Спектры ЭПР замороженных препаратов крови (1), сердца (2), легких (3), печени (4) и почек (5) крысы при ингаляционном введении ей в течение двух часов распыленного водного раствора Б-ДНКЖ с глутатионом. Условия записи: $T = 77$ К, амплитуда модуляции 0.4 мТл, усиление радиоспектрометра $\times 10^4$.

Ингаляция крыс распыленными водными растворами Б-ДНКЖ-НАС или Б-ДНКЖ-GSH соответственно в количестве 50 или 100 микромолей на животное в течение одного или двух часов приводила к появлению в ткани легких этих животных белок-связанных М-ДНКЖ, обнаруживаемых по характерному для них сигналу ЭПР со значениями g -фактора $g = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$, $g_{\text{ср}} = 2.03$, о котором упоминалось выше (называемому в соответствии со средним значением g -фактора сигналом 2.03) (рис. 5, спектр 3; рис. 6, спектр 1). О белковой природе М-ДНКЖ свидетельствовал факт сохранения такой же анизотропной формы сигнала 2.03 при повышении температуры его регистрации до комнатной: низкая подвижность белковой глобулы, включавшей М-ДНКЖ, была недостаточна при этой температуре для усреднения анизотропии g -фактора

Судя по интенсивности сигнала 2.03, регистрируемого в легких, концентрация М-ДНКЖ в ткани этого органа при ингаляции животным Б-ДНКЖ с GSH или с НАС составляла соответственно 70 ± 20 и 90 ± 20 мкМ/кг влажной ткани. Поскольку по отношению к исходному количеству Б-ДНКЖ, поступавшему в организм животных (соответственно 100 и 50 микромолей на животное), стационарная концентрация М-ДНКЖ в легких у животных, вдыхавших Б-ДНКЖ-НАС, была примерно в два раза выше, есть основание полагать, что эффективность взаимодействия этих комплексов с белковым материалом, приво-

дившего к превращению Б-ДНКЖ в белок-связанные М-ДНКЖ, была выше для Б-ДНКЖ-НАС. Не исключено, что это было обусловлено способностью НАС как тиолсодержащего лиганда более легко, чем GSH, проникать сквозь клеточные мембраны.

Сигнал 2.03 с интенсивностью, соответствующей 10 ± 5 и 30 ± 10 мкМ/кг влажной ткани у крыс, ингалированных соответственно Б-ДНКЖ с GSH и с НАС, был зарегистрирован также в ткани почек (рис. 5, спектр 5; рис. 6, спектр 2). Появление М-ДНКЖ в почках свидетельствует о том, что небольшая часть Б-ДНКЖ могла через легкие поступать в кровь и затем накапливаться в почках с последующим удалением образовавшихся М-ДНКЖ из организма. Что касается крови, то судя по едва регистрируемому в ней сигналу 2.03 с интенсивностью, соответствующей не более 1–2 мкМ/л, стационарный уровень белок-связанных М-ДНКЖ был незначителен и не мог инициировать заметного снижения артериального давления у животных. Действительно, при ингаляции крысам Б-ДНКЖ-GSH никакого заметного снижения артериального давления у этих животных не обнаруживалось. Небольшое (не более чем 5%-е) снижение артериального давления у животных наблюдалось при введении им Б-ДНКЖ-НАС. Судя по результатам работ [38, 39], заметное снижение артериального давления у крыс (на ~20%) имело место при внутривенном

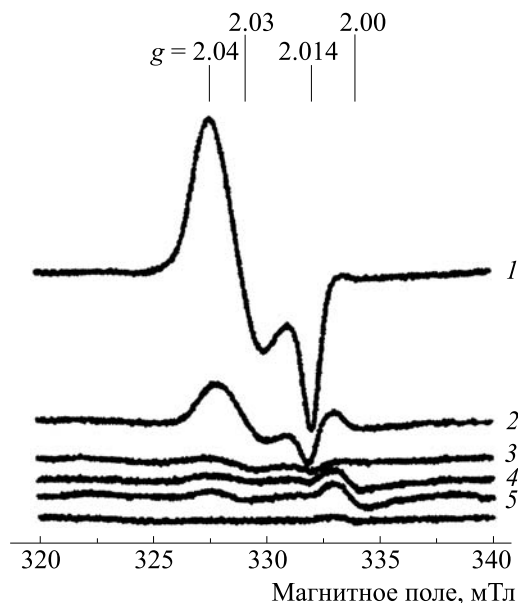


Рис. 6. Спектры ЭПР замороженных препаратов легких (1), почек (2), крови (3), сердца (4), печени (5) и скелетной мышцы (6) крысы после одночасового ингаляционного введения ей распыленного водного раствора Б-ДНКЖ с Н-ацетил-L-цистеином. Условия записи: $T = 77$ К, амплитуда модуляции 0.4 мТл, усиление радиоспектрометра $\times 10^4$.

введении им ~ 30 мкМ/л Б-ДНКЖ с GSH или цистеином.

Что касается интенсивности сигнала 2.03 в других тканях — в тканях печени и сердца, она, как и в крови, была незначительной и соответствовала не более 2–3 мкМ/кг влажной ткани (рис. 5, 6). Характерно, что ни в легких и почках, ни в крови, ни в других тканях крыс при введении им Б-ДНКЖ с GSH или с NAC появление Hb-NO не обнаруживалось, судя по спектрам ЭПР. Это означает, что не имело места заметное высвобождение нейтральных молекул NO из вводимых ДНКЖ.

Таким образом ингаляционное введение крысам в течение 1 или 2 ч в составе распыленных водных растворов 50 или 100 микромолей ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (0.2 или 0.4 ммоль/кг веса животных) не оказалось опасным в отношении снижения артериального давления. Подавляющая часть этих комплексов локализовалась в легких. При этом их концентрация в легких — 0.07–0.09 ммоль/кг массы ткани — была существенно ниже токсической дозы использованных комплексов согласно данным, приводимым в работе [37]. Величина LD_{50} для Б-ДНКЖ с глутатионом для крыс при внутривенном введении им этих комплексов оказалась равной 3.8 ммоль ДНКЖ/кг массы животного [37].

ОБСУЖДЕНИЕ

Неожиданный и наиболее интересный результат, полученный при изучении последствий инга-

ляции газообразного NO на добровольцах, — что при высоких дозах этого агента, поступающего в организм человека, значительная его часть (более половины — до 8.5 ммоль при концентрации NO в газовом потоке 2100 ppm) оставалась не включенной в комплексы с гемоглобином. Встает вопрос — почему молекулы NO, поступающие в легкие, начинали задерживаться в ткани легких и, очевидно, в ткани дыхательных путей, не поступая в кровь, где они могли бы связаться с молекулами гемоглобина как ловушками NO? И второй вопрос — почему, как это следует из табл. 2, задержка NO в ткани легких усиливалась по мере повышения дозы NO, поступавшего в эти ткани?

Ответы на эти вопросы можно получить исходя из данных, полученных в работах [44, 45], в которых изучалось действие газообразного NO на культуры клеток животных. В работе [44] было достаточно убедительно показано, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами по своему количеству доминируют среди других продуктов, образующихся в реакции NO с внутриклеточным содержимым — S-нитрозотиолами, органическими и неорганическими нитритами и нитратами. Этот результат указывает на то, что именно включение NO в эти комплексы могло определять задержку NO в тканях легких и дыхательных путей при вдыхании этого агента добровольцами. Что касается работы [45], то в ней было обнаружено значительное повышение уровня слабосвязанного («свободного») железа при понижении содержания кислорода в среде культивирования клеток животных, т.е. в условиях гипоксии, которое приводило к резкому повышению количества ДНКЖ

с тиолсодержащими лигандами, образующимися в реакции NO и тиолов со «свободным» железом. Таким образом, исходя из этих результатов, можно предположить, что обнаруженное нами усиление задержки NO в ткани легких и дыхательных путей по мере повышения дозы вдыхаемого добровольцами газообразного NO могло быть обусловлено повышением содержания ДНКЖ в этих органах, естественно, в соответствии с законом действующих масс, а также из-за повышения в них уровня свободного железа. Последнее, в свою очередь, могло определяться ослаблением оксигенации тканей легких и дыхательных путей, т.е. их гипоксией в результате включения кислорода, поступавшего в них из воздуха, в реакцию с газообразным NO с образованием диоксида азота (NO_2).

Таким образом, ингаляция добровольцев газообразным NO могла приводить к поглощению значительной части этого агента в тканях легких и дыхательных путей в результате его включения в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Тем самым реализовалась ситуация, аналогичная ингаляционному введению распыленных растворов этих комплексов, исследованному в нашей работе. В обоих случаях как у добровольцев, так и у животных не обнаруживалось заметного влияния исходно вводимых газообразного NO и ДНКЖ с GSH или с NAC на системное артериальное давление: ДНКЖ, образующиеся после введения добровольцам NO или те же комплексы, исходно вводившиеся животным, локализовались в основном в легких.

Из результатов экспериментов на животных следует, что ингаляционно вводимые им ДНКЖ не переходили в заметном количестве в кровь. Наибольшая их концентрация в крови крыс составляла 1–2 мкМ/л, что было существенно ниже концентрации этих комплексов (30–40 мкМ/л), вводившихся нормотензивным крысам внутривенно, при которой системное артериальное давление снижалось на 20% [38, 39].

Следует отметить, что в опытах с ингаляцией крысам газообразного NO в легких и печени этих животных были зарегистрированы сигналы ЭПР, характерные только для комплексов Nb-NO (рис. 4). Сигнал 2.03, характерный для М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, даже в легких не наблюдался, что, казалось бы, не согласуется с высказанным выше предположением о возможности образования этих комплексов у таких животных. Это несоответствие снимается, если учесть, что в тканях животных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами существуют преимущественно не в ЭПР-активной, т.е. парамагнитной мономерной форме (М-ДНКЖ), а в ЭПР-неактивной, т.е. диамагнитной форме – Б-ДНКЖ [46, 47]. Поэтому отсутствие в спектре ЭПР легких

крыс (рис. 4) сигнала 2.03 не означает, что в легких у крыс, обработанных газообразным NO, не возникали ДНКЖ в их биядерной форме.

Тем не менее ясно, что вопрос о возникновении ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в органах животных (и человека) при ингаляции газообразного NO остается открытым и требует дальнейших исследований.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что преимущественная локализация ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в тканях легких и дыхательных путей при введении животным этих комплексов как предварительно синтезированных, так и (как это предполагается) возникающих в этих тканях при введении газообразного NO приводит к тому, что заметное снижение артериального давления у этих животных не имеет места. Этот результат снимает возражение против проведения ингаляционного введения газообразного NO или низкомолекулярных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами пациентам с COVID-19 с целью возможного купирования этого заболевания.

Как предполагается в работе [22], цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на коронавирус может определяться способностью этих комплексов выступать в качестве доноров NO^+ , обеспечивающих S-нитрозирование важнейших для репликации SARS-CoV-2 вируса и тем самым способных вызывать купирование COVID-19. Не исключено, что накопление ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в тканях легких и дыхательных путей, т.е. основных мест локализации коронавируса в организме человека, при контакте этих тканей как с газообразным NO, так и с экзогенными низкомолекулярными ДНКЖ может оказать существенное положительное действие на процесс устранения коронавируса из организма человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства образования и науки РФ (00008202014-00018, № АААА-А17-117040810310-8, 0082-2014-0008, и АААА-А17-1170403100008-5), спонсирована Российским академическим проектом «5-100», а также финансирована в рамках грантов Российского фонда фундаментальных исследований No. 18-04-00059а и 18-015-00027.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. О. Быкова, Н. В. Горбунов, А. А. Волгарев и др., Бюлл. эксп. биол. мед. **112**, 617 (1991).
2. G. Karupian and N. Harris, J. Exp. Med. **181**, 2171 (1995).
3. E. Peterhans, Biol. Trace Element Res. **56**, 107 (1997).
4. T. Akaike and H. Maeda, Immunology **101**, 300 (2000).
5. S. Akerstrom, M. Mousavi-Jazi, J. Klingstrom, et al., J. Virol. **78**, 1966 (2005).
6. C. J. Lowenstein, S. L. Hill, A. Lafond-Walker, et al., J. Clin. Invest. **97**, 1837 (1996).
7. C. S. Reiss and T. Kamatsu, J. Virol. **72**, 4547 (1998).
8. E. Keyaerts, L. Vijgen, L. Chen, et al., Int. J. Infect. Dis. **8**, 223 (2004).
9. W. Xu, S. Zheng, R.A. Dweik, et al., Free Radic. Biol. Med. **41**, 19 (2006).
10. G. Regev-Shoshani, S. Vimalanathan, B. McMullin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **31**, 48 (2015).
11. E. U. Uehara, B. de Stefano Shida, and C. A. de Brito, Inflamm. Res. **64**, 845 (2015).
12. M. Colosanti, T. Persichini, G. Venturini, et al., IUBMB Life, **48**, 25 (1999).
13. L. A. Perrone, J. A. Belser, D. A. Wadford, et al., J. Infect. Dis. **207**, 1576 (2013).
14. D. Torre and G. Ferrario, Med. Hypothesis **47**, 405 (1996).
15. L. J. Ignarro, Br. J. Pharmacol. **177**, 3848 (2020).
16. J. Zhang, B. Xie, and K. Hashimoto, Brain, Behavior, and Immunity **87**, 59 (2020).
17. A. Cavezzi, E. Troiani, and S. Corrao, Clinics and Practice **10**, 1271 (2020).
18. J. Kobayashi and I. Murata, Ann. Intensive Care **10**, 61 (2020).
19. N. A. Adusumilli, D. Chang, J. M. Friedman, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **103**, 4 (2020).
20. B. S. Fakhr, S. B. Wiegand, R. Pinkiroli, et al., Obstetrics & Gynecology **135** (6), 1109 (2020). DOI: 10.1097/AOG.0000000000004128
21. R. Parikh, C. Wilson, J. Weinberg, et al., Ther. Adv. Respir. Dis. **14**, 1 (2020).
22. А. Ф. Ванин, Биофизика **65**, 818 (2020).
23. А. Ф. Ванин, Nitric Oxide Biol. Chem. **21**, 1 (2009).
24. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, J. Biophys. **2011**, 878236 (2011). DOI: 10.1155/2011/878236
25. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **23**, 136 (2011).
26. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
27. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys. **77**, 279 (2019).
28. A. F. Vanin, Appl. Magn. Res. **51**, 851 (2020). DOI: 10.1007/s00723-020-01270-6
29. C. F. Badorff, B. Fichtlscherer, A. Mülsch, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **6**, 305 (2002).
30. C. F. Badorff, B. Fichtlscherer, R. E. Roads, et al., Circulation **102**, 182 (2000).
31. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **40**, 1340 (2006).
32. M.-D. Fratacci, C. G. Frostell, et al., Anesthesiology **75**, 990 (1991).
33. C. Frostell, M.-D. Fratacci, J. C. Wain, et al., Circulation **83**, 2038 (1991).
34. B. Yu, F. Iscinose, D. B. Bloch, et al., Br. J. Pharmacol. **176**, 246 (2019).
35. A. Wennmalm, G. Benthin, A. Edlund, et al., Circ. Res. **73**, 1121 (1993).
36. C. Miller, M. Miller, G. Regev, et al., J. Cystic Fibrosis **11**, 324 (2012).
37. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **26**, 148 (2012).
38. V. L. Lakomkin, A. F. Vanin, A. A. Timoshin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **16**, 413 (2007).
39. A. A. Timoshin, V. L. Lakomkin, A. A. Abramov, et al., Eur. J. Pharmacol. **765**, 525 (2015).
40. T. Liu, M. Zhang, M. H. Terry, et al., Mol. Pharmacol. **93**, 427 (2018).
41. А. В. Пекшев, Н. П. Козлов, А. Б. Вагапов и др., в кн. *NO-терапия: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине*, под ред. С. В. Грачева, А. Б. Шехтера и Н. П. Козлова (Издательский дом «Русский врач», М., 2001), с. 192.
42. A.V. Pekshev, A.B. Shekhter, A.V. Vagapov, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **73**, 74 (2018).
43. A. B. Shekhter, A. V. Pekshev, A. B. Vagapov, et al., Clin. Plasma Med. **19–20**, 100101 (2020). doi.org/10.1016/j.cpme.2020.100101
44. J. R. Hickok, S. Sahni, H. Shen, et al., Free Rad. Biol. Med. **51**, 1558 (2011).
45. Q. Li, C. Li, H. K. Mahtani, et al., J. Biol. Chem. **289**, 19917 (2014).
46. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **62**, 1 (2017).
47. В. Д. Микоян, Е. Н. Бургова, Р. Р. Бородулин и А. Ф. Ванин, Биофизика **65**, 1142 (2020).

Gaseous Nitrogen Oxide and Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as Potential Medicines that Can Relieve COVID-19

A.F. Vanin^{*,}, A.V. Pekshev^{***}, A.B. Vagapov^{***}, N.A. Sharapov^{***}, V.L. Lakomkin^{****},
A.A. Abramov^{****}, A.A. Timoshin^{****}, and V.I. Kapelko^{****}**

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

***Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia*

****Bauman Moscow State Technical University, 2-ya Baumanskaya ul. 5/1, Moscow, 105005 Russia*

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

It has been shown that administration of inhaled gaseous nitric oxide (gNO) or sprayed aqueous solutions of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione or N-acetyl-L-cysteine to animals and humans was not associated with the noticeable hypotensive effects in subjects. Potentially, these attributes may be useful in treatment of COVID-19. It was found that increasing the NO concentration from 100 to 2100 ppm in the gas flow created by the Plazon system caused a decrease in the NO level in complexes with hemoglobin in the blood, so that at 2000 ppm, more than half of this gas was included into dinitrosyl complexes formed in tissues of the lungs and respiratory tract. Thus, inhalation of gNO may lead to effects similar to those observed after analogous administration of solutions of dinitrosyl iron complexes, namely, to the presence of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in lung and respiratory tissues. Taking into account the hypothesis posited earlier (Biophysics 65, 818, 2020) that these complexes as donors of the nitrosonium cation are able to suppress coronavirus replication, it is not unlikely that usage of gaseous NO and chemically synthesized dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands may help treat COVID-19.

Keywords: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, COVID-19