

УДК 577.3

## КАТИОНЫ НИТРОЗОНИЯ КАК НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНЫЕ В ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ КОМПОНЕНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

© 2022 г. А.Ф. Ванин

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 04.03.2022 г.

После доработки 04.03.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Суммированы экспериментальные данные, свидетельствующие о способности динитрозильных комплексов железа выступать в качестве доноров не только молекулярного оксида азота (NO), но и катионов нитрозония (NO<sup>+</sup>). При нейтральных («физиологических») значениях pH в отсутствие тиолов эти катионы превращаются в результате гидролиза в анионы нитрита, тогда в присутствии тиолов — в S-нитрозотиолы. Именно последнее определяет цитотоксическое действие динитрозильных комплексов железа как доноров NO<sup>+</sup> на живые организмы.

*Ключевые слова:* катионы нитрозония, динитрозильные комплексы железа, оксид азота.

DOI: 10.31857/S0006302922030024, EDN: AMYDCZ

### КАТИОНЫ НИТРОЗОНИЯ — КОМПОНЕНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

В настоящее время установлено, что один из универсальных регуляторов метаболических процессов — оксид азота (NO), функционирующий во всех живых организмах, способен оказывать на них не только позитивное, регуляторное, но и негативное, цитотоксическое действие [1]. Последнее в большей степени характерно не для нейтральной, молекулярной формы NO, а для его одноэлектронно-окисленной формы — катиона нитрозония (NO<sup>+</sup>) [2–6]. Сейчас большинством исследователей предполагается, что эта форма появляется в живых организмах в присутствии кислорода, окисляющего NO до диоксида азота (NO<sub>2</sub>) с последующим его превращением в триоксид азота (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), представляющий собой аддукт диоксида и оксида азота. Реакция диспропорционирования этих компонентов аддукта собственно и приводит к появлению донора катионов нитрозония (NO + NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) — соединения, ха-

рактеризующегося сигналом ЭПР с резонансной структурой [5–7].

Вместе с тем были получены данные о том, что катионы нитрозония могут появляться в живых организмах и в отсутствие кислорода, т.е. без участия диоксида азота, в анаэробных условиях в ходе образования в живых организмах динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [8–10]. Есть основание предполагать, что включение NO в эти комплексы сопровождается трансформацией половины его молекул в катионы нитрозония в качестве нитрозильных лигандов в железо-динитрозильном фрагменте ДНКЖ, одна из резонансных структур которого описывается как Fe<sup>2+</sup>(NO)(NO<sup>+</sup>) [11–14].

В основе указанной трансформации лежит реакция диспропорционирования двух молекул NO (их взаимное одноэлектронное окисление-восстановление), чему способствует попарное связывание молекул NO с ионом Fe<sup>2+</sup> на начальной стадии образования ДНКЖ в присутствии анионных (L<sup>-</sup>) лигандов (схема 1) [13, 14].

Гидролиз аниона нитроксила, образующегося в результате диспропорционирования молекул NO в этих комплексах, приводит к образованию молекулы нитроксила (HNO), выходящей из лигандного окружения железа с последующими включением в освободившееся место третьей молекулы NO, завершающем синтез ДНКЖ — низкоспиновых (с S = 1/2) моноядерных комплексов

*Сокращения:* ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ — моноядерные динитрозильные комплексы железа, Б-ДНКЖ — биядерные динитрозильные комплексы железа, МНКЖ — мононитрозильные комплексы железа, СТС — сверхтонкая структура, GSH — глутатион, НАС — N-ацетил-L-цистеин, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, МГД — N-метил-D-глюкаминдитиокарбамат, МС — меркаптосукцинат, ТС — тиосульфат.

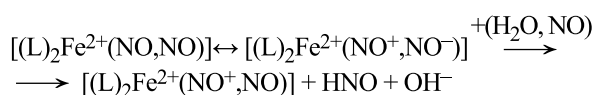


Схема 1. Предполагаемый механизм синтеза М-ДНКЖ.

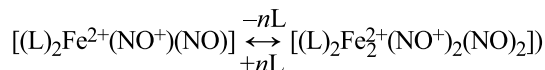


Схема 2. Равновесие между М- и Б-ДНКЖ.

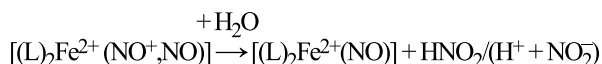


Схема 3. Возникновение мононитрозильных комплексов железа.

(М-ДНКЖ), одна из резонансных структур которых в соответствии со схемой 1 описывается как  $[(L)_2Fe^{2+}(NO^+)(NO)]$ . Вне зависимости от природы анионных лигандов все эти М-ДНКЖ характеризуются сигналами ЭПР с центром при  $g = 2.03$  и полушириной  $\sim 6-4$  мТл с двумя (рис. 1в, сигналы 1–5) или тремя различными значениями тензора  $g$ -фактора (рис. 1а, сигналы 2'–5') – показателями соответственно аксиальной или более низкой ромбической симметрии ДНКЖ (18, 15).

Согласно работе [19] резонансная структура  $[Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$ , описывающая состояние железо-динитрозильного фрагмента в М-ДНКЖ, также характерна для тех же фрагментов, включающихся в биядерную форму ДНКЖ (Б-ДНКЖ, формула  $[(L)_2Fe_2^{2+}(NO^+)_2(NO)_2]$ ). Эта форма в соответствии со схемой 2 возникает при недостатке анионных лигандов и обратимо в соответствии с химическим равновесием между Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ переходит в М-ДНКЖ [20].

Анионные лиганды включаются в Б-ДНКЖ в качестве мостиков, связывающих два железо-динитрозильных фрагмента, обеспечивая спаривание спинов этих фрагментов. В результате Б-ДНКЖ становятся диамагнитными и не дают сигнала ЭПР. Основной характеристикой этих комплексов являются спектры оптического поглощения с четко выраженными полосами на 310 и 360 нм [20].

Гидролиз катиона нитрозония в составе М-ДНКЖ (или Б-ДНКЖ) до азотистой кислоты (или анионов нитрита) с последующим их выходом из состава этих комплексов приводит к их превращению в мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ) с теми же анионными лиганда-

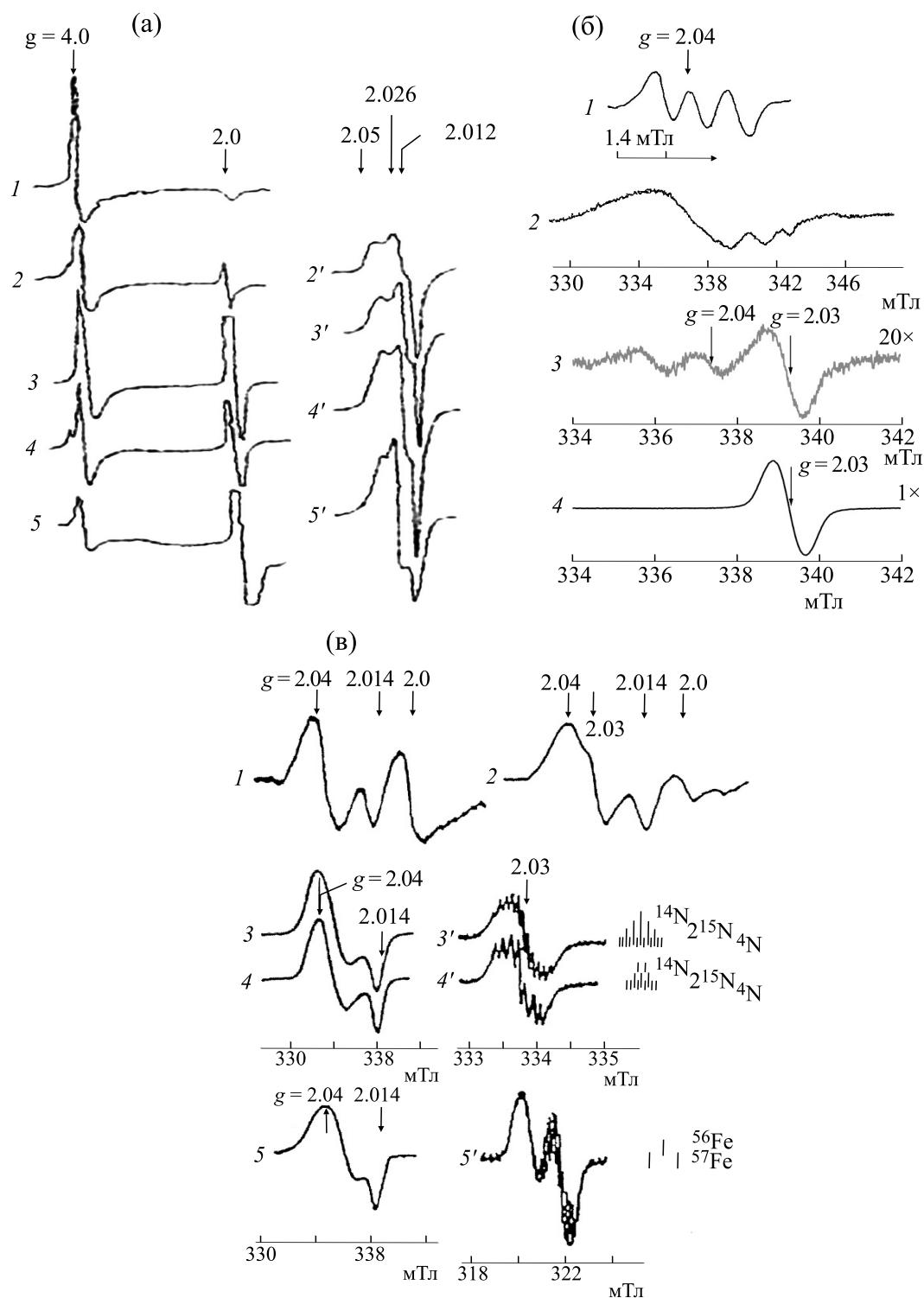
ми, характеризующимися в соответствии со схемой 3 резонансной структурой  $[(L)_2Fe^{2+}(NO)]$  [21].

В отличие от М-ДНКЖ, МНКЖ с анионными лигандами нетиоловой природы представляют собой высокоспиновые ( $S = 3/2$ ) комплексы, характеризующиеся существенно более широкими, чем сигналы 2.03, сигналами ЭПР с полушириной  $\sim 160$  мТл и тремя значениями  $g$ -фактора – 3.95, 4.00 и 2.00 (рис. 1а, спектры 1–5). В отсутствие тиолсодержащих лигандов эти комплексы, как правило, неустойчивы и при удалении газообразного NO из раствора быстро распадаются. Столь же быстро распадаются и исходные ДНКЖ с теми же лигандами, но уже не в результате высвобождения из них молекул NO, а, как уже было сказано, вследствие гидролиза катионов нитрозония, входящих наряду с молекулами NO в состав ДНКЖ [21].

Столь быстрый распад не характерен для М-ДНКЖ, включающих в себя анионные, ионизованные по тиоловым группам тиолсодержащие лиганды. В этих комплексах из-за высокой электронной  $\pi$ -донорной активности атомов тиоловой серы, передающих часть электронной плотности на катионы нитрозония, положительный заряд на этих лигандах снижается и тем самым предотвращается их связывание с анионами гидроксидов, т. е. гидролиз этих катионов. В результате резко повышается стабильность М-ДНКЖ, так что полностью подавляется их превращение в соответствующие МНКЖ [18, 19].

Последние, т. е. МНКЖ с тиол-содержащими лигандами возникают, но не в ходе распада соответствующих М-ДНКЖ, а на начальной стадии образования этих комплексов в реакции газообразного NO, тиолов и ионов двухвалентного железа, обычно при недостатке NO. Возникающие на этой стадии МНКЖ с тиолсодержащими лигандами [формула  $(RS)_2Fe^{2+}(NO)$ ] представляют собой низкоспиновые ( $S = 1/2$ ) комплексы, характеризующиеся сигналом ЭПР со слабо выраженной анизотропией  $g$ -фактора со средним его значением, равным 2.04 (рис. 1б, спектр 2). При регистрации этого сигнала при комнатной температуре регистрируется сигнал ЭПР с триплетной сверхтонкой структурой (СТС) с расщеплением  $\sim 1.2$  мТл, обусловленной взаимодействием неспаренного электрона с ядром азота NO-лиганда со спином  $I = 1$  (рис. 1б, спектры 1 и 3).

При последующей обработке МНКЖ с тиолсодержащими лигандами газообразным NO они превращаются в соответствующие М-ДНКЖ, характеризующиеся формулой  $[(RS)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$ . Эта формула, а именно наличие в комплексах двух нитрозильных и двух тиолсодержащих лигандов следует из анализа СТС сигнала ЭПР М-ДНКЖ с



**Рис. 1.** Сигналы ЭПР М-ДНКЖ и МНКЖ с различными анионными лигандами. (а) – Сигналы ЭПР высокоспиновых МНКЖ (спектры 1–5) и низкоспиновых М-ДНКЖ (спектры 2'–5') соответственно с ЭДТА (спектр 1), цитратом (спектры 2, 2'), аскорбатом (спектры 3, 3'), фосфатом (спектры 4, 4') и водой (спектры 5, 5') Запись при 77 К [15]. (б) – Сигналы ЭПР МНКЖ с цистеином, запись при 293 К (спектр 1) и 77 К (спектр 2) [16]; сумма ЭПР-сигналов МНКЖ и М-ДНКЖ с цистеином (спектр 3) и сигнал ЭПР М-ДНКЖ с цистеином (спектр 4); запись при 290 К [17]. (в) – Сигналы ЭПР эндогенных М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при  $g = 2.04$  и  $2.014$ , зарегистрированные при 290 К в печени кролика и дрожжевых клетках (спектры 1, 2); сигналы ЭПР М-ДНКЖ ( $^{14}\text{N}$ NO) с цистеином (спектры 3, 3'), М-ДНКЖ ( $^{15}\text{N}$ NO) с цистеином (спектры 4, 4') и М-ДНКЖ ( $^{57}\text{Fe}$ ) с цистеином (спектры 5, 5'), зарегистрированные при 77 К (спектры 1, 3–5) или 290 К (спектры 2, 3'–5'). Сигнал ЭПР при  $g = 2.0$  на спектрах 1 и 2 обусловлен эндогенными свободными радикалами [18].

цистеином, зарегистрированного при комнатной температуре (рис. 1в, спектры 3'–5'). Характерная для этого сигнала тринадцатикомпонентная СТС определяется взаимодействием неспаренного электрона с ядрами азота  $^{14}\text{N}$  двух нитрозильных лигандов, обеспечивающим появление квинтетной СТС, с дополнительным пятикратным сверхтонким расщеплением на четырех протонах (с  $I = 1/2$ ) метиленовых групп двух цистеиновых (RS-) лигандов. При замене в нитрозильных лигандах  $^{14}\text{N}$  на  $^{15}\text{N}$  ( $I = 1/2$ ) вместо тринадцатикомпонентной СТС регистрируется девятикомпонентная СТС (рис. 1в, спектры 3' и 4'). Замена в М-ДНКЖ обычного железа  $^{56}\text{Fe}$  на его изотоп  $^{57}\text{Fe}$ , характеризующийся наличием ядерного спина с  $I = 1/2$ , вызывает дублетное ( $\sim 1.2$  мТл) сверхтонкое расщепление сигнала, свидетельствующее о наличии в этих комплексах только одного атома железа (рис. 1в, спектр 5'). При регистрации сигнала ЭПР М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при низкой температуре (в замороженных растворах) форма сигнала определяется в основном анизотропией  $g$ -фактора ( $g_{\perp} = 2.04$ ,  $g_{\parallel} = 2.014$ ) (рис. 1в, спектры 3–5).

При контакте низкомолекулярных М- и Б-ДНКЖ с внутриклеточными белками железодинитрозильные  $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})]$ -фрагменты из этих комплексов переходят на тиоловые группы белков с образованием устойчивых М- и Б-ДНКЖ с белковыми тиолсодержащими лигандами, при этом сохраняется химическое равновесие между низкомолекулярными и белковыми ДНКЖ, как правило, резко сдвинутое в сторону белковых ДНКЖ. В отличие от низкомолекулярных М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, дающими при комнатной температуре узкие симметричные сигналы ЭПР с полушириной 0.7 мТл, белковые ДНКЖ характеризуются анизотропным сигналом ЭПР, совпадающим с сигналом ЭПР замороженных растворов М-ДНКЖ с низкомолекулярными тиолсодержащими лигандами. В качестве иллюстрации на рис. 2 приведены сигналы ЭПР М-ДНКЖ, связанные с сывороточным альбумином быка. Точно такой же анизотропный сигнал, обусловленный белок-связанными ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, обнаруженными в печени кролика и дрожжевых клетках [18], приведен на рис. 1в (спектры 1 и 2).

#### ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА КАК ДОНОРЫ КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ

Как следует из резонансной структуры  $[(\text{L})_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})]$ , характерной для М-ДНКЖ, химическое равновесие между этими комплексами и составляющими их компонентами можно представить в соответствии со схемой 4.

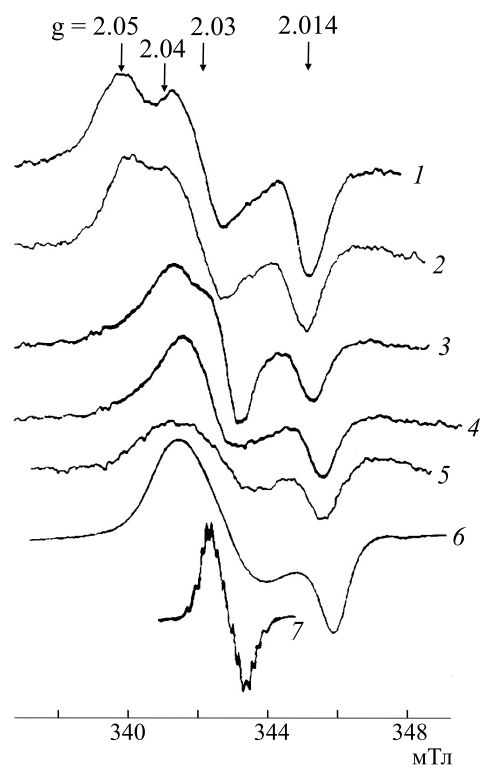
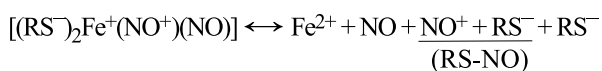


Рис. 2. Сигналы ЭПР растворов БСА, обработанных ДНКЖ с фосфатом (спектр 1); обработанных  $\text{Fe}^{2+} + \text{NO}$  (спектр 2); после добавления цистеина к препарату 1 (спектр 3); после вычитания сигнала ЭПР М-ДНКЖ с цистеином (спектр 7) из спектра 3 (спектр 4); после осаждения белка сульфатом аммония (спектр 5); спектры 6 и 7 – сигналы ЭПР М-ДНКЖ с цистеином. Спектры 1–5 и 7 – зарегистрированы при 290 К, спектр 6 – при 77 К [22].

Как указывалось выше, в отсутствие тиолсодержащих лигандов это равновесие неустойчиво из-за быстрого гидролиза катиона нитрозония, превращающегося при сохранении нейтральных значений pH в анион нитрита. Таким образом, инкубация ДНКЖ с анионными лигандами не-тиоловой природы должна приводить к накоплению в растворе анионов нитрита, а также, как уже говорилось выше, к накоплению соответствующих МНКЖ. При включении в М-ДНКЖ тиолсодержащих лигандов, характеризующихся существенно более высоким сродством к катионам нитрозония по сравнению с их сродством к анионам гидроксила [23], катионы нитрозония, высвобождающиеся из М-ДНКЖ, должны связы-



Схема 4. Химическое равновесие между М-ДНКЖ и составляющими их компонентами.



**Схема 5.** Химическое равновесие между М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и составляющими их компонентами.

ваться с тиолсодержащими лигандами с образованием соответствующих устойчивых S-нитрозотиолов (RS-NO) (схема 5). Тем самым должен предотвращаться гидролиз катионов нитрозония.

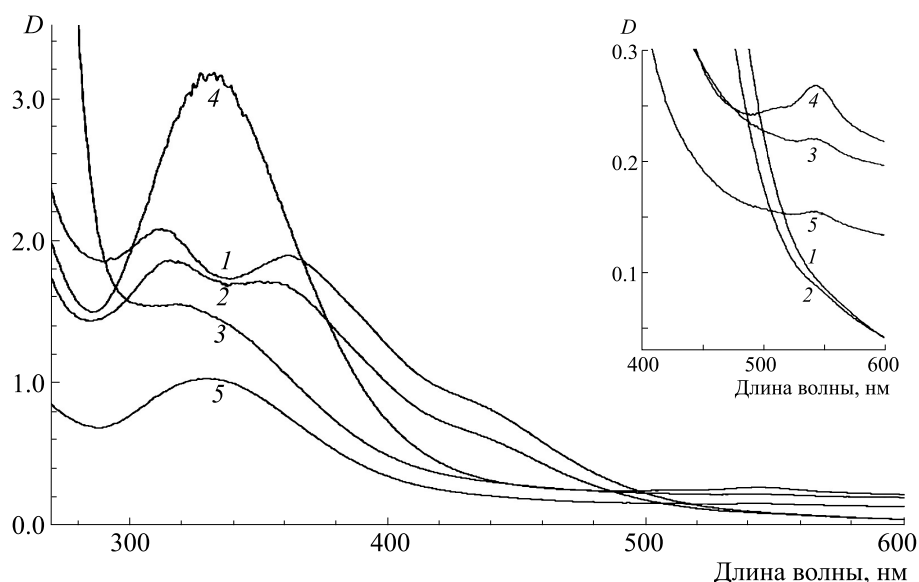
Таким образом, если схемы 4 и 5, а соответственно и определяющая их схема 1, верны, то опыты, которые продемонстрировали бы появление RS-NO при распаде М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, позволили бы утверждать, что приведенный на схеме 1 механизм образования этих комплексов абсолютно верен.

Такого рода опыты, результаты которых изложены в работах [13, 14, 24, 25], показали, что действительно при кислотном распаде представителей ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами — Б-ДНКЖ с глутатионом (GSH) и Б-ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином (NAC) — обнаруживаются S-нитрозоглутатион или S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеин, причем в количестве, соответствующем включению в эти соединения примерно половины нитрозильных лигандов. Это означает, что в полном соответствии со схемами 4 и 5 половина этих лигандов в Б-ДНКЖ-GSH представлена в форме катионов нитрозония.

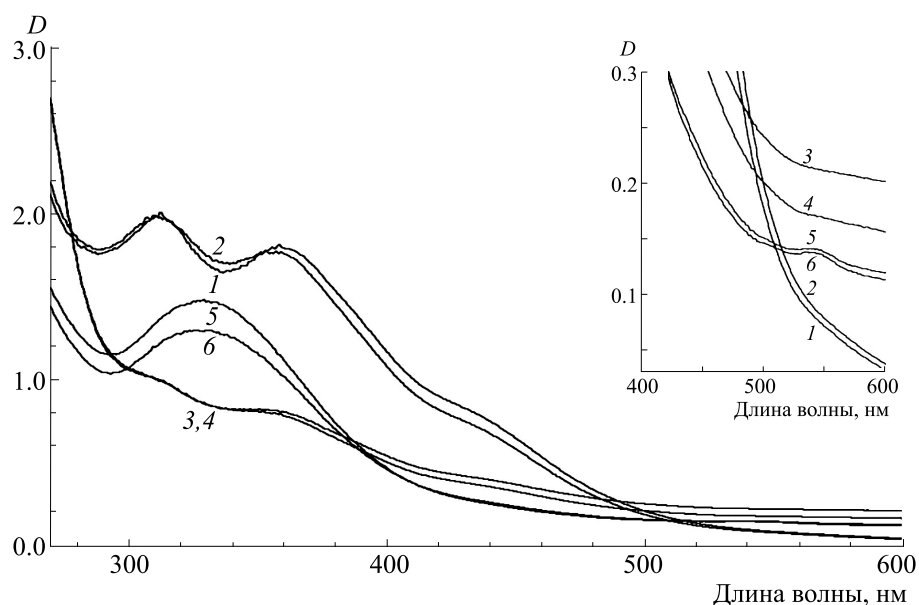
Результаты изучения такого рода кислотного распада Б-ДНКЖ-GSH/NAC представлены на рис. 5 и 6. Оказалось, что в отсутствие кислорода в 1.0 мМ растворах Б-ДНКЖ-GSH/NAC при понижении pH этого раствора до 1–2 с последующим прогревом раствора в течение 8–9 мин при 80°C оба Б-ДНКЖ распадались, что сопровождалось появлением нитрозоглутатиона или S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина, в которые включалась примерно половина нитрозильных лигандов комплексов. Такое соотношение количества S-нитрозотиолов и нитрозильных лигандов обнаруживалось при соотношении концентрации свободного (не включенного в Б-ДНКЖ/NAC) глутатиона или NAC и концентрации Б-ДНКЖ, равном 1.5 : 1.

Я подчеркиваю, что этот результат был получен в экспериментах на растворах Б-ДНКЖ-GSH/NAC в анаэробных условиях, исключавших окисление NO, высвобождавшегося из Б-ДНКЖ, до диоксида азота с последующим его превращением в триоксид азота, способным осуществлять реакцию S-нитрозирования.

При повышении этого соотношения Б-ДНКЖ и свободных тиолов в растворе до 2–3 и выше уровень соответствующих S-нитрозотиолов резко снижался. Есть основание предполагать, что это снижение было обусловлено восстановлением до NO катионов нитрозония высвобождающихся из Б-ДНКЖ — предположение, которое в работах [13, 14] подтверждается соответствующими экспериментами. Это восстановление, очевидно, осуществляется свободными тиолами при каталитическом действии ионов железа в растворе.



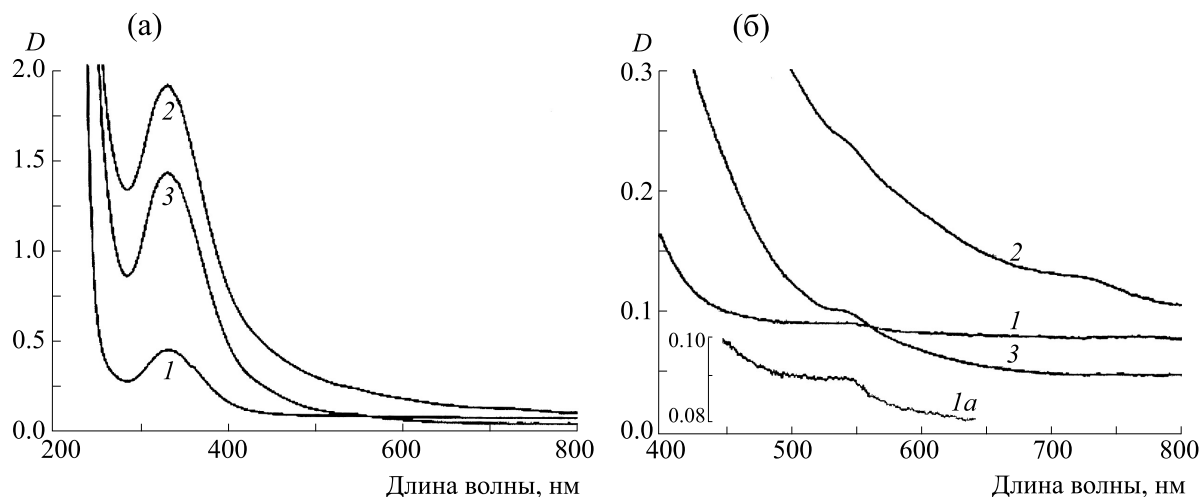
**Рис. 3.** Спектры поглощения 1 мМ растворов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношениях концентраций NAC и  $Fe^{2+}$ , равных 2 : 1 (кривая 1) или 1.5 : 1 (кривая 2). Кривые 3 и 4 — соответственно спектры поглощения тех же комплексов, подвергнутых нагреванию при 80°C в анаэробных условиях в течение 8–9 мин без разбавления [13, 14].



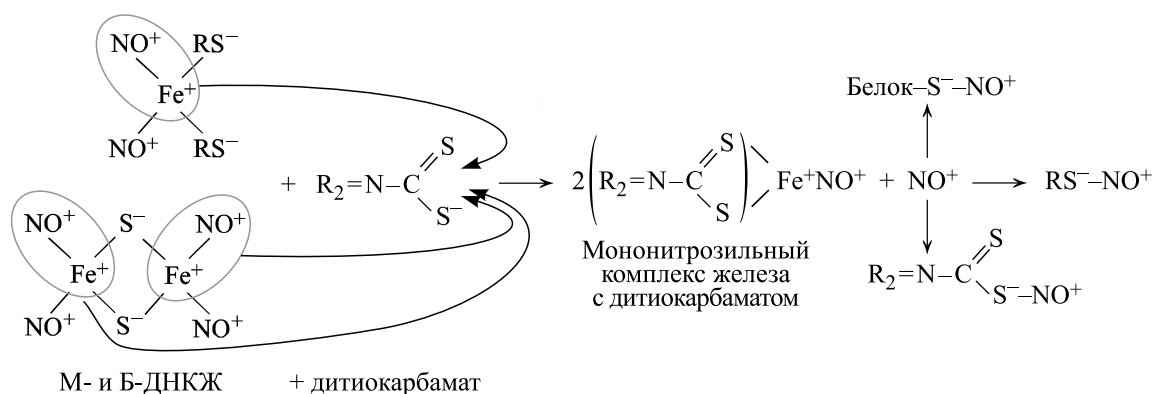
**Рис. 4.** Спектры поглощения растворов Б-ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином, синтезированных при соотношениях концентраций НАС и  $\text{Fe}^{2+}$ , равных 3 : 1 (кривая 1) или 1.5 : 1 (кривая 2). Кривые 3, 4 и 5, 6 – соответственно спектры поглощения тех же комплексов, разбавленных в два раза [13, 14].

Таким образом, эти результаты однозначно свидетельствуют о наличии в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами катионов нитрозония, высвобождение которых из этих комплексов обнаруживается по их включению в соответствующие S-нитрозотиолы. Иные факты, свидетельствующие об этом, приводятся в наших других работах [26–28].

Как следует из вышесказанного, распад ДНКЖ, не содержащих тиолсодержащих лигандов, должен приводить к накоплению при нейтральных значениях pH анионов нитрита как продуктов гидролиза катионов нитрозония. Это предположение полностью согласуется с результатами опытов, приведенных на рис. 6, на растворах М-ДНКЖ с молекулами воды, полученных



**Рис. 5.** Образование нитроглютамина как индикатора превращения оксида азота в анионы нитрита, появляющегося при распаде М-ДНКЖ с молекулами воды. Эти М-ДНКЖ были синтезированы обработкой газообразным NO 30 мМ растворов НЕРЕС-буфера (pH 7.0) с последующим добавлением к ним 20 мМ  $\text{Fe}^{2+}$  (кривые 2 и 3), затем с откачкой NO и добавлением к растворам 100 мМ глутатиона, резко подкислявшем растворы. Кривая 1 получена аналогичным образом, но при отсутствии  $\text{Fe}^{2+}$ , (а и б) – запись спектров при разных усилениях спектрофотометра [13, 14, 25].



**Рис. 6.** Механизм превращения Б- и М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с ДЭТК или МГД. Высвобождающиеся при этом катионы нитрозония могут S-нитрозилировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе ДЭТК или МГД [26–28].

при обработке газообразным NO 20 мМ растворах Fe<sup>2+</sup> в дистиллированной воде. Эти комплексы полностью распадались в течение 20–30 мин после откачки NO, о чем свидетельствовало исчезновение зеленой окраски раствора и образование выпадающих в осадок гидроокисных комплексов железа. Последующее добавление в этот раствор избытка глутатиона, приводившее к подкислению раствора до pH 1–2, сопровождалось появлением оптического поглощения раствора на 334 нм, характерного для нитрозоглутатиона. Образование последнего, очевидно, было обусловлено связыванием глутатиона с катионами нитрозония, возникавших в качестве компонентов азотистой кислоты, образующейся в результате гидролиза анионов нитрита.

#### КАТИОНЫ НИТРОЗОНИЯ – НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНЫЕ В ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ КОМПОНЕНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

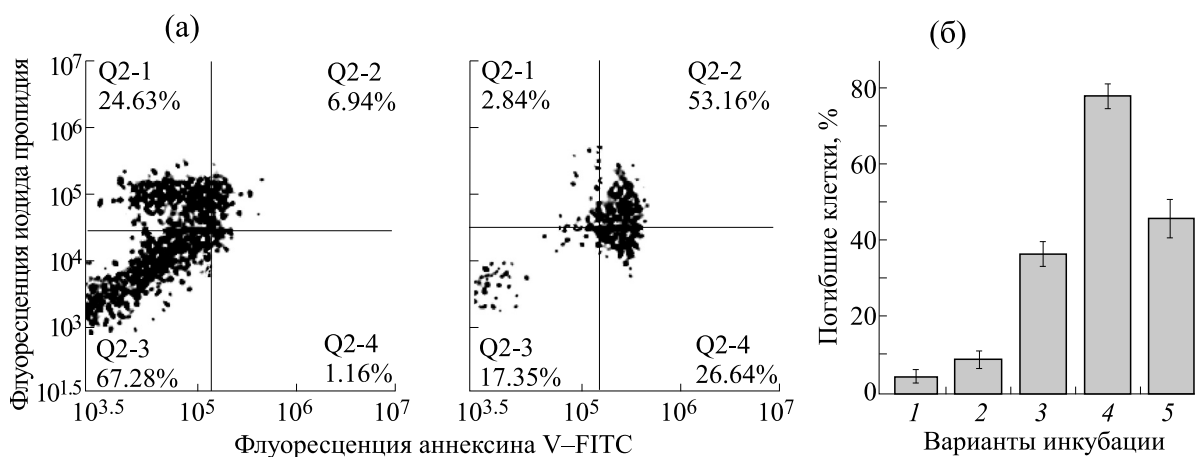
Как было нами показано, при обработке ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами производными дитиокарбамата – диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) или N-метил-D-глюкаминдитиокарбаматом (МГД) эти агенты перехватывают на себя железо-мононитрозильную [Fe<sup>2+</sup>-NO] группу из железо-динитрозильных [Fe<sup>2+</sup>(NO<sup>+</sup>)(NO)] фрагментов ДНКЖ с образованием сравнительно стойких (не оказывающих биологического действия на клетки и ткани) МНКЖ с ДЭТК или МГД, сопровождающимся, как показано на рис. 6, высвобождением в раствор катионов нитрозония [26–28].

Проведенные нами эксперименты на культуре опухолевых клеток MCF-7 [27] и бактериях *Escherichia coli* [28] показали, что МГД и ДЭТК резко

повышают цитотоксическое действие Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-МС) или Б-ДНКЖ-GSH соответственно на клетки MCF-7 или *E. coli* (рис. 7 и 8). Так, количество клеток MCF-7, подвергшихся апоптозу с последующим летальным исходом, при их контакте с 0.5 мМ М-ДНКЖ-МС возрастало в присутствии 1 мМ МГД с 8 до 80% (рис. 7).

Что же касается бактерий, их интактность, оцениваемая по колониеобразующей активности, снижалась с 50% при введении в культуру 2.5 мМ ДЭТК до 5–10% после добавления 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH (рис. 8, столбик 4) [28]. Это снижение, очевидно, было обусловлено высвобождением в культуральную среду только катионов нитрозония. Что касается других потенциально возможных цитотоксических компонентов ДНКЖ – молекул NO и ионов железа, – они оставались прочно связанными с МНКЖ-МГД или МНКЖ-ДЭТК, образующимися при разрушении Б-ДНКЖ-МС или Б-ДНКЖ-GSH соответственно под действием МГД или ДЭТК (рис. 6). Об устойчивости МНКЖ-МГД/ДЭТК свидетельствует тот факт, что они в концентрации 0.5–1.0 мМ не оказывали на клетки никакого цитотоксического действия.

Могли ли молекулы NO и ионы железа, входящие в состав ДНКЖ, оказывать цитотоксическое действие, сопоставимое с цитотоксической активностью катионов нитрозония – на этот вопрос ответ отрицательный. Как было показано в работе [29], оценка цитотоксического действия молекул NO и катионов нитрозония в экспериментах на культуре клеток фибробластов Swiss 3T3 показала, что величина 50%-го цитотоксического действия (IC<sub>50</sub>) для катионов составила 0.02 мМ против 1.0 мМ для молекул NO. Если же учесть, что в наших опытах на клетках MCF-7 при их обработке смесью Б-ДНКЖ-МС (0.5 мМ) + МГД (1.0 мМ) (рис. 7б) оба эти агента полностью тра-



**Рис. 7.** Гибель клеток MCF-7 при их обработке М-ДНКЖ-МС (0.5 мМ) и МГД (1.0 мМ) (по окрашиванию смеси «аннексин + йодид пропидия»). (а) – 2D-диаграммы, полученные методом флоуцитометрии клеточной культуры. Клетки инкубировали или только с Б-ДНКЖ-МС или со смесью Б-ДНКЖ-МС + МГД. (б) – Гибель клеток в процентном отношении: столбик 1 – контроль, столбик 2 – инкубация с Б-ДНКЖ-МС (0.5 мМ), столбик 3 – инкубация с МГД (1.0 мМ), столбик 4 – инкубация со смесью Б-ДНКЖ-МС+МГД, столбик 5 – сумма эффектов Б-ДНКЖ-МС и МГД (столбики 2 + 3) при отсутствии взаимодействия между ними [27].

тились на образование 0.5 мМ МНКЖ-МГД, то это означает, что гибель 80% клеток была обусловлена 0.5 мМ катионов нитрозония, высвободившихся из 0.5 мМ Б-ДНКЖ-МС.

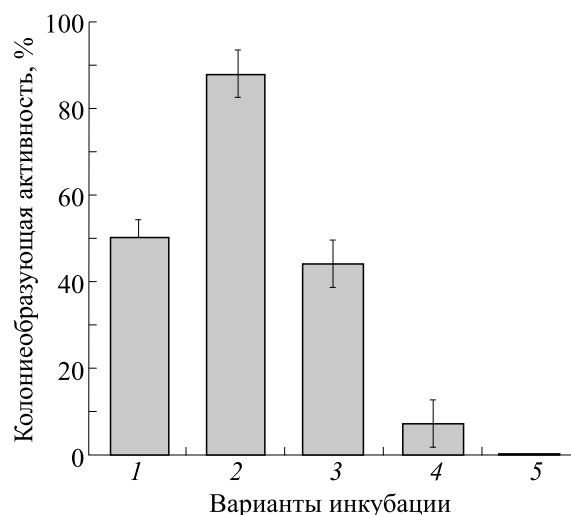
Что касается цитотоксического действия ионов железа при его высвобождении из ДНКЖ, то, как показали наши исследования такого действия на клетки MCF-7, величина  $IC_{50}$  для него составила 2.0 мМ против 0.86 мМ для Б-ДНКЖ-МС (материал готовится к публикации).

Таким образом, есть основание утверждать, что катионы нитрозония, высвобождающиеся из ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, следует рассматривать в качестве наиболее эффективных в цитотоксическом отношении компонентов этих комплексов. Эта активность может быть обусловлена способностью катионов вступать, во-первых, в качестве электрофильных агентов в реакции S- и N-нитрозирования, влияя тем самым на активность тиоловых и аминогрупп в разнообразных белках, а во-вторых, в качестве достаточно сильного окислителя влиять на различные внутриклеточные редокс-процессы [5, 30].

#### ДРУГИЕ ПРИМЕРЫ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ *in vitro* И *in vivo* КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ, ВЫСВОБОЖДАЮЩИХСЯ ИЗ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

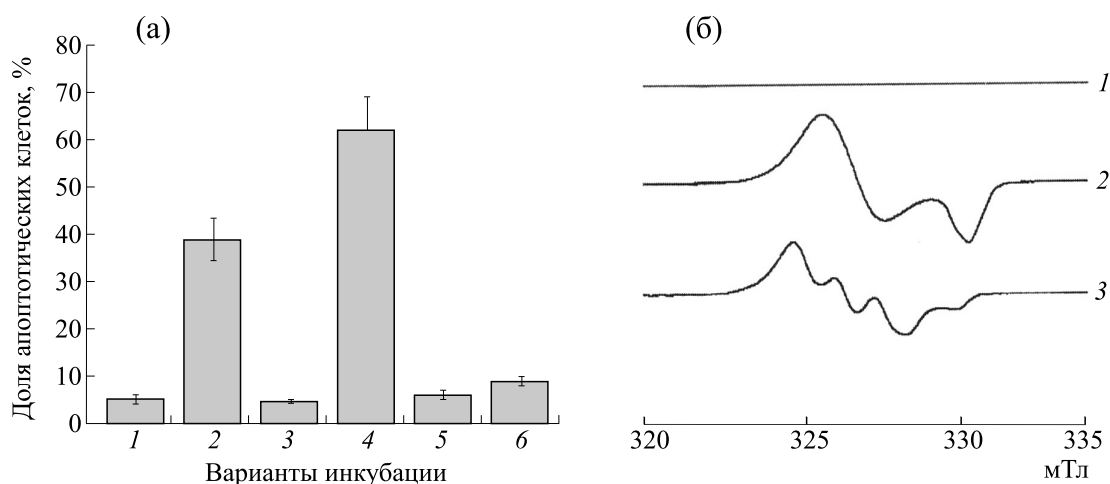
Группа российских и немецких исследователей из университета г. Майнца (Германия) была первой, кому в экспериментах на культуре опухолевых клеток Jurkat человека, инициирующих лейкемию, удалось продемонстрировать цито-

токсическое действие катионов нитрозония, высвобождавшихся из М-ДНКЖ с тиосульфатом (М-ДНКЖ-ТС) [31]. Как показано на рис. 9а, взятом из их работы, при одновременном введении в культуру клеток 0.1 мМ М-ДНКЖ-ТС и 0.2 мМ МГД количество клеток в состоянии апоптоза достигало 60%. Если же учесть, что все



**Рис. 8.** Влияние на колониобразующую активность бактерий *E. coli* TN530 добавления ДЭТК (2.5 мМ, столбик 1), В-ДНЖ-МС (0.5 мМ, столбик 2), суммарного действия ДЭТК и Б-ДНКЖ-МС при отсутствии взаимодействия между Б-ДНКЖ-МС и ДЭТК (столбик 3), при одновременном введении в культуру Б-ДНКЖ-МС и ДЭТК (столбик 4), при введении Б-ДНКЖ-МС, а через 40 мин – ДЭТК (столбик 5) [28].





**Рис. 9.** (а) – Доля (в %) клеток Jurkat в состоянии апоптоза в контроле (столбик 1), после обработки М-ДНКЖ-ТС (столбик 2), М-ДНКЖ+GSH (столбик 3), М-ДНКЖ-ТС + МГД (столбик 4), МГД (столбик 5) и Fe-ТС (столбик 6). (б) – трансформация сигнала ЭПР (сигнал 2), регистрируемого в культуре клеток Jurkat после добавления к ним 0.1 мМ М-ДНКЖ-ТС, в сигнал ЭПР МНКЖ-МГД (сигнал 3) при последующем добавлении к клеткам 0.2 мМ МГД. Сигнал 1 – исходная культура клеток [31].

М-ДНКЖ-ТС при двукратном количестве МГД переходили (как и МГД) в МНКЖ-МГД, 60%-й уровень апоптоза в клеточной культуре был обусловлен только катионами нитрозония, высвободившимися из 0.1 мМ М-ДНКЖ-ТС. ЭПР-измерения показали, что при этом М-ДНКЖ-ТС полностью трансформировались в МНКЖ-МГД (рис. 9б). Эта величина – 60%-й уровень апоптоза, вызванный 0.1 мМ катионов нитрозония, близок к величине  $IC_{50}$ , равной 0.02 мМ, полученной в упомянутой выше работе [29], характеризующей цитотоксическую активность  $NO^+$ .

В рассмотренных выше наших публикациях [27, 28] с использованием производных дитиокарбамата для высвобождения катионов нитрозония из ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами мы подчеркивали приоритет авторов работы [31] в таком подходе. Тем не менее, следует подчеркнуть, что эти авторы только показали, что катионы нитрозония могут участвовать в цитотоксическом действии ДНКЖ. Результаты нашего вышеприведенного анализа показывают, что катионы нитрозония могут выступать как наиболее эффективные в цитотоксическом отношении компоненты этих комплексов. Другими словами, в разнообразных проявлениях цитотоксического действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на клетки и ткани определяющим это действие является не  $NO$ , а  $NO^+$ -донорная активность этих комплексов.

В свете вышесказанного следует рассматривать и экспериментальные данные, демонстрирующие цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на злокачественные и

незлокачественные опухоли – соответственно перевивные злокачественные опухоли у животных [32–34] и эндометриоидные опухоли у животных при экспериментальном эндометриозе [35–37], полученные в наших работах. Исходя из того, что указанное действие могло быть обусловлено способностью ДНКЖ высвобождать катионы нитрозония, интересными представляются данные о способности ДЭТК самого по себе существенно замедлять развитие одной из перевивных злокачественных опухолей – карциномы легких Льюис. Оказалось, что ДЭТК при пятикратном через каждые трое суток после перевивки опухоли внутрибрюшинном введении в дозе 250 мкМ инициировал почти шестикратное подавление роста опухоли [34]. Не исключено, что этот эффект был обусловлен высвобождением катионов  $NO^+$  из эндогенных ДНКЖ, появляющихся в опухолях при их взаимодействии с активированными макрофагами., способными продуцировать такие комплексы.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. J. Ignarro, *Nitric Oxide: Biology and Pathology* (Academic Press, San Diego, USA, 2000).
2. S. A. Lipton, Y.-B. Choi, Z.-H. Pan, et al., *Nature* **364**, 626 (1993).
3. S. Khan, M. Kayahara, U. Joashi, et al., *J. Cell Sci.* **110**, 2315 (1997).
4. T. K. Watanabe, Y. Ishima, T. Akaike, et al., *FASEB J.* **27**, 391 (2013).
5. Г. И. Бородкин и В. Г. Шубин, *Успехи химии* **86**, 18 (2017).
6. M. N. Hugues, *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 263 (1999).
7. J. S. Stamler, D. J. Singel, and J. Loscalzo, *Science* **258**, 1898 (1992).
8. M. Boese, P. I. Mordvintcev, A. F. Vasnin, et al., *J. Biol. Chem.* **270**, 2924 (1995).
9. C. A. Bosworth, J. C. Toledo, J. W. Zmiewski, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4671 (2009).
10. M. F. Foster, L. Liu, M. Zhang, et al., *Biochemistry* **48**, 792 (2009).
11. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmaceut. Chem.* **5**, 1109 (2018).
12. A. F. Vanin, *Cell Biochem. Biophys.* **77**, 279 (2019).
13. А. Ф. Ванин, *Биофизика* **65**, 421 (2020).
14. A. F. Vanin, *Appl. Magnet. Res.* **51**, 851 (2020).
15. A. F. Vanin and D. I. Aliev, *Studia Biophysica* **93**, 63 (1983).
16. А. Ф. Ванин, *Биохимия* **60**, 225 (1995).
17. D. R. Truzzi, O. Augusto, and P. C. Ford, *Chem. Comm.* **55**, 9156 (2019).
18. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
19. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.* **14**, 878236 (2011).
20. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 136 (2011).
21. A. F. Vanin, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (19), 10356 (2021). DOI: 10.3390/ijms221910356
22. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2**, 224 (1998).
23. V. G. Kharitonov, A. R. Sandquist, and V. S. Sharma, *J. Biol. Chem.* **270**, 28158 (1995).
24. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmaceut. Chem.* **5**, 1109 (2018).
25. A. F. Vanin, *Cell Biochem. Biophys.* **77**, 279 (2019).
26. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **29**, 4 (2013).
27. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, *Cell Biochem. Biophys.* **79**, 93 (2021).
28. A. F. Vanin, D. I. Telegina, V. D. Mikoyan, et al., *Cell Biochem. Biophys.* (2022), in press.
29. S. Khan, M. Kayahara, U. Joashi, et al., *J. Cell Sci.* **111**, 2315 (1997).
30. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004).
31. A. L. Kleschyov, S. Strand, and S. Schmitt, *Free Rad. Biol. Med.* **40**, 1240 (2006).
32. А. Ф. Ванин, Л. Ф. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **65**, 1 (2020).
33. А. Ф. Ванин, Л. Ф. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **66**, 1223 (2021).
34. А. Ф. Ванин, Л. Ф. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **66**, 1217 (2021).
35. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, O. V. Paklina, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **741**, 37 (2014).
36. A. F. Vanin, E. N. Burgova, and L. V. Adamyan, *Austin J. Reprod. Med. Infertil.* **2**, 1019 (2015).
37. E. N. Burgova, Y. I. Khristidis, A. V. Kurkov, et al., *Cell Biochem. Biophys.* **77**, 69 (2019).

## Nitrosonium Cations as the Most Effective Cytotoxic Components of Dinitrosyl Iron Complexes

A.F. Vanin

*Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

This work sums up experimental data demonstrating the ability of dinitrosyl iron complexes to donate not only molecular nitric oxide (NO) but also nitrosonium cations ( $\text{NO}^+$ ). These cations are converted via hydrolysis at neutral (physiological) pH values to nitrite anions in the absence of thiol-containing compounds and to S-nitrosothiols in the presence of thiols. The formation of S-nitrosothiols is the very process that determines cytotoxic action of dinitrosyl iron complexes as  $\text{NO}^+$  donors in living organisms.

*Keywords: nitrosonium cations, dinitrosyl iron complexes, nitric oxide*