

УДК 577.3

## РОЛЬ КАТИОНА НИТРОЗОНИЯ В МЕХАНИЗМЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА ПРЕПАРАТОВ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

© 2022 г. А.Ф. Ванин\*, Л.А. Островская\*\*, Д.Б. Корман\*\*, Н.В. Блюхтерова\*\*, В.А. Рыкова\*\*, М.М. Фомина\*\*

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

\*\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия  
E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 26.07.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 05.08.2022 г.

С целью изучения механизма противоопухолевого действия динитрозильных комплексов железа, генерирующих как монооксид азота (NO), так и катионы нитрозония (NO<sup>+</sup>), проведено исследование влияния диэтилдитиокарбамата, «ловушки» молекул NO, на противоопухолевую активность биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом или N-ацетилцистеином. Установлено, что эффективность этих комплексов *in vivo* в отношении солидных опухолей мышей сохраняется на свойственном им уровне или даже повышается при совместном применении с диэтилдитиокарбаматом. Предполагается, что эффект ингибирования роста опухоли под влиянием биядерных динитрозильных комплексов железа обусловлен высвобождением из этих комплексов катионов нитрозония, а не молекул оксида азота.

*Ключевые слова:* монооксид азота, катионы нитрозония, динитрозильные комплексы железа, биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, биядерные динитрозильные комплексы железа с N-ацетилцистеином, диэтилдитиокарбамат натрия, противоопухолевая активность *in vivo*, солидные опухоли мышей.

DOI: 10.31857/S0006302922050179, EDN: JKBAWP

Исследованиями последних лет установлено, что нарушение физиологических процессов, регулируемых монооксидом азота NO, может рассматриваться в качестве фактора, вызывающего развитие ряда патологических состояний, в том числе опухолевых заболеваний [1–3].

Показано, что монооксид азота в зависимости от относительного уровня NO может либо стимулировать опухолевый рост, либо вызвать гибель клеток, в связи с чем этот радикал часто характеризуют как «обоюдоострый меч». Уровни NO ниже или выше оптимальных для развития опухоли значений могут активировать трансдукцию сигналов, ведущих к ингибированию опухолевого

роста и гибели клеток. Высокие концентрации NO способны также модулировать противоопухолевую иммунную защиту [1].

Ранее нами было обнаружено, что генерирующие оксид азота моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа с различными тиолсодержащими лигандами обладают способностью ингибировать развитие ряда солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол и аденокарцинома Са-755). Показан также определенный цитотоксический эффект некоторых динитрозильных комплексов железа в отношении клеток опухоли человека (культура MCF7) [4–11].

На основании анализа собственных экспериментальных и многочисленных литературных данных А.Ф. Ваниным был предложен механизм биологической активности динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), согласно которому эти комплексы способны выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO, так и катионов нитрозония NO<sup>+</sup>. При этом предполагается, что,

*Сокращения:* ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат натрия, Б-ДНКЖ-Г – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, МНКЖ-ДЭТК – мононитрозильные комплексы железа с диэтилдитиокарбаматом, Б-ДНКЖ-АЦЦ – биядерные динитрозильные комплексы железа с N-ацетилцистеином, в/в – внутривенно, в/б – внутривенно, п/к – подкожно.

противоопухолевое и цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами может определяться их способностью высвобождать при распаде как нейтральные молекулы NO, так и катионы нитрозония ( $\text{NO}^+$ ) [2].

С целью выяснения вопроса о том, какой из указанных компонентов ДНКЖ – молекулы оксида азота NO или катионы нитрозония  $\text{NO}^+$  – может оказывать решающее противоопухолевое действие были проведены целенаправленные эксперименты с использованием диэтилдитиокарбамата натрия (ДЭТК), являющегося «ловушкой» для молекул NO, в качестве инструмента исследования [12–14].

Было установлено, что ДЭТК при контакте с биядерным динитрозильным комплексом железа, содержащим глутатион (Б-ДНКЖ-Г), перехватывает на себя из железо-динитрозильной группы комплекса железо-моонитрозильный фрагмент с образованием устойчивых ЭПР-регистрируемых моонитрозильных комплексов железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК), которые практически не высвобождают нейтральные молекулы NO [13, 14].

При этом второй нитрозильный лиганд в железо-динитрозильной группе высвобождается в форме катиона нитрозония  $\text{NO}^+$ , связывающегося с тиолами различного происхождения с образованием соответствующих S-нитрозотиолов, что и может определять сохранение противоопухолевого и цитотоксического действия Б-ДНКЖ в присутствии ДЭТК [2, 12].

Именно таким путем было показано, что цитотоксическое действие Б-ДНКЖ-Г или Б-ДНКЖ с меркаптсукцинатом на опухолевые клетки MCF7 [13], а также цитотоксическое действие Б-ДНКЖ-Г на бактерии *Escherichia coli* [14] определяется способностью этих комплексов выступать в качестве доноров катиона нитрозония  $\text{NO}^+$ .

Использование вышеописанного подхода позволило также предположить, что и в условиях *in vivo* катионы нитрозония  $\text{NO}^+$  играют определяющую роль в реализации противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-Г [12].

В продолжение исследования механизма противоопухолевого действия динитрозильных комплексов железа в данной работе проведено изучение влияния различных режимов применения ДЭТК на противоопухолевую активность биядерного динитрозильного комплекса железа, содержащего разные лиганды – глутатион (Б-ДНКЖ-Г) и N-ацетил-цистеин (Б-ДНКЖ-АЦЦ), а также дана оценка противоопухолевого эффекта самого ДЭТК на моделях солидных опухолей мышей *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Препараты.** В экспериментах использовали сульфат железа ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, N-ацетилцистеин и нитрит натрия (Sigma, США).

Газообразный NO получали в реакции сульфата железа с нитритом натрия в 0.1 М растворе HCl с последующим разделением NO и примесного диоксида азота ( $\text{NO}_2$ ) методом низкотемпературной сублимации жидкой смеси этих газов в вакуумированной системе [15].

*Диэтилтиокарбамат натрия ДЭТК.* Применяли конвенционный препарат диэтилдитиокарбамата натрия ( $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N-CS}_2$ , Sigma, США).

*Биядерная форма ДНКЖ с глутатионом.* Синтез Б-ДНКЖ-Г проводили согласно описанному ранее «простейшему» методу синтеза ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [16]. В соответствии с этим методом синтез 5 мМ раствора ДНКЖ с глутатионом осуществляли следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на воздухе добавляли 62 мг глутатиона (20 мМ), вызвавшего подкисление раствора до pH 4.0, с последующим введением в него 28 мг (10 мМ) сульфата железа, приводившего к дальнейшему снижению pH до 3.8. После этого в раствор добавляли 6.9 мг (10 мМ) нитрита натрия, что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленному образованием S-нитрозоглутатиона. Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерного для S-нитрозоглутатиона, реакция заканчивалась через полтора часа с образованием 10 мМ этого соединения. После этого pH раствора повышали до 7.2, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся процессом образования Б-ДНКЖ-Г в растворе при участии S-нитрозоглутатиона,  $\text{Fe}^{2+}$  и глутатиона [16]. Для полного превращения S-нитрозоглутатиона в Б-ДНКЖ-Г требовалось несколько часов. Полученный раствор после удаления образовавшегося за это время осадка гидроокиси трехвалентного железа путем фильтрования через фильтровальную бумагу замораживали в жидком азоте и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Оценку полученного количества Б-ДНКЖ-Г (молекулярная масса 846 Да) проводили оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм, характеризующихся коэффициентами экстинкции, равными, соответственно, 4600 и 3700  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ [15]. Согласно этой оценке концентрация Б-ДНКЖ-Г в растворе составляла 5 мМ.

*Биядерная форма ДНКЖ с N-ацетилцистеином.* Синтез Б-ДНКЖ-АЦЦ проводили путем обработки газообразным NO (при давлении 150 мм рт. ст.) 1 мл раствора сульфата железа в дистиллированной

воде и ацетилцистеина в 15 мМ НЕРЕС-буфера (рН 7.4), помещенных соответственно в верхнюю и нижнюю части аппарата Тунберга, с последующим смешиванием этих растворов в присутствии NO, как было описано ранее [15]. Концентрация сульфата железа в этой смеси составляла 5 мМ. После пятиминутного встряхивания смеси, приводившей к включению всего двухвалентного железа в ДНКЖ-АЦЦ, NO удаляли из аппарата откачкой, раствор полученного Б-ДНКЖ-АЦЦ замораживали и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Концентрацию препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ оценивали по интенсивности полосы его оптического поглощения на 360 нм.

**Противоопухолевая активность *in vivo*.** Эксперименты проведены на 80 инбредных мышах линии BDF<sub>1</sub> – гибридах первого поколения f<sub>1</sub>(C<sub>57</sub>Bl/6 × DBA<sub>2</sub>) – и линии Balb/c, самках с массой тела 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России».

В качестве опухолевых тест-систем служили солидные опухоли мышей – карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол и аденокарцинома Са-755, перевиваемые подкожно в соответствии со стандартной методикой [17].

Препарат Б-ДНКЖ-Г вводили животным в водном растворе в суточной дозе 2 мкМ/кг внутривенно (в/в), внутрибрюшинно (в/б) или подкожно (п/к) на протяжении пяти-восьми суток после перевивки опухоли.

Препарат Б-ДНКЖ-АЦЦ вводили животным в виде водного раствора в суточной дозе 2 и 10 мкМ/кг п/к на протяжении девяти суток после перевивки опухоли.

В зависимости от условий эксперимента водные растворы ДЭТК вводили в суточных дозах 10 или 50 мг/кг в/б при комбинированном применении через 1 ч или 15 мин после введения Б-ДНКЖ-Г или Б-ДНКЖ-АЦЦ, либо в моно-ре-

жиме на протяжении пяти-десяти суток после перевивки опухоли.

Оценка противоопухолевой активности препаратов проведена при сопоставлении кинетики роста опухолей в группах контрольных и леченых животных. Показателем ростиингибирующего эффекта препарата служил коэффициент торможения роста опухоли  $TPO$  (%), который определяли из соотношения:  $TPO = (P_C - P_T)/P_C$  (%), где  $P_C$  и  $P_T$  – объем (или масса) опухоли в группах контрольных (С) и леченых (Т) животных соответственно. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как  $V = ab^2/2$ , где  $a$  – длина,  $b$  – ширина и высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли использовали величину плотности опухолевой ткани, равную 1 г/см<sup>3</sup> [17].

Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из шестидесяти мышей при восьми-десяти животных в контроле. Наблюдение за животными продолжали в течение всего периода развития опухоли, вплоть до гибели животных.

Статистическая обработка данных проведена путем оценки размеров опухолей (массы опухолей) у контрольных и леченых животных с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе представлены результаты, характеризующие противоопухолевую активность ДЭТК при индивидуальном применении, а также данные, полученные при совместном применении ДЭТК и динитрозильных производных железа, содержащих различные лиганды – Б-ДНКЖ-Г и

**Таблица 1.** Противоопухолевая активность ДЭТК при различных режимах введения на моделях солидных опухолей мышей

Штамм опухоли	Доза (мг/кг/сутки) и режим введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли мышей, г		ТРО, %
			леченые	контрольные	
Карцинома легких Льюис	50 мг/кг, в/б, пятикратно, 1, 4, 7, 10, 13 сутки	26	0.72 ± 0.2	3.00 ± 0.3	76
Карцинома легких Льюис	50 мг/кг, в/б, пятикратно, 1–5 сутки	21	0.78 ± 0.1	2.07 ± 0.2	62
Карцинома легких Льюис	50 мг/кг, в/б, восьмикратно, 1–4 и 7-10 сутки	28	3.1 ± 0.2	8.00 ± 0.3	61
Аденокарцинома Акатол	50 мг/кг, в/б, пятикратно, 1–5 сутки	23	3.4 ± 0.3	4.5 ± 0.3	24
Аденокарцинома Са-755	10 мг/кг, в/б, девятикратно, 1–9 сутки	21	7.51 ± 0.6	9.43 ± 0.6	20

Б-ДНКЖ-АЦЦ, на моделях солидных опухолей мышей.

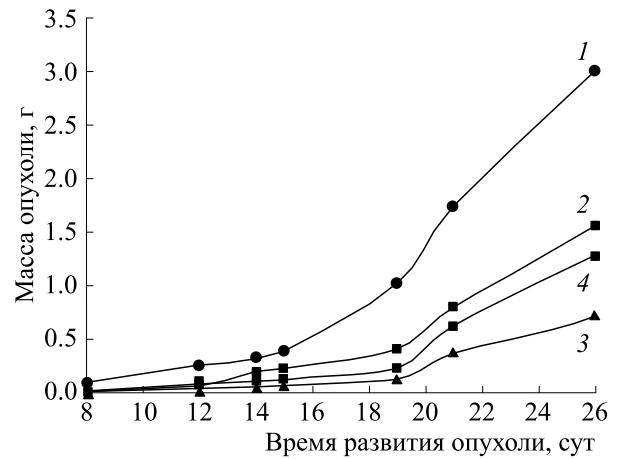
**Противоопухолевая активность диэтилдитиокарбамата.** Изучение противоопухолевого действия ДЭТК, примененного в моно-режиме, проведено в отношении трех солидных опухолей мышей – карциномы легких Льюис, аденокарциномы Акатол и аденокарциномы Са-755 при различных схемах применения препарата.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, ДЭТК проявляет противоопухолевую активность в отношении карциномы легких Льюис, вызывая ингибирование роста опухоли на 61–76% по сравнению с контролем. Очевидно, что эффективность ДЭТК при в/б введении в суточной дозе 50 мг/кг зависит от режима его применения. Наибольшее торможение роста опухоли (76%) отмечено при введении препарата интермиттирующим курсом пятикратно на первые, четвертые, седьмые, десятые и тринадцатые сутки. Применение ДЭТК пятикратно ежедневно с первых по пятые сутки, либо восьмикратно на первые-четвертые и седьмые-десятые сутки оказалось менее эффективным и приводило к торможению роста опухоли соответственно на 62 и 61% по сравнению с контролем (табл. 1).

Аденокарциномы Акатол и Са-755 малочувствительны к действию ДЭТК. Торможение роста этих опухолей под влиянием ДЭТК составляет 24 и 20% при в/б применении соответственно в дозах 50 мг/кг пятикратно и 10 мг/кг девятикратно (табл. 1).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов выявлена способность ДЭТК к ингибированию опухолевого роста (карцинома легких Льюис) в условиях *in vivo*.

**Противоопухолевая активность совместного применения Б-ДНКЖ-Г и диэтилдитиокарбамата на модели карциномы легких Льюис.** Влияние ДЭТК на противоопухолевую активность Б-ДНКЖ-Г изучено для различных режимов их сочетанного



**Рис. 1.** Влияние сочетанного пятикратного применения Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК с часовым интервалом на кинетику развития карциномы легких Льюис: 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, в/в; 3 – ДЭТК, 50 мг/кг (250 мкМ/кг), в/б; 4 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, в/в + ДЭТК, 50 мг/кг, в/б. Введение препаратов на первые, четвертые, седьмые, десятые и тринадцатые сутки после перевивки опухоли

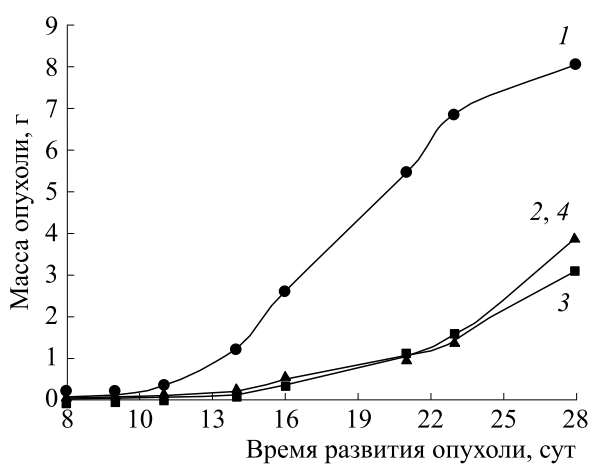
применения при сохранении постоянных суточных доз препаратов – 50 и 2 мкМ/кг соответственно. Исследовано влияние интервала между применением препаратов (1 ч либо 15 мин), а также пути введения Б-ДНКЖ-Г (в/в, в/б, п/к) на эффект воздействия ДЭТК, всегда вводимого в/б после инъекции животным динитрозильного комплекса железа.

*Введение Б-ДНКЖ-Г (в/в) и ДЭТК (в/б) с часовым интервалом, пятикратно.* Эффективность сочетанного и индивидуального применения препаратов при в/в пятикратном (на первые, четвертые, седьмые, десятые и тринадцатые сутки после перевивки опухоли) введении Б-ДНКЖ-Г характеризуют данные, представленные на рис. 1 и в табл. 2.

**Таблица 2.** Влияние сочетанного пятикратного применения Б-ДНКЖ-Г (в/в) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 1 ч на развитие карциномы легких Льюис

Препарат	Суточная доза и путь введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-Г	2 мкМ/кг в/в	26	1.55 ± 0.1	48
ДЭТК	50 мг/кг в/б	26	0.72 ± 0.2	76
Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК	2 мкМ/кг в/в + 50 мг/кг в/б	26	1.28 ± 0.3	57
Контроль	—	26	3.00 ± 0.3	—

Примечание. Препараты вводили на 1, 4, 7, 10, 13 сутки.



**Рис. 2.** Влияние совместного восьмикратного применения препаратов Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК с часовым интервалом на кинетику развития карциномы легких Льюис: 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, в/б; 3 – ДЭТК, 50 мг/кг, в/б; 4 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, в/б + ДЭТК, 50 мг/кг, в/б. Введение препаратов с первых по четвертые и с седьмых по десятые сутки после перевивки опухоли.

Как видно, Б-ДНКЖ-Г при в/в введении в суточной дозе 2 мкМ/кг вызывал 48%-е торможение роста опухоли, а ДЭТК, введенный в/б пятикратно в суточной дозе 50 мг/кг ингибировал рост опухоли на 76% по сравнению с контролем. Эффект совместного применения Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК (через час после введения Б-ДНКЖ-Г) соответствовал почти 57%-му ингибированию опухолевого роста по сравнению с контролем (рис. 1, табл. 2).

Таким образом, сочетанное применение ДЭТК и Б-ДНКЖ-Г (в/в) с часовым интервалом приводило лишь к незначительному повышению

противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-Г (с 50 до 60%). При этом введение одного ДЭТК оказалось наиболее эффективным (76%) по сравнению с влиянием других воздействий. Во всех этих случаях подавление роста опухоли наблюдалось в течение недели после окончания введения животным указанных агентов (тринадцатые сутки после перевивки опухоли), после чего начинался постепенный рост опухоли.

*Введение Б-ДНКЖ-Г (в/б) и ДЭТК (в/б) с часовым интервалом, восьмикратно.* Эффективность сочетанного и индивидуального применения Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК при в/б восьмикратном (с первых по четвертые и с седьмых по десятые сутки после перевивки опухоли) введении препаратов характеризуют данные, представленные на рис. 2 и в табл. 3.

Как видно из представленных данных, Б-ДНКЖ-Г как при индивидуальном в/б восьмикратном применении, так и при введении по той же схеме в комбинации с ДЭТК вызывает торможение развития опухоли на 52%. ДЭТК при применении в моно-режиме ингибирует рост опухоли на 62% по сравнению с контролем (рис. 2, табл. 3).

Таким образом, и в данной серии экспериментов при в/б введении Б-ДНКЖ-Г, также как и при в/в применении препарата, показано, что дополнительное введение ДЭТК не оказывает влияния на исходную противоопухолевую активность динитрозильного комплекса железа с глутатионом (табл. 2 и 3).

*Введение Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 15 мин, пятикратно.* Результаты изучения противоопухолевой эффективности сочетанного и индивидуального пятикратного применения препаратов при п/к введении Б-ДНКЖ-Г и в/б введении ДЭТК с интервалом в 15 мин ха-

**Таблица 3.** Влияние сочетанного в/б восьмикратного применения Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК с интервалом в 1 час на развитие карциномы легких Льюис

Препарат	Суточная доза и путь введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-Г	2 мкМ/ кг, в/б	28	3.8 ± 0.2	52
ДЭТК	50 мг/кг, в/б	28	3.1 ± 0.2	61
Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК	2 мкМ/ кг, в/б + 50 мг/кг, в/б	28	3.8 ± 0.3	52
Контроль	—	28	8.00 ± 0.3	—

Примечание. Препараты вводили с первых по четвертые и с седьмых по десятые сутки после перевивки опухоли.

рактируют данные, представленные на рис. 3 и в табл. 4.

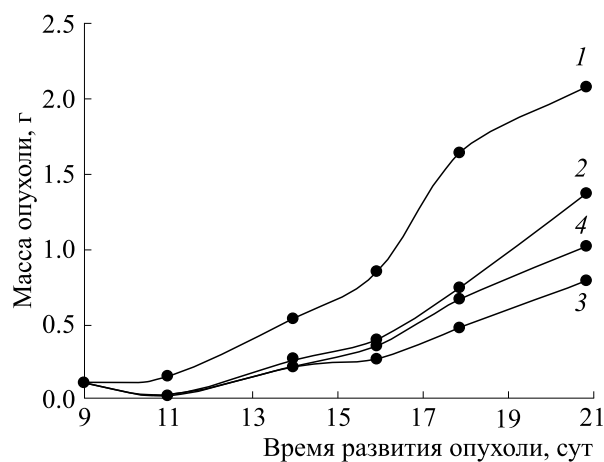
Б-ДНКЖ-Г при введении п/к оказывает, как и следовало ожидать, менее выраженное противоопухолевое действие, чем при введении в/в и в/б – торможение роста опухоли составляет соответственно 34, 48 и 52% по сравнению с контролем (табл. 2–4, рис. 1–3).

Применение ДЭТК через 15 мин после Б-ДНКЖ-Г приводит к повышению ингибирующей рост опухоли способности динитрозильного комплекса при п/к введении с 34 до 51% (рис. 3, табл. 4).

Очевидно, что в экспериментах как с введением в/в и в/б, так и с п/к введением Б-ДНКЖ-Г совместно с ДЭТК, являющимся «ловушкой» для молекул NO, обнаруживается сохранение и даже некоторое повышение (при в/в и п/к применении Б-ДНКЖ-Г) исходной противоопухолевой активности Б-ДНКЖ-Г. При этом наиболее заметное влияние ДЭТК на активность Б-ДНКЖ-Г показано при введении препаратов с интервалом в 15 мин (по сравнению с часовым перерывом между введениями).

Этот факт можно рассматривать как свидетельство того, что эффект ингибирования роста опухоли под влиянием Б-ДНКЖ-Г обусловлен, вероятно, главным образом образованием в физиологических условиях катионов нитрозония ( $\text{NO}^+$ ), а не присутствием молекул оксида азота (NO).

Косвенным подтверждением высказанного предположения могут служить данные, полученные в экспериментах на аденокарциноме Акатол по изучению влияния ДЭТК на противоопухолевую активность препарата полиакрилата золота



**Рис. 3.** Влияние совместного пятикратного применения препаратов Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 15 мин на кинетику развития карциномы легких Льюиса: 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, п/к; 3 – ДЭТК, 50 мг/кг, в/б; 4 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, п/к + ДЭТК, 50 мг/кг, в/б. Введение препаратов с первых по пятые сутки после перевивки опухоли.

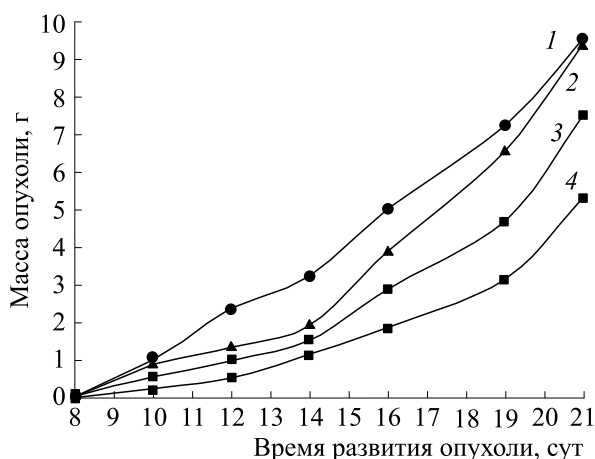
(аурумакрил), механизм действия которого не связан с генерацией монооксида азота и нитрозония. Было показано, что сочетанное применение этих препаратов в половинных дозах приводило к существенному снижению эффективности аурумакрила, примененного в полноценной терапевтической дозе в моно-режиме (неопубликованные данные).

**Противоопухолевая активность совместного применения Б-ДНКЖ-АЦЦ и дизилдитиокарбамата на модели аденокарциномы Са-755.** С целью

**Таблица 4.** Влияние сочетанного применения Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 15 мин на развитие карциномы легких Льюиса

Препарат	Суточная доза и путь введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-Г	2 мкМ/кг, п/к	21	1.36 ± 0.2	34
ДЭТК	50 мг/кг, в/б	21	0.78 ± 0.1	62
Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК	2 мкМ/кг, п/к + 50 мг/кг в/б	21	1.01 ± 0.1	51
Контроль	—	21	2.07 ± 0.2	—

Примечание. Препараты вводили с первых по пятые сутки после перевивки опухоли.



**Рис. 4.** Влияние сочетанного применения Б-ДНКЖ-АЦЦ (п/к) и ДЭТК (в/б) с часовым интервалом на кинетику развития аденокарциномы Са-755: 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-АЦЦ, 2 мкМ/кг, п/к; 3 – ДЭТК, 10 мг/кг (50 мкМ/кг), в/б; 4 – Б-ДНКЖ-АЦЦ, 2 мкМ/кг, п/к + ДЭТК, 10 мг/кг, в/б. Введение препаратов с первых по девятые сутки после перевивки опухоли

изучения влияния природы лиганда на чувствительность динитрозильного комплекса железа к действию ДЭТК проведено изучение противоопухолевой эффективности сочетанного применения этого препарата и биядерного динитрозильного комплекса железа, содержащего N-ацетилцистеин, на модели аденокарциномы Са-755.

Ранее нами было установлено, что Б-ДНКЖ-АЦЦ, примененный в/в либо в/б десятикратно в дозе 10 мкМ/кг, вызывает торможение роста аде-

нокарциномы Акатол на 60% по сравнению с контролем [11].

Отметим, что в серии опытов, представленных в настоящей статье, использован другой режим введения Б-ДНКЖ-АЦЦ, отличающийся от применявшегося в цитируемой работе [11]. Так, препарат вводился в дозе 2 мкМ/кг, п/к, а не в использовавшейся ранее дозе 10 мкМ/кг, вводившейся в/в или в/б.

ДЭТК вводился в дозе 10 мг/кг, в/б, также уменьшенной в пять раз по сравнению с применявшейся ранее дозой 50 мг/кг.

Полученные результаты представлены на рис. 4 и в табл. 5.

Представленные данные свидетельствуют о том, что, как и следовало ожидать, снижение в пять раз доз применяемых препаратов приводит к практически полному исчезновению их наблюдавшегося ранее противоопухолевого эффекта. Так, Б-ДНКЖ-АЦЦ, как уже отмечалось ранее, при применении в дозе 10 мкМ/кг, в/в либо в/б десятикратно, вызывал торможение роста опухоли на 60% по сравнению с контролем, а при введении п/к в дозе 2 мкМ/кг не оказывал противоопухолевого действия. Эффект ДЭТК, вызывавшего при применении в/б в дозе 50 мг/кг торможение роста опухоли (карцинома Льюис) на 61–76% по сравнению с контролем, снижается до 20% при в/б введении препарата в дозе 10 мг/кг.

Вместе с тем следует отметить, что при совместном применении этих препаратов в заведомо неэффективных малых дозах наблюдается досто-

**Таблица 5.** Влияние сочетанного применения Б-ДНКЖ-АЦЦ (п/к) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 1 ч на развитие аденокарциномы Са-755

Препарат	Доза и путь введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-АЦЦ	2 мкМ/кг, п/к	21	9.43 ± 0.8	0
ДЭТК	10 мг/кг, в/б	21	7.51 ± 0.6	20
Б-ДНКЖ-АЦЦ + ДЭТК	2 мкМ/кг, п/к + 10 мг/кг, в/б	21	5.34 ± 0.4	43
Контроль	—	21	9.43 ± 0.6	—

Примечание. Препараты вводили с первых по девятые сутки после перевивки опухоли.

верное торможение аденокарциномы Са-755 на 43% по сравнению с контролем (рис. 4, табл. 5).

Исходя из полученных данных можно предположить, что наблюдающийся эффект ингибирования роста опухоли при совместном применении даже весьма низких доз препаратов Б-ДНКЖ-АЦЦ и ДЭТК обусловлен присутствием катионов нитрозония ( $\text{NO}^+$ ) на фоне «дезактивации» под влиянием ДЭТК молекул  $\text{NO}$ , генерируемых Б-ДНКЖ-АЦЦ.

В заключение следует отметить, что проведенное исследование влияния ДЭТК на противоопухолевую активность биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих различные лиганды – Б-ДНКЖ-Г и Б-ДНКЖ-АЦЦ, показало, что эффективность этих препаратов сохраняется на свойственном им уровне или даже повышается при совместном применении с ДЭТК. При этом очевидно, что эффект взаимодействия ДЭТК с ДНКЖ существенным образом зависит от природы лиганда, содержащегося в динитрозильном комплексе, режима применения препарата и вида опухоли.

Можно полагать, что полученные в представленной работе данные подтверждают высказанное ранее предположение о том, что наблюдающийся эффект весьма вероятно обусловлен способностью ДЭТК разрушать в опухолях ДНКЖ с высвобождением из них катионов нитрозония ( $\text{NO}^+$ ), что и приводит к сохранению или даже некоторому усилению противоопухолевого действия препаратов при их совместном применении.

Есть основание предполагать, что изменение порядка введения животным Б-ДНКЖ и ДЭТК на обратный, т. е. вместо Б-ДНКЖ + ДЭТК вводить ДЭТК + Б-ДНКЖ, может существенно повысить противоопухолевую активность этих препаратов. Это предположение следует из результатов опытов, изложенных в цитированной ранее работе [2], касающихся образования МНКЖ-ДЭТК из ДНКЖ в тканях животных *in vivo* в зависимости от порядка введения животных ДНКЖ и ДЭТК. Из этих результатов следует, что эффективность высвобождения  $\text{NO}^+$  из ДНКЖ в организме животных должна повышаться при введении ДНКЖ после ДЭТК. Это предположение планируется проверить в ближайшее время.

#### 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.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и А. Ф. Ванин, Биофизика, **66**, 259 (2021). DOI: 10.31857/S000630292102006X
2. А. Ф. Ванин, Биохимия (2022), *в печати*.
3. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
4. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **59**, 508 (2014).
5. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **60**, 152 (2015).
6. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **60**, 1157 (2015).
7. A. F. Vanin, L. A. Ostrovskaya, and D. B. Korman, Austin J. Reprod. Medicine & Infertility, **2**, 1109 (2015).
8. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **62**, 591 (2017).
9. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **64**, №6, 1216 (2019).
10. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **65** (5), 1009 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920050191
11. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **66** (6), 1223 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921060193
12. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **66** (6), 1217 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921060181
13. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys., **79** (1), 93 (2021).
14. А. Ф. Ванин, Д. И. Телегина, В. Д. Микоян и др., Биофизика, **67**, 942 (2022).
15. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **23**, 136 (2010).
16. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **35**, 110 (2013).
17. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 642–657.



## Role of the Nitrosonium Cation in Mechanism Underlying Antitumor Effects of Drugs in Combination with Dinitrosyl Iron Complexes

A.F Vanin\*, L.A. Ostrovskaya\*\*, D.B. Korman\*\*, N.V. Bluhterova\*\*,  
V.A. Rykova\*\*, and M.M. Fomina\*\*

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

\*\*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

The aim of this study was to explore the mechanism of antitumor action of dinitrosyl iron complexes, which generate both nitrogen monoxide (NO) and nitrosonium cations (NO<sup>+</sup>). For this reason, the effect of diethyldithiocarbamate, used in spin trapping of NO radicals, on the antitumor activity of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione or N-acetyl cysteine, was studied. It was found that the effectiveness of these drugs in vivo against solid tumors of mice was kept as expected or even increased when these drugs were used in combination with diethyldithiocarbamate. It is assumed that the tumor growth inhibitory effect of dinitrosyl iron complexes is probably due mainly to the presence of nitrosonium cations, but not nitric oxide molecules released from these complexes.

*Keywords: nitrogen monoxide, nitrosonium cations, dinitrosyl iron complexes, binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione, binuclear dinitrosyl iron complexes with N-acetyl cysteine, diethyldithiocarbamate, antitumor activity in vivo, solid tumors of mice*