

ПОЗИТИВНОЕ (РЕГУЛЯТОРНОЕ) И НЕГАТИВНОЕ (ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ) ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Обзор

© 2022 А.Ф. Ванин

ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 11.05.2022

После доработки 05.07.2022

Принята к публикации 05.07.2022

Предложенный нами механизм образования динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), основополагающей стадией которого является диспропорционирование двух молекул NO, связанных с ионом Fe^{2+} , с последующей реализацией резонансной структуры железо-динитрозильного фрагмента ДНКЖ [$Fe^{2+}(NO)(NO^+)$], позволяет говорить об экспериментально подтверждаемой способности этих комплексов выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO, так и катионов нитрозония (NO^+). Приводимый в обзоре анализ биологической активности ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами показывает, что высвобождаемые из этих комплексов молекулы NO и катионы нитрозония преимущественно оказывают на живые организмы соответственно позитивное (регуляторное) или негативное (цитотоксическое) действие. Для усиления селективного высвобождения из ДНКЖ катионов нитрозония с одновременным включением высвобождающихся из этих комплексов молекул NO и ионов железа в биологически неактивные моонитрозильные комплексы железа с производными дитиокарбамата предлагается использовать эти производные для обеспечения распада ДНКЖ непосредственно в живых организмах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксид азота, катионы нитрозония, динитрозильные комплексы железа, тиолы.

DOI: 10.31857/S0320972522110173, **EDN:** LXEUYE

ВВЕДЕНИЕ. ФИЗИКО-ХИМИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА, ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ ИХ СПОСОБНОСТЬ ВЫСТУПАТЬ В КАЧЕСТВЕ ДОНОРОВ NO И NO^+

В настоящее время есть основание полагать, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами, функционирующие в живых организмах в качестве «рабочей формы» одного из универсальных регуляторов метаболических процессов – оксида азота (NO), могут оказывать на эти организмы как позитивное, регуляторное, так и негативное, цитотоксическое действие [1–5].

В задачу предлагаемого обзора входило показать, что лежит в основе этого столь разнонаправленного действия ДНКЖ на живые организмы.

ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, точнее моноядерная форма этих комплексов (М-ДНКЖ), была открыта в дрожжевых клетках и тканях животных в начале 1960-х гг. по характерному для этой формы анизотропному сигналу ЭПР со значениями g-фактора – $g_{\perp} = 2,04$; $g_{\parallel} = 2,014$; $g_{ср.} = 2,03$ – «сигналу 2,03» (рис. 1) [6–10].

Что касается природы центров, ответственных за этот сигнал, она была идентифицирована после того, как Ваниным [12] было

Принятые сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа; Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ – биядерная и моноядерная формы динитрозильных комплексов железа; ДЭТК – диэтилдитиокарбамат; ДТК – дитиокарбамат; MAP – среднее артериальное давление; МГД – N-метил-D,L-глукаминдитиокарбамат; МНКЖ – моонитрозильные комплексы железа; МС – меркаптосукцинат; ТС – тиосульфат; GSH – глутатион; GS-NO – S-нитрозоглутатион; NAC – N-ацетил-L-цистеин; NAC-NO – S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеин; NO^+ – катион нитрозония.

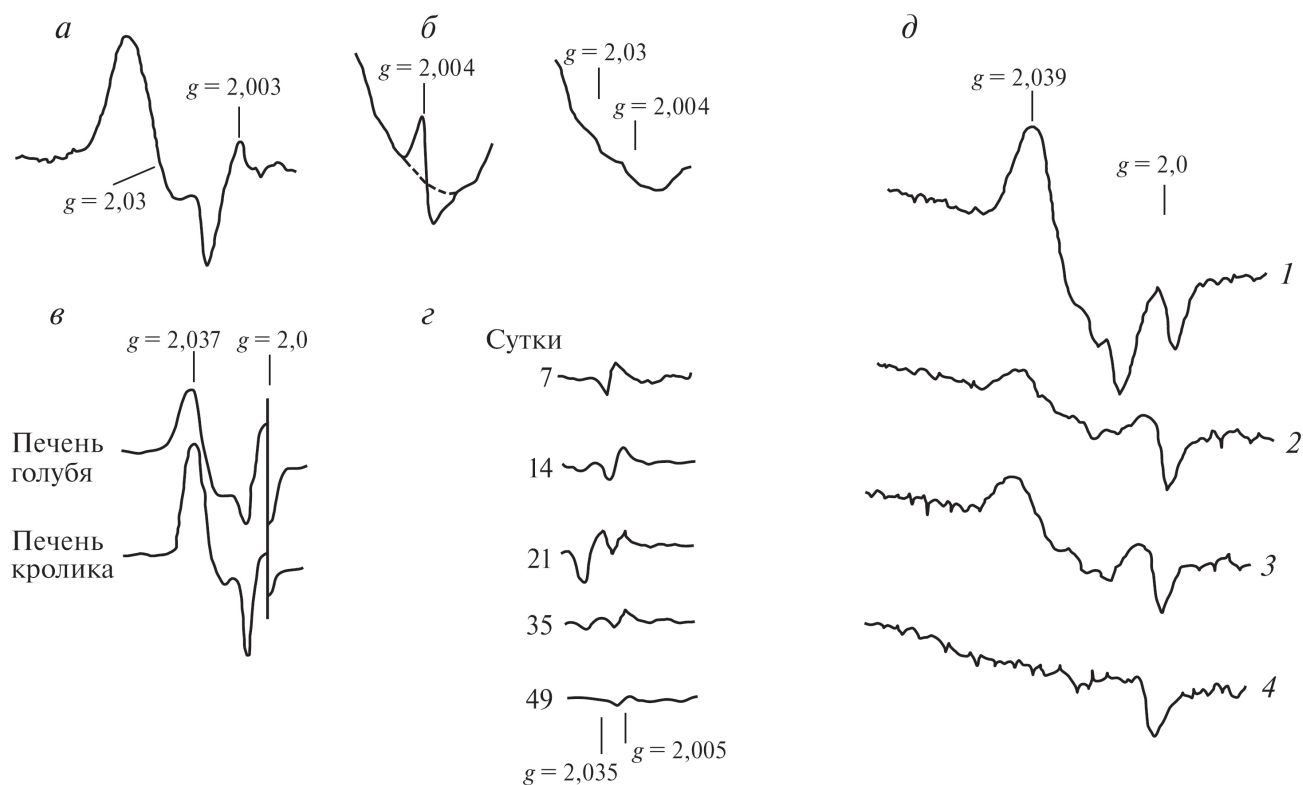


Рис. 1. Сигнал 2,03, впервые зарегистрированный в 1960-е гг.: *a* – в пекарских дрожжах [6, 7]; *б* – в химически индуцированной гепатоме [8]; *в* – в печени голубей и кроликов [9]; *з* – в печени крыс на 7–35 сутки после введения гепатоканцерогена в их диету [10]. *д* – Сигнал 2,03, зарегистрированный в 1990 г. в активированных макрофагах мышей в присутствии субстрата NO-синтазы L-аргинина (спектр 1), L-аргинина и ингибитора NO-синтазы N-метил-L-аргинина (NMLA) (спектр 2), при отсутствии L-аргинина и NMLA (спектр 3) или в присутствии только NMLA (спектр 4) [11]

обнаружено, что растворы М-ДНКЖ с низкомолекулярными тиол-содержащими лигандами, характеризующиеся в процессе регистрации при комнатной температуре узким симметричным сигналом ЭПР [13], при их замораживании дают анизотропный сигнал ЭПР, полностью совпадающий с сигналом 2,03 (рис. 2). Анализ разрешённой сверхтонкой структуры (СТС) сигнала ЭПР этих комплексов, зарегистрированного при комнатной температуре показал, что М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами включают в себя, наряду с одним атомом железа, по два нитрозильных и по два тиол-содержащих лиганда (формула – $[(RS^-)_2Fe(NO)_2]$), что полностью совпало с последующим рентгеноструктурным анализом этих комплексов в кристаллическом состоянии.

Уже в первой упомянутой выше публикации результатов ЭПР-исследований ДНКЖ с низкомолекулярными тиолами [13] было показано, что при снижении содержания тиолов в растворе при синтезе ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами М-ДНКЖ обратимо превращаются в биядерную форму этих комплексов – Б-ДНКЖ (формула – $[(RS^-)_2Fe_2(NO)_4]$). Эта форма, в отличие от М-ДНКЖ, диамагнитна из-за спаривания парамагнитных железо-динитрозильных

фрагментов Б-ДНКЖ при участии мостиковых атомов серы, связывающих эти фрагменты.

Другая деталь – в нашей уже цитированной выше работе [12] и далее в наших последующих публикациях [14–16] было показано, что ДНКЖ могут включать в себя в качестве лигандов не только низкомолекулярные тиолы, но также и тиоловые группы белков с образованием соответствующих белок-связанных ДНКЖ. Из-за низкой подвижности белковой компоненты растворов этих комплексов при комнатной температуре, недостаточной для усреднения анизотропии g-фактора, сигнал ЭПР этих комплексов, регистрируемый при комнатной температуре, характеризуется анизотропной формой, совпадающей с формой сигнала 2,03.

Ясно, что биологическая активность ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, оказывающими на живые организмы как позитивное, так и негативное действие, определяется свойствами электронной оболочки этих комплексов, описываемой различными, в зависимости от окружающей среды, резонансными структурами. Представление об этих структурах можно получить, исходя из механизма образования парамагнитной моноядерной формы этих комплексов – М-ДНКЖ.

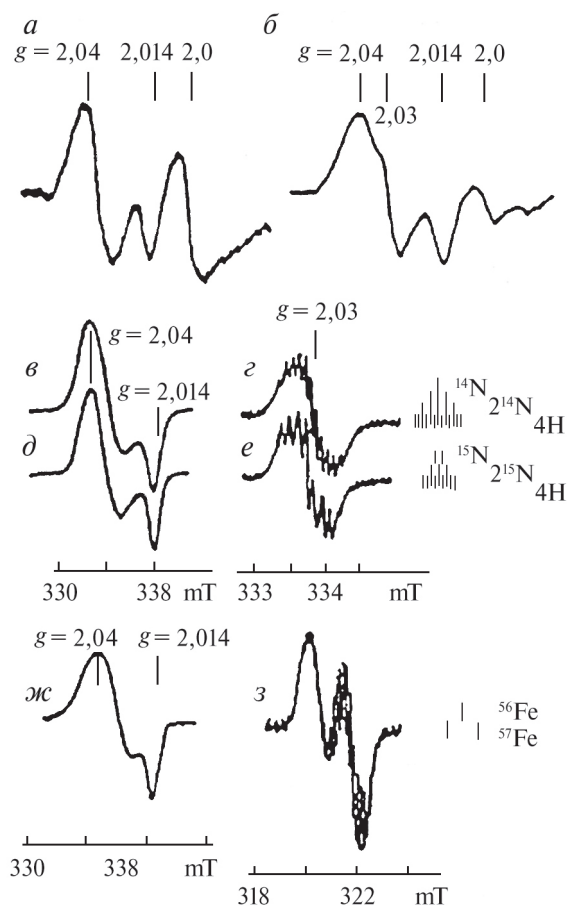


Рис. 2. Сигнал 2,03 ($g = 2,04; 2,014$), зарегистрированный во влажной печени кролика (*a*) и влажных дрожжах (*б*) [14]; ЭПР-спектры растворов ДНКЖ с цистеином, содержащие ^{14}NO (*в* и *з*), ^{15}NO (*д* и *е*) [15] или ^{57}Fe (*ж* и *з*) [16]. Запись произведена при комнатной температуре (*a*, *б*, *г*, *е* и *з*) или 77К (*в*, *д* и *ж*). *и* – Расшифровка СТС для сигнала 2,03 ДНКЖ с цистеином. Сигнал ЭПР при $g = 2,0$ (*a* и *б*) обусловлен эндогенными свободными радикалами

Как следует из упомянутой выше работы [13], ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами могут возникать при обработке газообразным NO водных растворов двухвалентного железа и тиолов. Поскольку в ходе этого синтеза молекулы NO попарно связываются с ионом Fe^{2+} , то возникающий железо-динитрозильный фрагмент будет содержать на верхних молекулярных орбиталях (МО)

чётное число (8) электронов (6 d-электронов от Fe^{2+} + 2 электрона от двух свободно-радикальных молекул NO), что в представлении Eneamark–Feltham [17] соответствует формуле железо-динитрозильного фрагмента – $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^8$. В этом случае при достаточном энергетическом разнесении верхних МО железо-динитрозильный фрагмент в ДНКЖ должен быть диамагнитным (ЭПР-неактивным), что не соответствует реальному низкоспиновому парамагнитному состоянию М-ДНКЖ с $S = 1/2$. Для устранения этого несоответствия к железо-динитрозильному фрагменту необходимо добавить или отнять один электрон, в результате электронная конфигурация в этом фрагменте должна смениться на парамагнитные конфигурации, описываемые в представлении Eneamark–Feltham соответственно как $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^9$ или $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^7$.

Наиболее естественным способом смены $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^8$ - на $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^7$ -конфигурацию при синтезе ДНКЖ представляется включение реакции диспропорционирования – приведённого на схеме 1 одноэлектронного взаимного окисления-восстановления свободнорадикальных молекул NO при участии d-электронной оболочки железа – назовём его «окислительным» механизмом образования ДНКЖ [18–22].

Гидролиз аниона нитроксила, образующегося в результате диспропорционирования молекул NO в этих комплексах, приводит к образованию молекулы нитроксила (HNO), выходящей из лигандного окружения железа с последующим включением в освободившееся место третьей молекулы NO, завершающей синтез низкоспиновых ($S = 1/2$) моноядерных комплексов (М-ДНКЖ), одна из резонансных структур которых, в соответствии со схемой 1, описывается как $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})]$.

Согласно Vanin et al. [16], резонансная структура $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}^+)]$, описывающая состояние железо-динитрозильного фрагмента в М-ДНКЖ, характерна также для тех же фрагментов, включающихся в биядерную форму ДНКЖ (формула – $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}_2(\text{NO}^+)_2(\text{NO})_2]$).

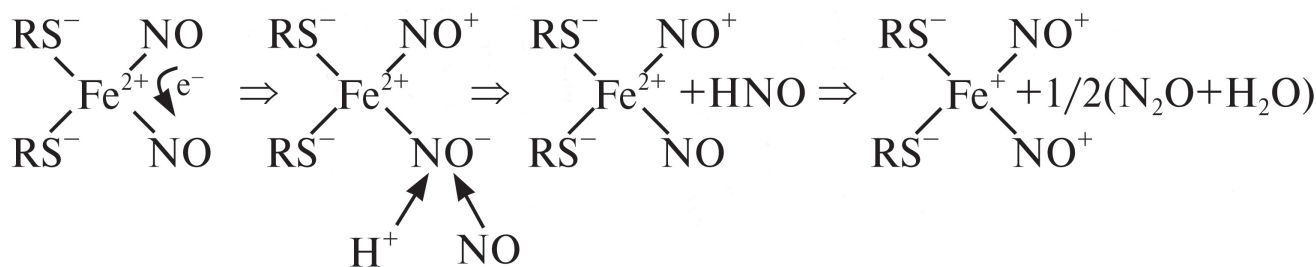


Схема 1. «Окислительный» механизм образования М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в реакции Fe^{2+} , NO и тиолов

В принципе, гидролизу (связыванию с анионом гидроксила) может подвергнуться и входящий в железо-динитрозильный фрагмент катион нитрозония (NO^+), превращающийся в ходе этой реакции в анион нитрита (при сохранении нейтральных значений pH). Однако такого превращения в ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами не происходит из-за наличия в этих комплексах атомов тиоловой серы. Высокая π -донорная электронная активность этих атомов, передающих часть электронной плотности на катионы нитрозония, обеспечивает снижение положительного заряда на этих лигандах, предотвращая тем самым их связывание с анионами гидроксила, т.е. гидролиз этих катионов. В результате резко повышается стабильность М-ДНКЖ и тем самым время их жизни в клетках и тканях [19]. Кроме того, обеспечивается возможность синтеза экзогенных стабильных ДНКЖ, которые можно использовать в опытах на различных живых организмах.

Возможен ли синтез низкоспиновых ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами (с $S = 1/2$) путём одноэлектронного восстановления железо-

динитрозильного фрагмента с исходной $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^8$ -конфигурацией, о котором упоминалось выше? О такой возможности, исходя из полученных экспериментальных данных, пишут Truzzi et al. [23]. В соответствии с предложенной ими схемой образования ДНКЖ (схема 2), вначале возникает мононитрозильный комплекс железа, включающий в себя два тиол-содержащих лиганда, с конфигурацией железо-мононитрозильного фрагмента $[\text{Fe}(\text{NO})]^7$, а затем происходит одноэлектронное восстановление этого фрагмента входящим в него тиол-содержащим лигандом с последующим его замещением молекулой NO и включением в комплекс другого тиола – назовём это «восстановительным» механизмом образования ДНКЖ.

В результате этого «восстановительного» механизма возникает М-ДНКЖ с $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^9$ -конфигурацией железо-динитрозильных фрагментов, описываемый резонансной структурой $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO})_2]$.

Главным аргументом против этой схемы является то, что, исходя из неё, невозмож-

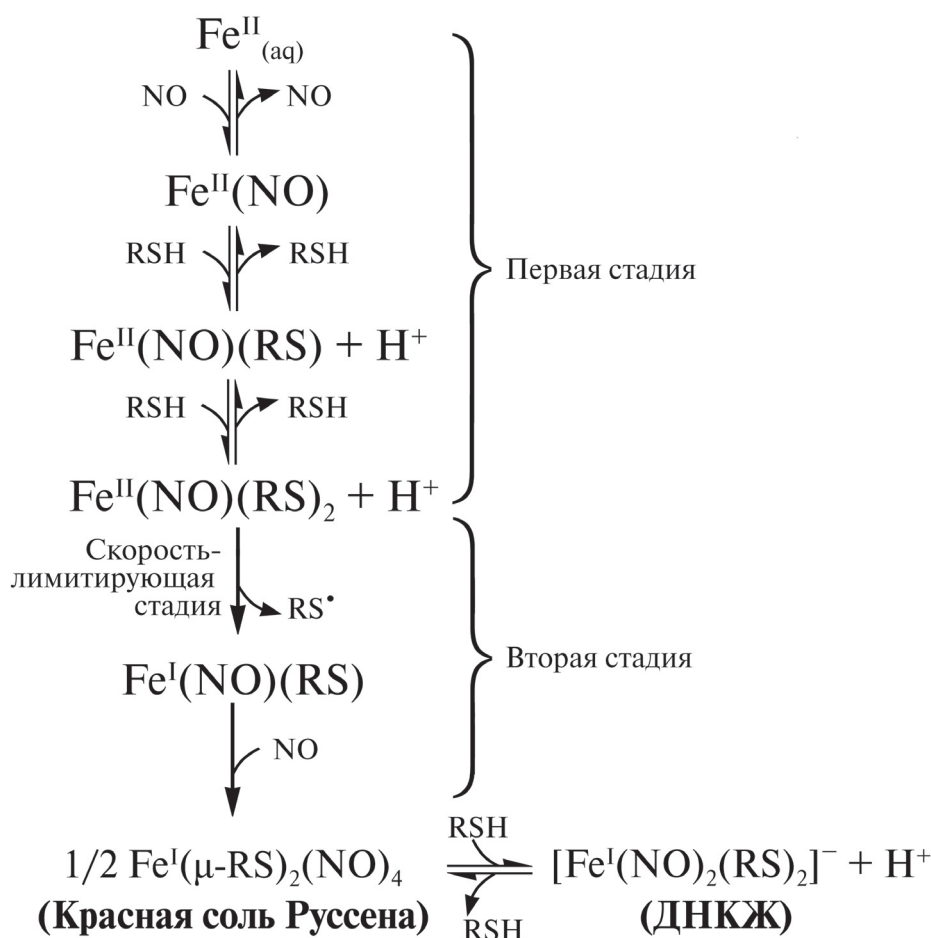


Схема 2. «Восстановительный» механизм образования ДНКЖ в водном растворе, предложенный Truzzi et al. [23]. RSE – тиоэфир красной соли Руссина (Roussine Red Salt thioester)

но объяснить образование М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы – с фосфатом, цитратом, сукцинатом, наконец, с водой, характеризующихся, как и М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, низкоспиновым состоянием с $S = 1/2$ и сигналами ЭПР, хотя и отличающимися по форме от сигнала 2,03, но с тем же средним значением g -фактора и примерно теми же главными значениями этого тензора [12, 13]. Очевидно, вряд ли можно утверждать, что перечисленные нетиоловые лиганды способны, как их тиол-содержащие аналоги, восстанавливать железо-мононитрозильный фрагмент с $[\text{Fe}(\text{NO})]^{7-}$ -конфигурацией до $[\text{Fe}(\text{NO})]^{8-}$ с последующим её превращением в конфигурацию $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^{9-}$ с $S = 1/2$. Что касается механизма образования М-ДНКЖ, основой которого является реакция диспропорционирования молекул NO , для этого механизма не имеет значения, способны ли анионные лиганды или нет выступать в качестве восстановителей.

Резонансная структура железо-динитрозильных фрагментов – $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})]$ в М- и Б-ДНКЖ, которая следует из механизма, учитывающего диспропорционирование молекул NO при образовании этих комплексов, даёт

основание говорить об их способности выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO , так и катионов нитрозония, причём в соответствии со схемой их равновесного распада (схема 3) – в равном соотношении [18–22].

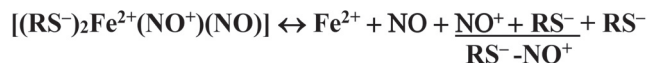


Схема 3. Химическое равновесие между М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, синтезированным по «окислительному» механизму, и составляющими М-ДНКЖ компонентами

В присутствии тиолов катионы нитрозония включаются в S -нитрозотиолы ($\text{RS}-\text{NO}$), при удалении тиолов катионы нитрозония гидролизуются в анионы нитрита.

Иная ситуация, очевидно, реализуется при равновесном распаде М- и Б-ДНКЖ при $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^{9-}$ -конфигурации железо-динитрозильных фрагментов (схема 4).



Схема 4. Химическое равновесие между М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, синтезированным по «восстановительному» механизму, и составляющими М-ДНКЖ компонентами

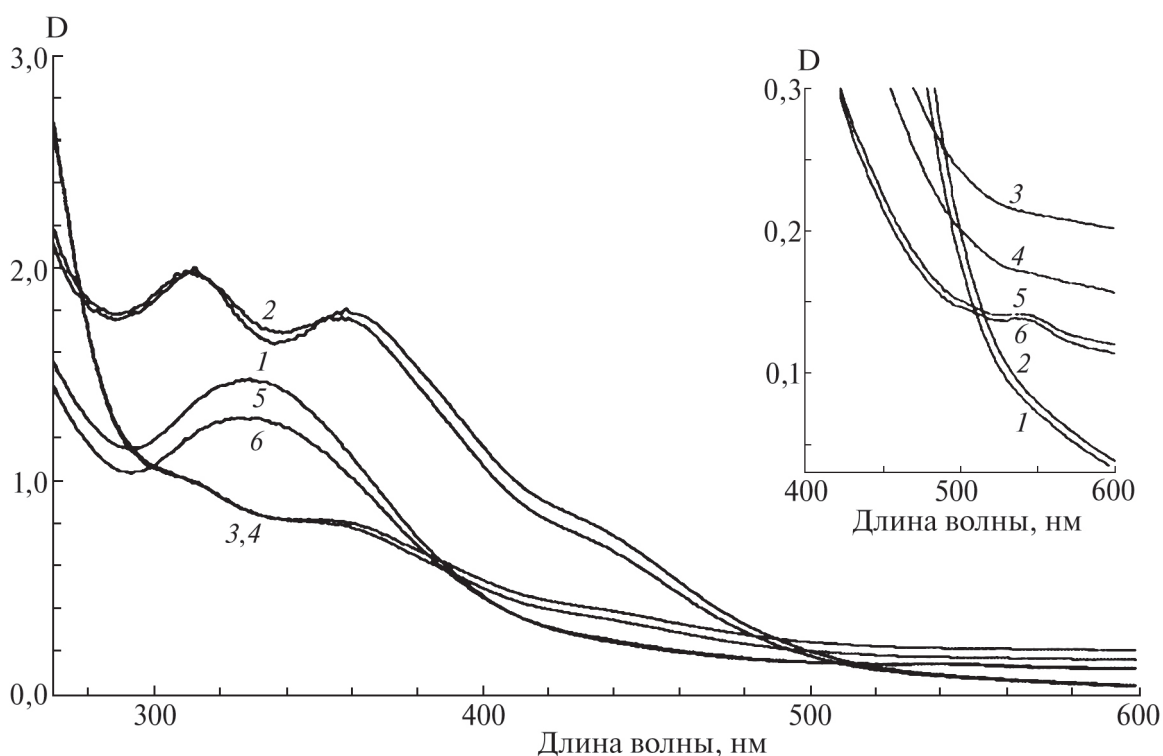


Рис. 3. Спектры поглощения 0,5 мМ растворов Б-ДНКЖ-НАС, содержащих 2,0 и 0,5 мМ НАС, не включённого в комплексы (соответственно кривые 1 и 2). Кривые 3–6 – спектры поглощения 2,0 мМ растворов тех же комплексов, содержащих 8,0 мМ (кривые 3 и 4) или 2,0 мМ НАС (кривые 5 и 6), не включённых в эти комплексы, подвергнутых нагреванию при 80 °С в анаэробных условиях в течение 7–9 мин. Спектры 5 и 6 с полосами на 334 и 543 нм (на вставке) обусловлены образующимися НАС-NO. Коэффициенты экстинкции Б-ДНКЖ и НАС-NO для полос поглощения 360 и 334 нм – соответственно 3700 (в пересчёте на один атом железа в Б-ДНКЖ) и 0,94 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [22]

В этом случае нитрозильные лиганды высвобождаются в форме нейтральных молекул NO и анионов нитроксила, но только не в форме катионов нитрозония. Последнему, как это следует из схемы 4, препятствует локализация на железо-динитрозильных фрагментах высокой электронной плотности, определяемой в соответствии с представлением Eneemark–Feltham [17] формулой $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^9$. В связи с этим можно было предполагать, что если бы удалось экспериментально показать, что М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, так же как и их биядерные аналоги, способны при распаде высвобождают как молекулы NO, так катионы нитрозония, этот факт мог бы однозначно свидетельствовать в пользу $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^7$ -конфигурации железо-динитрозильных фрагментов в этих комплексах. Другими словами, можно было бы говорить о реализации при их синтезе механизма диспропорционирования молекул NO, попарно связывающихся с ионами двухвалентного железа с последующими процессами, показанными на схемах 1 и 3.

Такого рода исследования [20–22] полностью подтвердили это предположение. Оказалось, что при прогреве при 80 °С биядерной формы ДНКЖ с глутатионом (GSH) или N-ацетил-L-цистеином (NAC) в сильноокислых растворах (при pH 1–2) вне зависимости от наличия или отсутствия воздуха в системе происходил, судя по исчезновению спектра поглощения этих комплексов, полный их распад с появлением полос поглощения, характерных

для S-нитрозированных форм GSH и NAC (GS-NO и NAC-NO), как это продемонстрировано на рис. 3 для Б-ДНКЖ-NAC [22].

Как следует из рис. 3, при минимальном соотношении концентрации Б-ДНКЖ-NAC и невключённого в комплексы (свободного) NAC (1 : 1) прогрев их раствора в анаэробных условиях приводил к образованию NAC-NO в концентрации, соответствующей включению в NAC-NO в форме NO^+ половины (в соответствии со схемой 3) нитрозильных лигандов Б-ДНКЖ (рис. 3, кривые 5 и 6, полученные в двух независимых опытах). Таким образом, этот результат показал, что при распаде ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами из них действительно могут высвобождаться катионы нитрозония, что является, по мнению автора обзора, однозначным доказательством реальности предложенного механизма образования этих комплексов, основой которого предполагается реакция диспропорционирования молекул NO (схема 1).

При более высокой концентрации свободного NAC (при соотношении NAC : Б-ДНКЖ-NAC, равном 4 : 1) образования NAC-NO в этих опытах не обнаруживалось (рис. 3, кривые 3 и 4, полученные в двух независимых опытах). По-видимому, при избытке этого тиола он мог инициировать восстановление NO^+ до NO. Возможный механизм такого восстановления будет рассмотрен в заключительной части обзора.

Как следует из схемы 3, наряду с высвобождением из распадающихся ДНКЖ катионов нитрозония, эти комплексы спо-

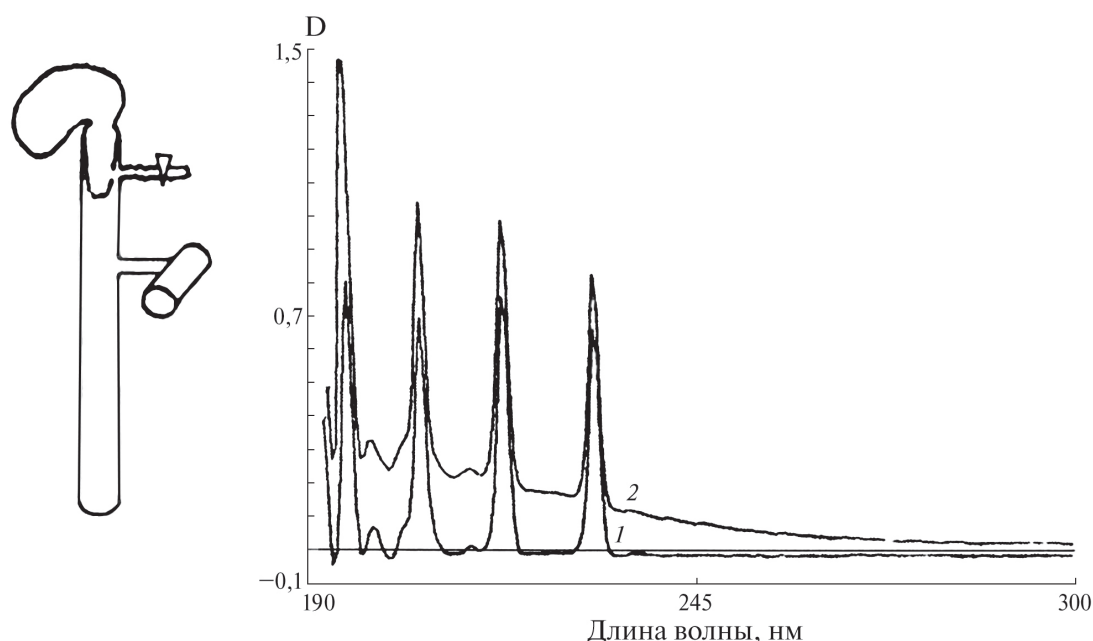


Рис. 4. Слева – схема модифицированного аппарата Тунберга, использованного для измерения оптического поглощения NO и NO₂ в газовой фазе. Справа – спектр оптического поглощения NO (четыре эквидистантных узких полосы, кривая 1) и суммарное оптическое поглощение газовой смеси NO и NO₂ (кривая 2)

собны выступать не менее эффективно и в качестве доноров молекул NO. Высвобождение последних из ДНКЖ было продемонстрировано Borodulin et al. [24] с помощью разработанного метода регистрации газообразного NO по характерному спектру поглощения в УФ-области – четырёх узким эквидистантным полосам поглощения в диапазоне 220–190 нм (рис. 4, справа). Эти полосы регистрировались при пропускании луча света в спектрофотометре вдоль оси цилиндрической кюветы, наполненной газообразными NO или NO₂ (рис. 4, слева).

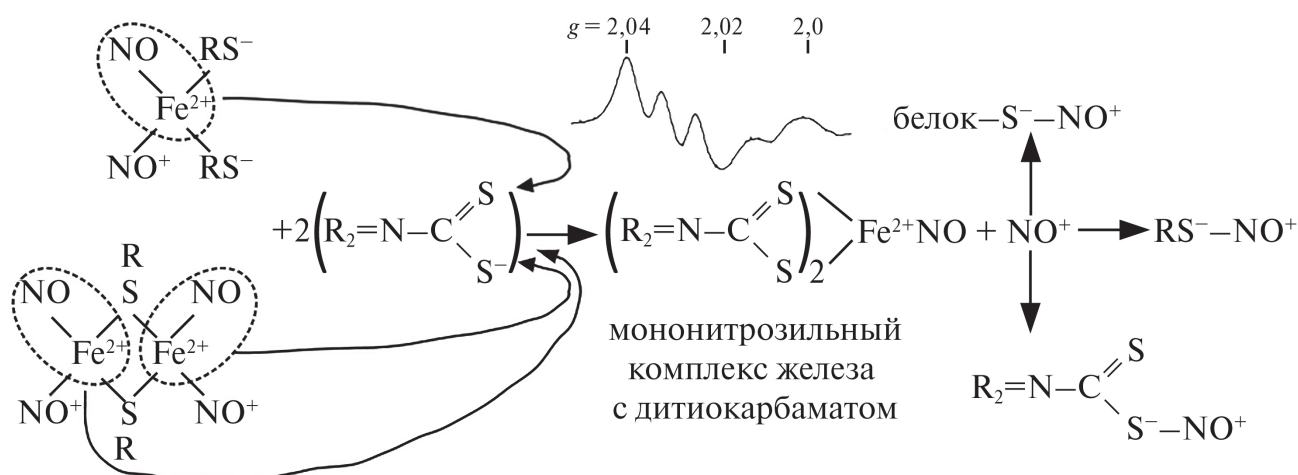
При блокаде тиоловых групп в М- и Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами различными тиоловыми реагентами или при окислении этих групп, вызывающих распад ДНКЖ, высвобождающиеся из комплексов катионы нитрозония при нейтральных значениях pH раствора гидролизуются (из-за отсутствия тиолов) в нитрит, тогда как другая половина нитрозильных лигандов высвобождалась в форме газообразного NO, регистрируемого как показано на рис. 4 по четырём эквидистантным полосам оптического поглощения [20, 22].

Способность ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами выступать в живых организмах в качестве доноров как катионов нитрозония, так и нейтральных молекул NO, естественно, делает затруднительным выяснение вопроса, какой из этих компонентов ДНКЖ может быть ответственным за какое-либо биологическое действие этих комплексов. Нами предложен экспериментальный подход для решения этой проблемы, позволяющий выявить биологическое действие ДНКЖ, обусловленное только высвобожда-

ющимися из этих комплексов катионами нитрозония. Суть его состоит в использовании в опытах с ДНКЖ производных дитиокарбамата (ДТК) – диэтилдитиокарбамата (ДЭТК) или N-метил-D,L-глюкаминдитиокарбамата (МГД) [25]. Как показано на схеме 5, при контакте с ДНКЖ эти агенты перехватывают на себя из железодинитрозильных [Fe(NO)₂]-фрагментов этих комплексов железо-мононитрозильную группу – [Fe(NO)], образующую с производными дитиокарбамата (R₂=NCS₂) прочные ЭПР-регистрируемые мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ), характеризующиеся формулой [(R₂=NCS₂)₂FeNO].

Образующиеся высокостабильные МНКЖ с МГД или ДЭТК биологически неактивны, так что ни включённые в них молекулы NO, ни ионы Fe²⁺, ни дитиокарбаматные лиганды не высвобождаются из них и не способны в связи с этим оказывать на живые организмы какое-либо действие. Что касается катионов NO⁺, высвобождающихся при этом из железодинитрозильных фрагментов ДНКЖ, в живых организмах они преимущественно могут включаться в реакцию S-нитрозирирования, показанную на схеме 5, с образованием соответствующих S-нитрозотиолов [25–27]. Кроме того, катионы нитрозония могут воздействовать на различные клеточные компоненты как сильные окислители [26, 27]. Эти воздействия и инициируют, по-видимому, в клетках различные негативные, цитотоксические эффекты.

Эксперименты, проведённые английскими исследователями на культуре фибробластов Swiss 3T3, показали, что в дозовом отношении



М- и Б-ДНКЖ + дитиокарбамат

Схема 5. Механизм превращения Б- и М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в МНКЖ с ДЭТК или МГД. Высвобождающиеся при этом катионы NO⁺ могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе ДЭТК или МГД. Наверху приводится зарегистрированный при 77К сигнал ЭПР со значениями g-фактора – 2,04 и 2,02 и триплетной сверхтонкой структурой, характерный для МНКЖ с дитиокарбаматом [25]

катионы нитрозония в 40 раз более цитотоксичны, чем молекулы NO [28]. Доноры NO⁺ – ионы нитропрусида [(CN)⁻₅Fe²⁺NO⁺]²⁻ – вызывали апоптоз у 50% клеток фибробластов уже после 2-часовой инкубации этих клеток с 20 мкМ нитропрусида, тогда как аналогичное действие на фибробласты Swiss 3T3 молекулы NO оказывали только при концентрации 800 мкМ через 24 ч инкубации клеток с газообразным NO или с донорами NO – S-нитрозоглутатионом (GS-NO) или S-нитрозо-N-ацетилпенициламинем (SNAP). Аналогичный результат получен для бактерий [29, 30]. Таким образом, есть основание полагать, для катионов нитрозония характерен более выраженный цитотоксический эффект по сравнению с молекулами NO. Поскольку оба этих агента – NO⁺ и NO – могут высвобождаться из ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, оказываемое этими комплексами негативное, цитотоксическое действие на живые организмы, вероятнее всего, может быть обусловлено высвобождающимися из них катионами нитрозония, тогда как позитивное, регуляторное действие – высвобождающимися из ДНКЖ нейтральными молекулами NO.

ПОЗИТИВНОЕ, РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДНКЖ КАК ДОНОРОВ NO НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ

В настоящее время обнаружено разнообразное позитивное, регуляторное действие ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами на различные биосистемы. Например, продемонстрирована их способность повышать жизнеспособность культур незлокачественных клеток при вариации концентрации комплексов в диапазоне 20–250 мкМ [31–34] и вместе с тем оказывать на культуры злокачественных клеток токсическое действие примерно в том же диапазоне концентраций [25, 35, 36]. Другой пример: оказалось, что при оральном введении мышам ДНКЖ с меркаптоэтанолом, эти комплексы, переходя на альбумин или муцин, поступали из желудка в мозг этих животных, индуцируя нейрогенез в гиппокампусе и усиливая тем самым когнитивные способности мышей [37]. К сожалению, в этих исследованиях вопрос о том, какими компонентами ДНКЖ – молекулами NO или катионами нитрозония – были обусловлены эти эффекты, в цитированной работе не ставился. Что касается других приводимых ниже примеров позитивного действия ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами на живые организмы, можно с достаточно чёткой уверенностью гово-

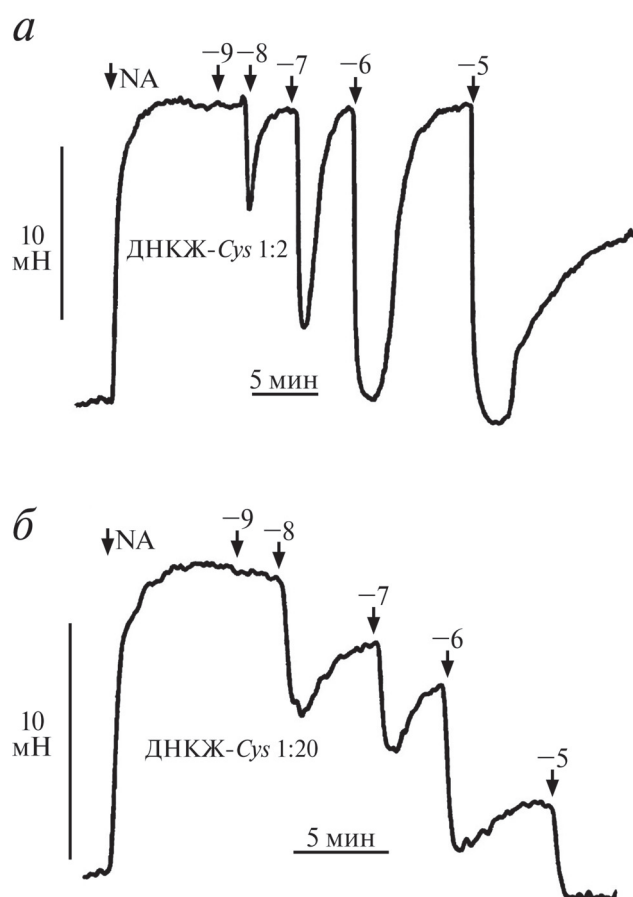


Рис. 5. Вазодилаторное действие ДНКЖ с цистеином при соотношении ДНКЖ и несвязанного с комплексом (свободного) цистеина, равном 1 : 2 (а) или 1 : 20 (б) в зависимости от дозы ДНКЖ (от 1 нМ до 10 мкМ) на кольцевом сегменте абдоминальной аорты крыс с сохранённым эндотелием, предварительно сокращённым норадреналином (NA, 10⁻⁷ М)

рить о том, что эффекты действительно были обусловлены высвобождением из этих комплексов нейтральных молекул NO.

В первую очередь это касается вазодилаторной [38–41] и гипотензивной [42–47] активности этих комплексов, демонстрируемой на рис. 5 и 6.

Как следует из рис. 5, ДНКЖ с цистеином вызывают расслабление сосудов, начиная с концентрации 10 нМ. При этом скорость восстановления тонуса сосуда снижается по мере повышения содержания свободного цистеина в среде, что коррелирует с повышением стабильности ДНКЖ в этой среде. Вазодилаторная активность этих комплексов полностью подавлялась в присутствии ингибиторов гуанилатциклазы – гем-содержащего фермента, активируемого молекулярным NO [39]. Этот факт однозначно свидетельствует о том, что именно молекулы NO, высвобождавшиеся из ДНКЖ, ответственны за вазорелаксирующее действие этих комплексов.

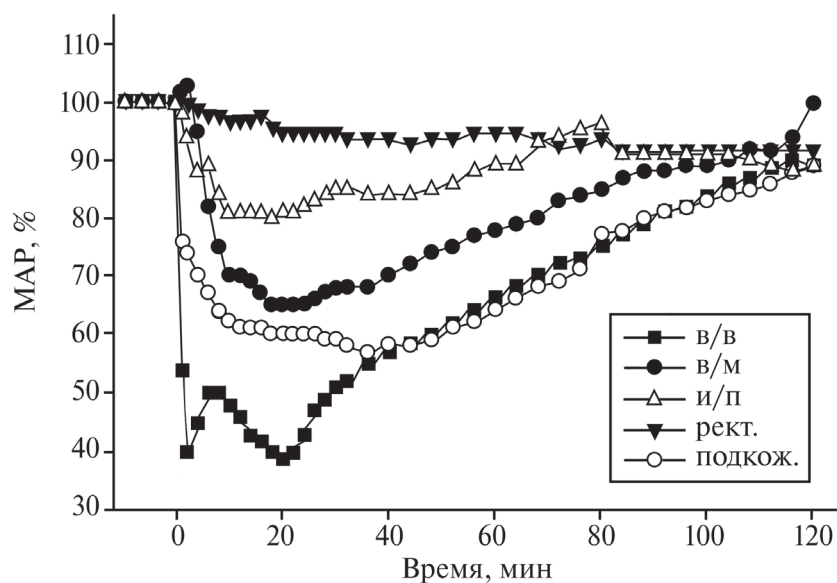


Рис. 6. Изменение среднего артериального давления (МАР, в % к исходному) у крыс при болюсном внутривенном (в/в), внутримышечном (в/м), интраперитонеальном (внутрибрюшинном) (и/п), ректальном (рект.) или подкожном (подкож.) введении крысам Б-ДНКЖ с глутатионом (в дозе 2 мкмольа на кг веса животного)

Впервые вазодилататорное действие ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами было обнаружено нами в сотрудничестве с Ю.П. Ведерниковым во Всесоюзном кардиологическом научном центре (ВКНЦ) [38], а затем этот результат воспроизведён [39] нами в Германии в сотрудничестве с Р. Буссе и А. Мюльшем. В это же время независимо группа английских исследователей получила аналогичный результат [40]. Естественно было ожидать, что высокая вазодилататорная активность ДНКЖ должна была обеспечивать гипотензивное действие этих комплексов, что и было обнаружено нами в 80-е гг. сначала на наркотизированных (анестезированных) крысах, а затем и на бодрствующих животных [42–44]. Более детальное изучение этого эффекта было продолжено в сотрудничестве с сотрудниками ВКНЦ в 2000-е гг. [45–47].

В качестве примера одного из результатов этих исследований на рис. 6 показано изменение среднего артериального давления (МАР) у крыс в зависимости от способа введения им Б-ДНКЖ с глутатионом (рис. 6) [47].

В отличие от в/в введения комплекса, при котором обнаруживалась фаза кратковременного (на несколько минут) снижения МАР, обусловленного высвобождением NO из вводимых низкомолекулярных ДНКЖ, при других способах инъекции ДНКЖ с GSH эта фаза не наблюдалась. В таких случаях гипотензия определялась высвобождением NO из белковых ДНКЖ, возникающих в результате переноса железо-динитрозильных $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ -фрагментов с низкомолекулярных ДНКЖ на белковые тиолы с образованием белок-связан-

ных ДНКЖ. Высокая устойчивость последних обеспечивала лишь медленное высвобождение из них молекул NO с медленным снижением МАР и медленным его восстановлением до исходного уровня. Аналогичная кинетика изменения МАР наблюдалась и при в/в введении ДНКЖ с GSH после быстрого превращения последних в белок-связанные ДНКЖ, которые обнаруживались в крови животных по сигналу 2,03, сохранявшему анизотропную форму при повышении температуры его регистрации от 77К до комнатной температуры [45, 46].

На участие молекул NO, высвобождавшихся из ДНКЖ, как детерминантов гипотензивного действия этих комплексов на бодрствующих крыс (рис. 7, а, кривые 1 и 2), свидетельствуют результаты исследования влияния ДЭТК на кинетику гипотензивного эффекта ДНКЖ с тиосульфатом [44]. Как показано на рис. 7, а (кривая 3), в/в введение крысам этого комплекса через 1 мин после такого же введения им раствора ДЭТК приводило практически к полному снятию гипотензивного эффекта. При введении ДЭТК после ДНКЖ в моменты, указанные на рис. 7, а (кривые 4 и 5) стрелками, наблюдалось кратковременное снижение артериального давления, сменявшееся постепенным его восстановлением до исходного уровня.

Как показано на схеме 5, при контакте ДНКЖ с производными дитиокарбамата (ДТК) возникают весьма устойчивые комплексы МНКЖ–ДТК, жёстко удерживающие железо-моонитрозильную группу и тем самым предотвращающие действие на клетки и ткани входящих в эту группу молекулы NO и иона Fe^{2+} .

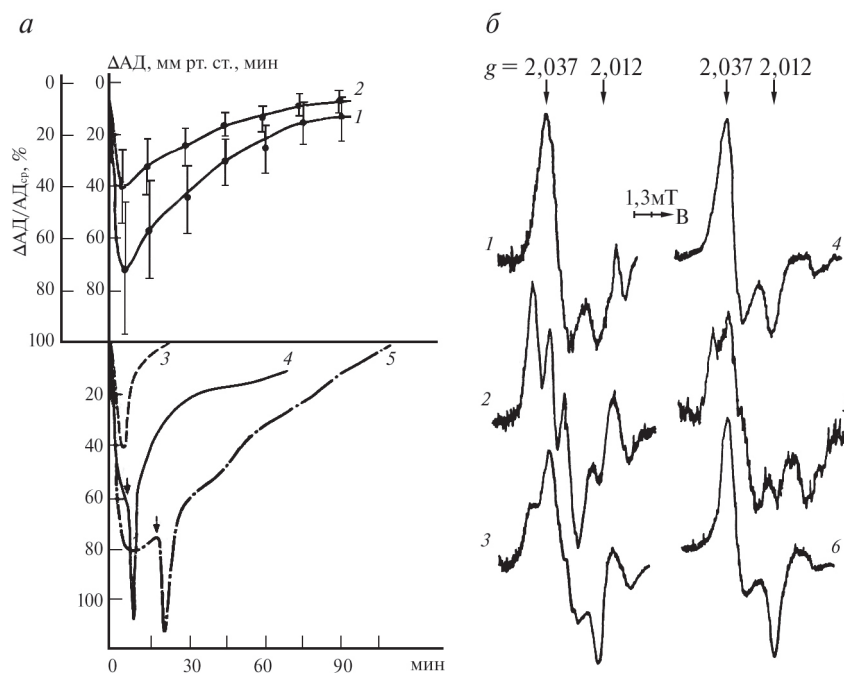


Рис. 7. Изменение артериального давления (АД или $\Delta A.D.$) у бодрствующих крыс (*a*) после в/в введения им ДНКЖ с тиосульфатом в дозе 10 мкмоль/кг веса животных (кривые 1 и 2); ДНКЖ введён через 1 мин после в/в введения ДЭТК (30 мг/кг) (кривая 3); ДЭТК вводили животным после ДНКЖ в моменты, указанные стрелками (кривые 4 и 5). *б* – Спектры ЭПР крови (1 и 4), печени (2 и 5) и почек (3 и 6), полученных у крыс при последовательном введении ДЭТК + ДНКЖ с интервалом 1 мин (1–3) или последовательном введении ДНКЖ + ДЭТК с интервалом 1 мин (4–6). Спектры зарегистрированы при 77 К

Очевидно, что именно включение NO в МНКЖ с ДЭТК предварительно обработанным крысам приводило к резкому ослаблению гипотензивного действия ДНКЖ, показанному на рис. 7. Об этом свидетельствует также трансформация сигнала 2,03 в тканях этих животных (рис. 7, *б*, спектры 1–3): в печени и почках регистрировался триплетный сигнал ЭПР, характерный для МНКЖ–ДЭТК, тогда как в крови снижалась амплитуда компоненты сигнала 2,03 при $g = 2,012$. Это снижение наблюдалось нами ранее в специальных опытах, в которых изучалось взаимодействие ДЭТК с ДНКЖ, связанными в крови крыс с молекулами альбумина [48]. Что касается дополнительного кратковременного снижения артериального давления при введении крысам ДЭТК после ДНКЖ (рис. 7, *a*, кривые 4 и 5), оно, очевидно, было обусловлено быстрым распадом S-нитрозотиолов (RS-NO), образующихся в соответствии со схемой 5 в реакции ДНКЖ с ДЭТК. Высвобождавшиеся из RS-NO молекулы NO и обеспечивали наблюдавшееся кратковременное снижение артериального давления [44]. Часть ДНКЖ, появляющихся в тканях животных, могла в этих опытах оставаться недоступной для ДЭТК, о чём свидетельствует факт меньшего вклада триплетного сигнала ЭПР от МНКЖ–ДЭТК в суммарные спектры ЭПР, приводимые на рис. 7, *б* (спектры 5 и 6). Эти сохранившиеся ДНКЖ и обе-

спечивали задержку восстановления артериального давления до исходного уровня (рис. 7, *a*, кривые 4 и 5).

Итак, основной результат этих исследований – доказательство того, что гипотензивная активность ДНКЖ в наших опытах определялась высвобождающимися из этих комплексов молекулами NO, связывающимися с гемовым железом в гуанилатциклазе, и тем самым активирующими этот фермент.

Аналогичное заключение можно сделать и в отношении способности ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами ускорять заживление, по крайней мере, кожных ран. Этот процесс, вызываемый ДНКЖ, полностью имитировал заживление этих ран, стимулированное газообразным NO, подаваемым на раны, или NO, продуцируемым в них из L-аргинина при участии конститутивных и индуцибельной NO-синтаз [49, 50]. То же самое можно сказать и в отношении способности ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами подавлять агрегацию тромбоцитов и, более того, инициировать лизис уже образовавшихся тромбов [51, 52]. Здесь следует отметить и то, что, как было показано в работе Шамовой и соавт. [53], ДНКЖ способны резко повышать эластичность эритроцитов и тем самым облегчать их движение в капиллярах – свойство ДНКЖ, полезное для улучшения микроциркуляции.

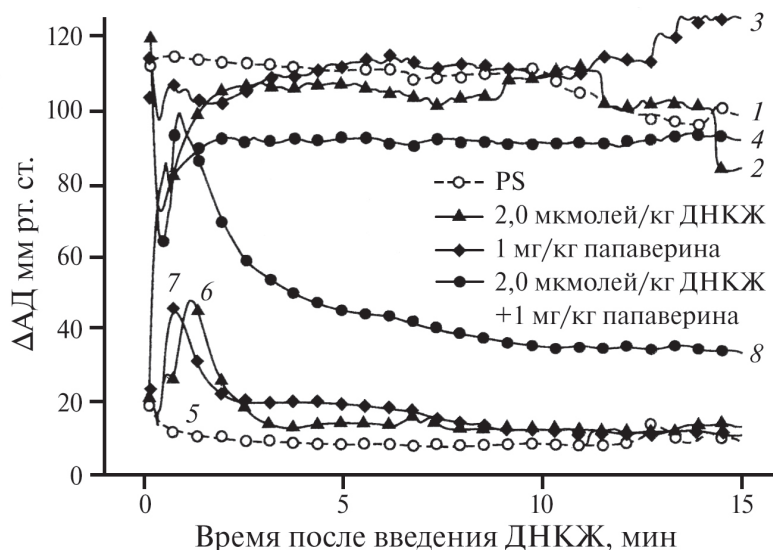


Рис. 8. Изменение во времени системного среднего артериального давления (кривые 1–4) и внутрикавернозного давления крови в кавернозных (пещеристых) телах пениса (кривые 5–8) при внутрикавернозном (в/к) введении крысам-самцам ДНКЖ с цистеином в дозе 2 мкмоль на кг веса животного – кривые 2 и 6; папаверина (1 мг/кг веса животного) – кривые 3 и 7, суммарном введении (ДНКЖ + папаверин) в тех же концентрациях – кривые 4 и 8 и физраствора (PS) – кривые 1 и 5

Во всех этих биосистемах позитивное, регуляторное действие ДНКЖ было обусловлено высвобождением из них молекул NO, активирующих один из важнейших регуляторных ферментов клеток и тканей – гуанилатциклазу, ответственную за появление в биосистемах одного из вторичных мессенджеров – циклического гуанозинмонофосфата (сGMP), запускавшего сложную систему биохимических процессов, приводивших в итоге к физиологическим эффектам, вызванным взаимодействием с гуанилатциклазой молекулярного NO, в частности, высвобождавшегося из ДНКЖ.

Гидролиз сGMP соответствующей фосфодиэстеразой (ФДЭ-5) блокировал реализацию этих эффектов. В свою очередь, подавление активности этого фермента, например, папаверином, усиливало эти эффекты, например, существенно повышало длительность гипотензивного действия ДНКЖ [54]. Эти закономерности четко проявлялись в наших опытах на животных по изучению эректильного действия ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами [54], результаты которых продемонстрированы на рис. 8.

Введение в пенис крыс-самцов ДНКЖ с цистеином вместе с папаверином (кстати, аналогом Виагры) приводило к резкому повышению длительности эрекции пениса. Более того, у 10 из 17 принимавших участие в эксперименте животных развивалось явление приапизма (необратимая эрекция из-за отсутствия оттока венозной крови из пениса). Величина давления крови в кавернозных телах достигала уровня, равного

системному среднему артериальному давлению у тех же животных. Характерно, что пенил-эректильная реакция на ДНКЖ с цистеином имела место и у крыс, подвергнутых хирургической денервации кавернозной ткани [54].

НЕГАТИВНОЕ, ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДНКЖ КАК ДОНОРОВ NO⁺ НА КЛЕТКИ И ТКАНИ

Впервые цитотоксическое действие ДНКЖ как доноров катионов нитрозония было продемонстрировано в работе российских и немецких исследователей [35] на культуре опухолевых клеток Jurkat человека с использованием М-ДНКЖ с тиосульфатом (М-ДНКЖ–ТС). Как показано на рис. 9, при одновременном введении в культуру опухолевых клеток 0,1 мМ М-ДНКЖ–ТС и 0,2 мМ МГД количество клеток в состоянии апоптоза повышалось до 60%. Если же учесть, что, в соответствии со схемой 5, при указанном соотношении количества М-ДНКЖ и производного дитиокарбамата (МГД), железо-мононитрозильная группа из М-ДНКЖ–ТС должна была полностью включаться в биологически неактивные МНКЖ–МГД с высвобождением 0,1 мМ катионов нитрозония, можно утверждать, что 60%-ный уровень апоптоза был обусловлен только высвобождающимся из М-ДНКЖ–ТС 0,1 мМ NO⁺.

Таким образом, МГД, фактически обеспечивавший распад М-ДНКЖ–ТС (как это

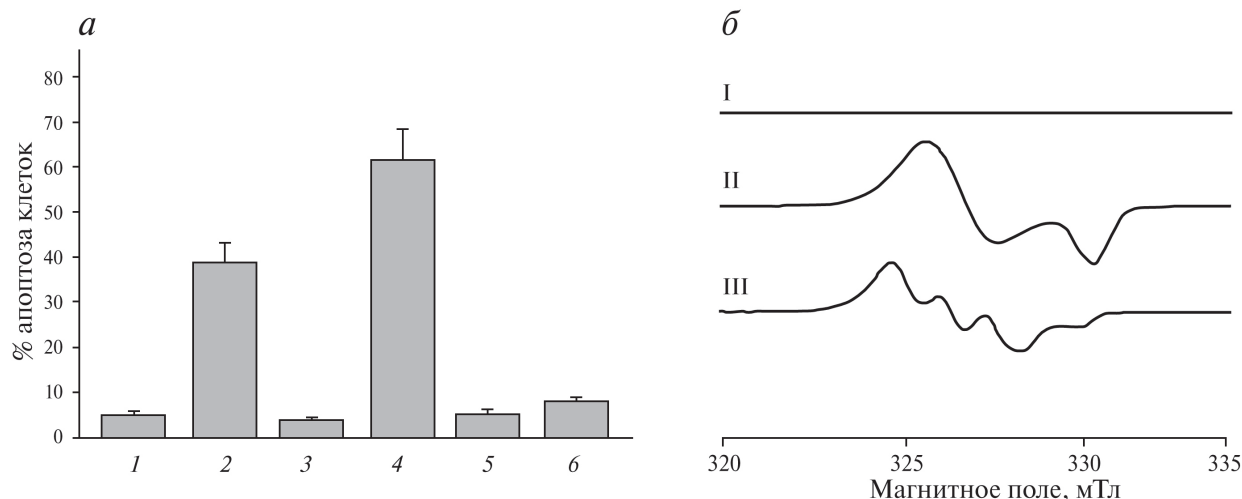


Рис. 9. Иницирование апоптоза в культуре клеток Jurkat при введении М-ДНКЖ–ТС и МГД. *а* – Доля (в %) клеток Jurkat в состоянии апоптоза в контроле (столбик 1), после добавления в клеточную культуру 0,1 мМ М-ДНКЖ–ТС (ДНКЖ, столбик 2), М-ДНКЖ–ТС + 2 мМ GSH (ДНКЖ + GSH, столбик 3), М-ДНКЖ–ТС + 0,2 мМ МГД (ДНКЖ + МГД, столбик 4), 0,2 мМ МГД (столбик 5) и 0,1 мМ (Fe + тиол) (столбик 6). *б* – Трансформация сигнала 2,03 (I), зарегистрированного в клеточной культуре после добавления к ней М-ДНКЖ–ТС, в сигнал ЭПР МНКЖ–МГД (II) при последующем введении в культуру 0,2 мМ МГД. III – контроль

следует из приводимых на рис. 9, ЭПР-спектров I–III) за счёт появляющихся катионов нитрозония, резко повышал цитотоксическое действие М-ДНКЖ. Характерно, что при замещении в М-ДНКЖ–ТС тиосульфата на глутатион, что приводило к образованию более устойчивого Б-ДНКЖ–GSH, цитотоксическая активность препарата существенно ослаблялась (рис. 9, *а*, столбик 3).

Проведённые нами аналогичные эксперименты на культуре опухолевых клеток человека MCF-7 с использованием Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ–МС) или

Б-ДНКЖ–GSH также показали, что добавление к ним МГД резко ослабляло выживаемость клеток при действии на них обоих комплексов (выживаемость оценивалась по МТТ-тесту, т. е. по ослаблению активности митохондрий [25] (рис. 10).

Как следует из рис. 10, в соответствии с вышеприведённым рассмотрением, 0,5 мМ катионов нитрозония, высвобождавшихся под действием МГД из Б-ДНКЖ–МС на 30% ослабляли выживаемость клеток. В опытах с Б-ДНКЖ–GSH эта величина достигалась при соотношении комплекса и МГД, равном 1 : 3.

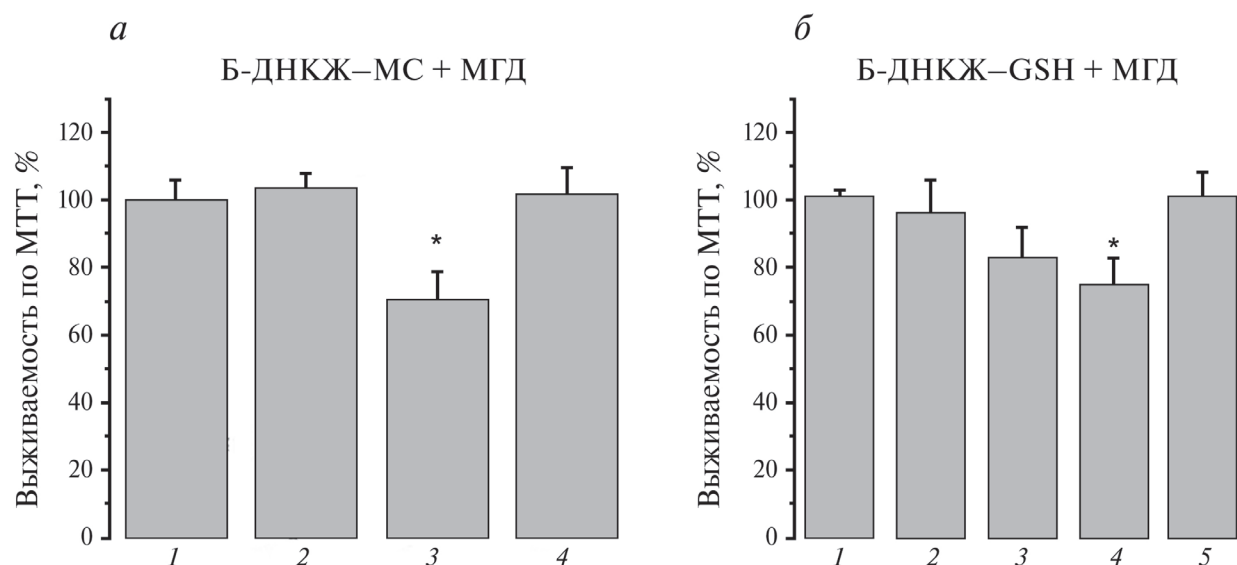


Рис. 10. Ослабление выживаемости клеток MCF-7 под действием Б-ДНКЖ–МС (*а*) или Б-ДНКЖ–GSH (*б*) при добавлении к ним МГД, определявшееся МТТ-методом. Соотношение концентрации обоих Б-ДНКЖ и МГД (Б-ДНКЖ/МГД в мМ) следующее: *а* – 0/0 (1); 0,5/0 (2); 0,5/1 (3); *б* – 0/0 (1); 1/0 (2); 1/2 (3); 1/3 (4). Столбики 4 на панели *а* и 5 – на панели *б* характеризуют влияние МНКЖ/МГД при концентрации этих комплексов 0,5 (4) и 1,0 мМ (5)

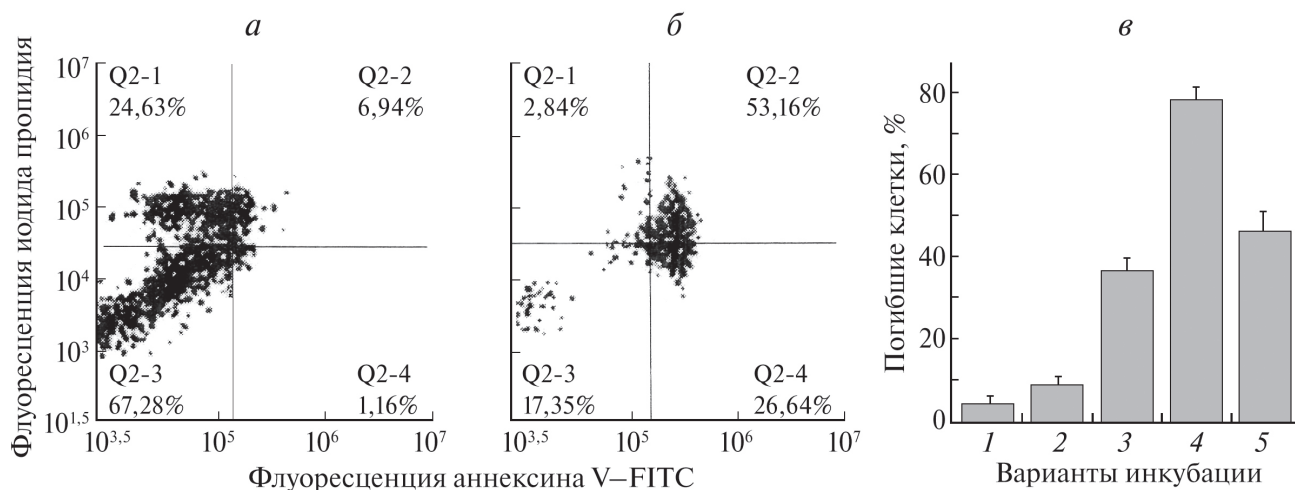


Рис. 11. 2D-диаграммы, полученные методом проточной цитофлуориметрии клеточной культуры. Гибель клеток MCF-7 при их обработке М-ДНКЖ–МС (0,5 мМ) и МГД (1,0 мМ) (по окрашиванию смеси «аннексин + пропидий иодид»). Клетки инкубировали или только с Б-ДНКЖ–МС (а) или смесью Б-ДНКЖ–ТС + МГД (б). в – Гибель клеток в %-ном отношении: столбик 1 – контроль; столбик 2 – инкубация с Б-ДНКЖ–МС; столбик 3 – инкубация с МГД; 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

Не исключено, что низкая эффективность действия катионов нитрозония в этих опытах была обусловлена слабым проникновением МГД в клетки, недостаточным для эффективного токсического действия, появляющегося в клетках нитрозония на митохондрии.

Более эффективное подавление выживаемости клеток (их гибель) в этой культуре определялось по двумерной диаграмме, полученной методом проточной цитофлуориметрии [25], характеризующей степень апоптоза (по флуоресценции аннексина V-FITC) и степень некроза (по флуоресценции пропидия иодида) (рис. 11).

Как следует из рис. 11, б, % клеток, подвергшихся апоптозу, резко повышался при инкубации клеток с М-ДНКЖ–МС + МГД (квадранты Q2-2 и Q2-4), достигая 80%, как это дополнительно показано на рис. 11, в. Поскольку в этих опытах соотношение концентрации комплексов (определённое в пересчёте на одну железо-динитрозильную группу в Б-ДНКЖ–МС) и концентрации МГД составляло 1 : 2, все Б-ДНКЖ–МС превращались в МНКЖ–МГД, так что 80%-ная гибель вызывалась 0,5 мМ катионов нитрозония, высвободившихся из Б-ДНКЖ–МС в ходе этого превращения.

Аналогичные результаты были получены нами при изучении влияния Б-ДНКЖ–GSH и ДЭТК на интактность бактерий *Escherichia coli* TN530 [30] (их интактность оценивалась по колониеобразующей активности) (рис. 12).

Как следует из рис. 12, полная потеря интактности бактериальных клеток вызывалась

0,5 мМ катионов нитрозония, высвобождающихся из Б-ДНКЖ–GSH в ходе превращения практически всех этих комплексов в МНКЖ–ДЭТК [30]. Столь эффективная трансформация Б-ДНКЖ–GSH, очевидно, была обусловлена лёгким проникновением ДЭТК во внутриклеточное пространство, в котором локализовались ДНКЖ. В отличие от МГД, комплексы которого с металлами оставались водорастворимыми

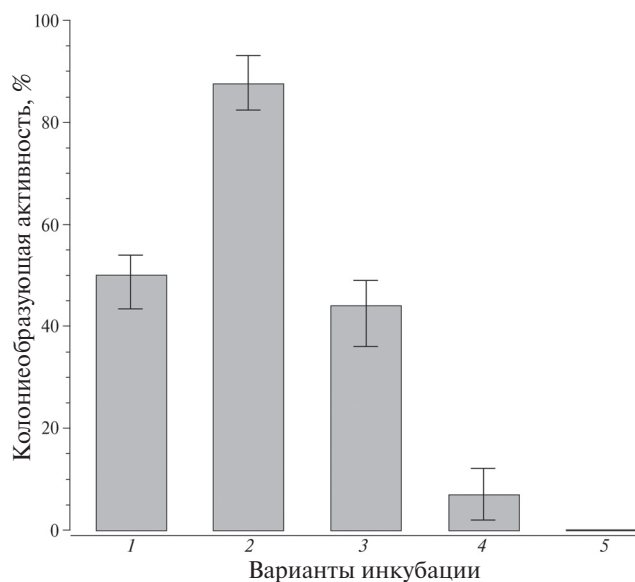


Рис. 12. Влияние на колониеобразующую активность бактерий *E. coli* добавления ДЭТК (2,5 мМ) (столбик 1); Б-ДНКЖ–GSH (0,5 мМ, столбик 2); суммарного действия ДЭТК + Б-ДНКЖ–GSH (1 + 2) при отсутствии взаимодействия между ними (столбик 3); при одновременном введении в среду инкубации Б-ДНКЖ–GSH + ДЭТК (столбик 4); при введении Б-ДНКЖ–GSH, а через 40 мин – ДЭТК (столбик 5)

римыми, аналогичные комплексы ДЭТК приобретали гидрофобные свойства, что и позволяло им легко проходить сквозь клеточные мембраны.

Способность только ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами функционировать в этой системе в качестве доноров катионов нитрозония, вызывающих инактивацию бактериальных клеток, демонстрируется следующими опытами. Как следует из результатов опытов, приведённых на рис. 13 [30], при одновременном добавлении к клеткам *E. coli* 0,5 мМ ДЭТК и 0,5 мМ нитрита натрия или S-нитрозоглутатиона (GS-NO) колониеобразующая активность бактерий (рис. 13, столбики 6 и 7 соответственно) практически не отличалась от рассчитанной для суммарного действия ДЭТК + NaNO₂ или ДЭТК + GS-NO при отсутствии взаимодействия между этими агентами (рис. 13, столбики 4 и 5 соответственно). Если же ДЭТК добавляли в клеточную среду через 40 мин после NaNO₂ или GS-NO, наблюдалась полная инактивация бактериальных клеток (рис. 13, столбики 8 и 9 соответственно).

Последнее было обусловлено тем, что 40 мин инкубации клеток с NaNO₂ или GS-NO было достаточно, чтобы эти агенты, как доноры NO, могли обеспечить образование в бактериях ДНКЖ с тиол-содержащими группами белков, обнаруживаемых по сигналу 2,03. Вводимый к этому времени ДЭТК, при контакте с образовавшимися комплексами вызывал образование МНКЖ–ДЭТК и накопление в клетках NO⁺. Последний, возникая непосредственно внутри клеток, провоцировал их полную инактивацию.

Встаёт вопрос, существуют ли эндогенные соединения, которые, как и экзогенные производные дитиокарбамата, могли бы инициировать распад ДНКЖ, приводящий к высвобождению из них только катионов нитрозония, а не одновременно с ними молекул NO? Как показывают наши предварительные исследования, такими соединениями могут оказаться анионы супероксида. Ранее в работе Shumaev et al. [55] было установлено, что эти анионы с достаточно высокой константой скорости реакции ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) реагируют с молекулами NO в составе железо-динитрозильных фрагментов в белок-связанных ДНКЖ. В результате в этих комплексах в координационной сфере железа появляется пероксинитрит, который может, сохраняя связь с железом, изомеризоваться в нитрат, что должно приводить к распаду ДНКЖ с высвобождением из этих комплексов катионов нитрозония.

Проведённые нами исследования показали (материал готовится к печати), что при контакте Б-ДНКЖ–GSН с избытком KO₂ в качестве донора O₂⁻ действительно происходит распад ДНКЖ с одновременным накоплением в растворе нитрита при нейтральных значениях pH. Появление этого продукта однозначно свидетельствовало о высвобождении из Б-ДНКЖ–GSН катионов нитрозония, быстро гидролизовавшихся в нитрит. Что касается возможности связывания этих катионов с молекулами глутатиона, которое могло бы привести к появлению соответствующего S-нитрозотиола, то этого не происходило. GS-NO не возникал и после подкисления раствора. Ожидалось, что если часть глутатиона, входившего в состав Б-ДНКЖ или

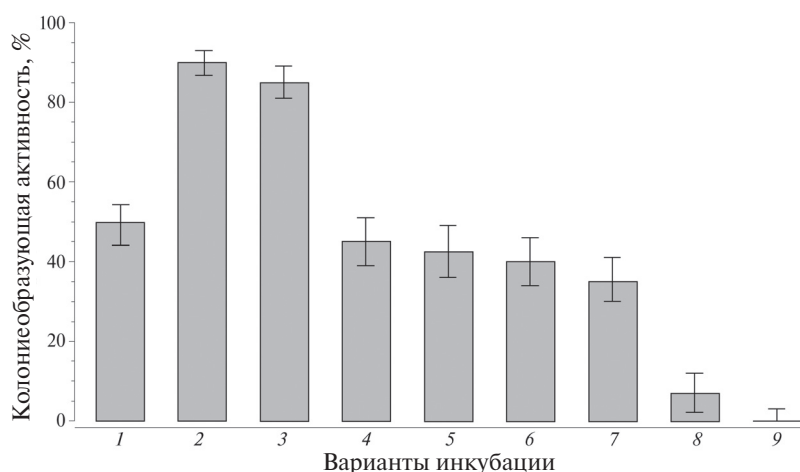


Рис. 13. Влияние на колониеобразующую активность бактерий *E. coli* добавления ДЭТК (2,5 мМ, столбик 1); NaNO₂ (0,5 мМ, столбик 2); GS-NO (0,5 мМ, столбик 3); суммарного действия ДЭТК + NaNO₂ (столбики 1 + 2) при отсутствии взаимодействия между ними (столбик 4); суммарного действия ДЭТК + GS-NO (столбики 1 + 3) при отсутствии взаимодействия между ними (столбик 5); при одновременном введении в среду инкубации ДЭТК + NaNO₂ (столбик 6); при одновременном введении в среду инкубации ДЭТК + GS-NO (столбик 7); NaNO₂ + ДЭТК (ДЭТК добавлен через 40 мин после NaNO₂, столбик 8); GS-NO + ДЭТК (ДЭТК добавлен через 40 мин после GS-NO, столбик 9)

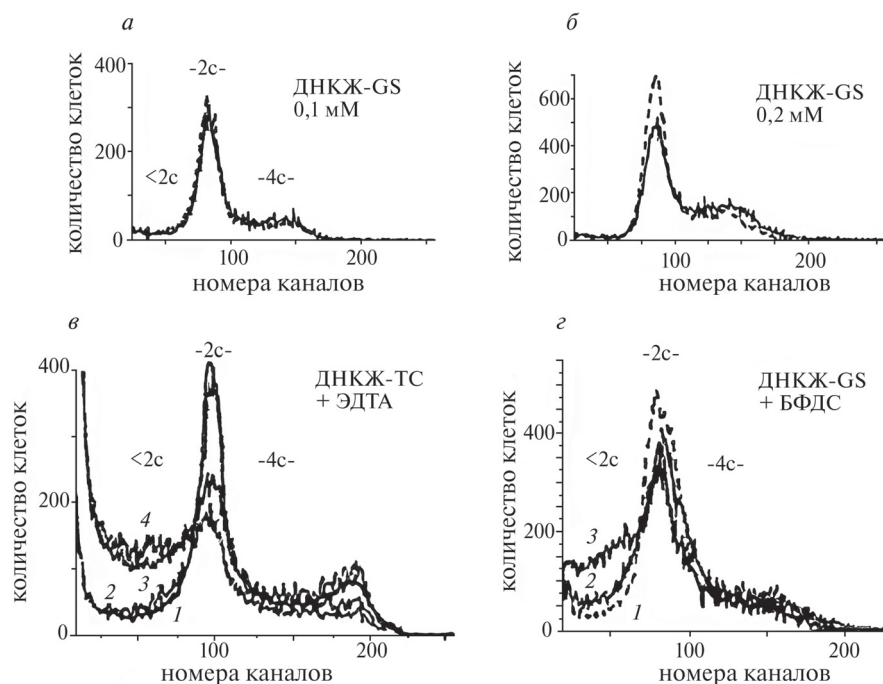


Рис. 14. Гистограммы, иллюстрирующие отсутствие влияния 0,1 мМ Б-ДНКЖ–GSN (*a*) и 0,2 мМ Б-ДНКЖ–GSN (*b*) на состояние ДНК в клетках HeLa при отсутствии хелаторов железа (сохранение в опыте популяции клеток с диплоидными ДНК). Сплошная линия – контроль, штриховая – опыт. -2с и -4с – субпопуляции клеток с диплоидным и тетраплоидным набором ДНК. *в* – Гистограмма, иллюстрирующая проапоптотическое действие 0,1 мМ ДНКЖ–ТС (кривая 3) и 0,2 мМ ДНКЖ–ТС (кривая 4) в присутствии 0,5 мМ ЭДТА. При 0,05 мМ концентрации ДНКЖ–ТС (кривая 2) эффект незначителен. Кривая 1 – контроль. *г* – Гистограмма, иллюстрирующая проапоптотическое действие 0,2 мМ Б-ДНКЖ–GSN в присутствии или отсутствии 0,05 мМ БФДС (кривые 3 и 2 соответственно). Кривая 1 – контроль. Проапоптотический эффект проявляется в повышении количества клеток с гиподиплоидным (<2с) набором ДНК [56]

сохранявшегося в форме свободных молекул в растворе этих комплексов, сохранялась бы, то при подкислении нитрит и молекулы глутатиона образовывали бы GS-NO, обнаруживаемый по полосе поглощения на 334 нм [25]. Отсутствие последнего могло быть обусловлено окислением тиоловой группы в молекулах глутатиона анионами супероксида.

Другой тип эндогенных соединений, которые могли бы разрушать ДНКЖ с высвобождением NO и NO⁺ – это хелаторы железа. Как следует из наших опытов, проведённых совместно с сотрудниками Института ядерной физики в Гатчине [56], в присутствии таких экзогенных хелаторов железа, как батофенантролиндисульфонат (БФДС) или ЭДТА, ДНКЖ–ТС или Б-ДНКЖ–GSN начинали оказывать на культуру клеток HeLa цитотоксическое действие, обнаруживаемое по деградации ДНК – развитию апоптоза в этих клетках [56] (рис. 14). Последнее оценивали по гашению флуоресценции этидиум бромид, интеркалированно в клеточную ДНК. Степень этого гашения определяли по количеству клеток (ось ординат на рис. 14), флуоресцирующих в каналах оптического регистратора, фиксирующих флуоресценцию с меньшей интенсивностью (начиная, как показано на рис. 14, с канала № 75 и ниже).

В отличие от воздействия анионов супероксида на ДНКЖ, которое должно приводить к высвобождению из этих комплексов преимущественно катионов нитрозония, разрушительное действие хелаторов железа на эти комплексы должно обеспечивать высвобождение из ДНКЖ как катионов нитрозония, так и молекул NO, причём, в соответствии со схемой 3, в равном количестве. Конечно, если исходить из того, что катионы нитрозония характеризуются существенно более высокой, чем молекулы NO, цитотоксической активностью, можно полагать, что и хелаторы железа, разрушая ДНКЖ с высвобождением из них катионов нитрозония, должны (как и анионы супероксида) инициировать резкое усиление цитотоксического действия ДНКЖ.

К сожалению, для обоих этих агентов, способных разрушать ДНКЖ, это утверждение не представляется абсолютно верным. Дело в том, что в обоих этих случаях при распаде ДНКЖ сохраняются их тиол-содержащие компоненты, и при высоком их содержании, как уже говорилось при рассмотрении результатов, приведённых на рис. 3, эти тиолы могут инициировать восстановление NO⁺ до NO. Сами по себе, тиолы не могут (из-за нарушения закона сохранения суммарного спина реагентов и продуктов

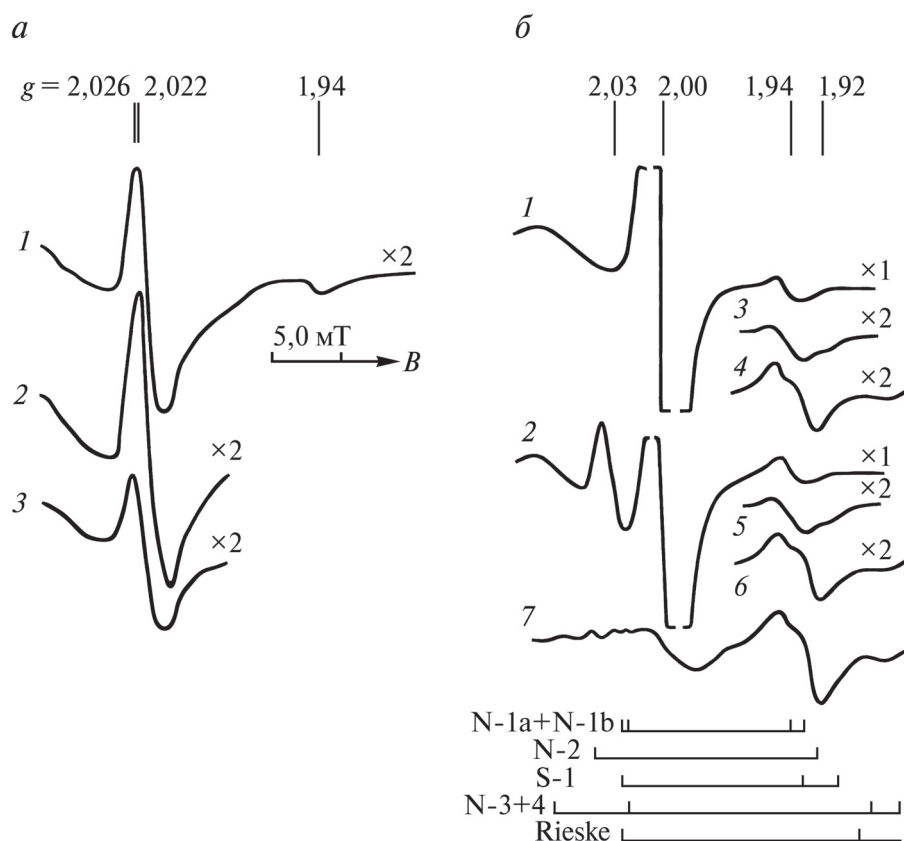


Рис. 15. Спектры ЭПР исходной (необработанной дитионитом как восстановителем) суспензии макрофагов мышей (а). Регистрации при 25К (1), 16К (2) или 30К (3). б – Спектры ЭПР той же суспензии, обработанной дитионитом + метилвиологеном (1) с последующей 5 мин обработкой NO (2). Запись при 40К (1, 2, 3 и 5) или 23К (4, б). в – Спектр ЭПР изолированной печени мышей, зарегистрированный при 23 К (7)

химической реакции) реализовать этот процесс. Этот процесс может, очевидно, реализоваться при участии спиновых катализаторов, способных по механизму спиновой поляризации перевести спин, например, тиолового реагента, из синглетного состояния в триплетное. В результате (в соответствии с законом сохранения спина в химических реакциях) становится возможным превращение NO^+ в NO, сопровождающееся превращением тиола в тиильный радикал (RS). Что касается природы спинового катализатора, в его качестве могут выступать ионы железа, входящие в состав ДНКЖ.

Таким образом, вопрос о появлении катионов нитрозония при распаде ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в химических, а тем более в биологических процессах представляется сейчас весьма сложным. Так что, каким образом можно управлять в живых организмах генерацией этих агентов, способных блокировать протекание различных метаболических процессов – рационально говорить об этом сейчас невозможно. Единственным подходом к решению такой задачи, как следует из вышеизложенного, представляется использование производных дитиокарбамата, способных при

взаимодействии с ДНКЖ обеспечивать (в соответствии со схемой 5) высвобождение из этих комплексов в качестве биологически активных агентов только катионы нитрозония.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНКЖ С АКТИВНЫМИ ЦЕНТРАМИ ЖЕЛЕЗОСЕРНЫХ БЕЛКОВ

В 80–90-е гг., когда была установлена уникальная роль оксида азота в живых организмах, причём не только позитивная, регуляторная, но и как одного из основных цитотоксических эффекторов системы клеточного иммунитета, было предположено, что это последнее определяется способностью NO разрушать активные центры железосерных белков, широко представленных в дыхательной цепи митохондрий [57–60].

Проверка этого предположения, проведённая нами в конце 80-х – начале 90-х гг. в экспериментах на тканях животных и препаратах макрофагов, не подтвердила его. В качестве контраргумента против этого предположения на рис. 15 приводятся результаты ЭПР исследо-

ваний дыхательной цепи макрофагов мышей, обработанных газообразным NO [61].

На рис. 15, *a* приводятся зарегистрированные при 16–30К спектры ЭПР исходной суспензии макрофагов, представленные сигналами ЭПР окисленной формы S-3 сукцинатдегидрогеназы при $g = 2,022$ и окисленной формы аконитазы при $g = 2,026$. После обработки этой суспензии дитионитом в присутствии редокс медиатора – метилвиологена – в спектре ЭПР доминировали сигналы ЭПР практически всех восстановленных железосерных белков в дыхательной цепи макрофагов, соотношение которых с комплексами Грина (1–3) приведено внизу на правой стороне рисунка. В суспензии макрофагов, обработанной после дитионита газообразным NO, появлялся ДНКЖ-сигнал 2,03.

Анализ этих спектров продемонстрировал практически полное равенство количества железа, включённого в железосерные белки, и железа, входящего в состав ДНКЖ [61]. Отсюда следовало, что появление ДНКЖ в суспензии макрофагов не было обусловлено разрушительным действием NO на активные центры железосерных белков с последующим включением высвобождавшегося из этих центров железа в ДНКЖ. В образовании последнего могла участвовать слабосвязанная, «свободная» форма железа – «негемовое не-FeS железо», обнаруженное в 80-е гг. в митохондриях животных шведскими исследователями [62].

Аналогичные эксперименты, проведённые нами на изолированном электрон-транспортном белке аденодоксине (рис. 16), выделенном из надпочечников быка, привели к такому же заключению [63]. Обработка этого белка газообразным NO после его восстановления дитионитом не приводила к заметному снижению сигнала ЭПР этого белка при $g = 1,94$ и $2,02$ и появлению интенсивного сигнала ДНКЖ при $g = 2,03$, появление которого было бы обусловлено распадом $[2Fe-2S]$ железосерного центра в аденодоксине (рис. 16, спектр *б*). Этот сигнал был наложен на сигнал ЭПР нитрозильных комплексов примесных гемопротейнов с компонентой при $g = 2,07$.

Спектр ЭПР раствора восстановленного аденодоксина резко изменялся, если к нему добавляли избыток соли Fe^{2+} с последующей обработкой газообразным NO. Интенсивность сигнала ЭПР при $g = 1,94$, характерного для интактного железосерного центра в аденодоксине, снижалась практически до нуля с одновременным появлением интенсивного сигнала 2,03 (рис. 16, спектр *в*). Последующая повторная обработка этого раствора дитионитом не приводила к восстановлению сигнала

при $g = 1,94$ до исходного уровня, а приводила лишь к появлению сигнала ЭПР при $g = 2,0$ и $1,98$, обусловленному, как было установлено позже, восстановленной формой связанного с аденодоксином Б-ДНКЖ [63].

Таким образом, в этих опытах происходил распад железосерного центра в аденодоксине, при этом железо, высвободившееся из железосерных центров, количественно включалось в состав возникающих ДНКЖ, связанных с тиоловыми группами апо-аденодоксина. Было основание предполагать, что обнаруженный распад мог быть обусловлен разрушительным действием на железосерный центр низкомолекулярных ДНКЖ, включающих в себя в качестве лигандов добавленного железа, например молекулы буфера (фосфата). Действительно, введение в раствор аденодоксина, предварительно синтезированного ДНКЖ с фосфатом или цистеином, мгновенно приводило и при отсутствии NO к распаду $[2Fe-2S]$ в аденодоксине и появлению белок-связанного ДНКЖ.

Эти результаты позволили нам предположить, что распад активного центра аденодоксина под действием низкомолекулярных ДНКЖ мог осуществляться путём связывания

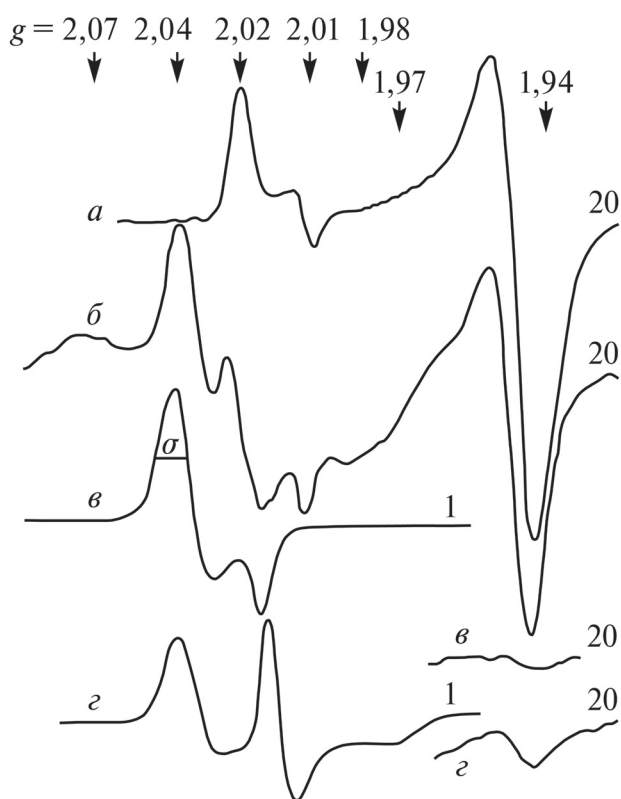


Рис. 16. Спектры ЭПР раствора аденодоксина, восстановленного дитионитом (*a*), с последующей обработкой NO (*б*) или $Fe^{2+} + NO$ (*в*). *г* – Препарат (*в*) повторно обработан дитионитом. δ^{20} и ε^{20} – Усиление радиоспектрметра в отн. ед. Запись при 77К

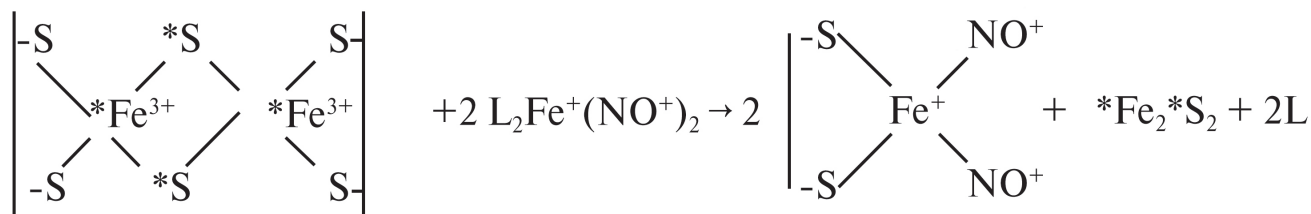


Схема 6. Механизм распада биядерных железосерных центров под действием ДНКЖ

железо-динитрозильного фрагмента этих комплексов с тиоловыми группами аденодоксина, исходно связывающих $[2Fe-2S]$, с белковой глобулой аденодоксина. Что касается железа и неорганической серы (сульфида серы – S^*), они, в соответствии со схемой 6, должны были выходить из железосерного кластера в окружающую среду (схема 6).

В связи с этим естественно было предположить, что в присутствии восстановителей, способных восстанавливать высвобождаемое железо до Fe^{2+} -состояния, это железо, образуя с NO низкомолекулярные ДНКЖ, могло продолжить процесс распада $[2Fe-2S]$ -центров, начатый экзогенными ДНКЖ, в других молекулах аденодоксина. В результате процесс распада железосерных центров мог приобретать лавинообразный, автокаталитический характер.

Соответствующие эксперименты на расторах аденодоксина полностью подтвердили это предположение [63].

Таким образом, результаты этих экспериментов показали, что NO сам по себе не способен был разрушать железосерные центры в аденодоксине: этот процесс мог инициироваться только низкомолекулярными ДНКЖ по механизму, показанному на схеме 6.

Это заключение полностью согласуется с вышеприведенными результатами наших исследований воздействия газообразного NO на железосерные белки в составе дыхательной цепи в макрофагах. Тем не менее в литературе сейчас накоплено значительное количество данных о способности молекул NO самих по себе разрушать активные центры некоторых железосерных белков с образованием в них ДНКЖ [64–66]. Эти белки относятся к белкам-регуляторам, например, к белкам, выполняющим функции факторов транскрипции в геноме. Предполагается, что для этих белков характерно повышение кислотных аминокислотных остатков в окрестности их железосерных центров. Высвобождение протонов из кислотных остатков ослабляет связь между атомами железа в этих центрах и атомами неорганической серы, что, в свою очередь, усиливает взаимодействие между атомами железа и молекулами NO и тем самым облегчает включение их обоих в ДНКЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одно из главных утверждений настоящего обзора сводится к тому, что именно ДНКЖ, возникающие в живых организмах, следует рассматривать в качестве основного донора катионов нитрозония. Более того, поскольку эти комплексы могут включать в себя основную часть молекулярного NO , появляющегося в живых организмах, ДНКЖ могут выступать также в качестве основного стабилизатора и переносчика NO к мишеням его биологического действия.

Приведенный выше экспериментальный материал позволяет предположить, что молекулы NO , высвобождающиеся из ДНКЖ, главным образом функционируют в живых организмах в качестве позитивных агентов, регулирующих жизненно важные метаболические процессы. Что касается катионов нитрозония, высвобождающихся из ДНКЖ, они выступают в основном в качестве негативных агентов, ответственных за цитотоксическое действие возникающих в живых организмах М- и Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами.

В этом отношении ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, синтезированными химическим путём, можно рассматривать в качестве основы для создания лекарств, которые могли бы обеспечить купирование бактериальных и вирусных инфекций, а также лекарств противоопухолевого действия.

Выше были приведены результаты наших исследований эффективного подавления колониеобразующей активности клеток *E. coli* (т. е. их инфекционной активности) последовательной обработкой суспензии этих клеток сначала ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, а затем – ДЭТК [30]. При такой последовательности из ДНКЖ высвобождались именно катионы нитрозония, а не молекулы NO , так что именно эти катионы оказывали негативное действие на бактерии. Получены предварительные данные, свидетельствующие о том, что в этих условиях происходило также существенное подавление способности ряда патогенных бактерий образовывать биоплёнки, защищающие их от действия различных лекарств, в частности от антибиотиков.

В 2020 г. Ванин [67] предположил, что катионы нитрозония, высвобождающиеся из ДНКЖ, могут оказывать противовирусное действие, в частности проявлять «антиковидную» активность. Предполагается, что такое действие может реализоваться через воздействие катионов нитрозония, как S-нитрозирующих агентов, на жизненно важные для пролиферации вирусов протеазы хозяина и вирусные протеазы. Проведённые в последнее время эксперименты на животных, инфицированных коронавирусами, полностью подтвердили это предположение [68].

Особое значение имеют результаты наших исследований влияния ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами на пролиферацию незлокачественных эндометриоидных опухолей у крыс с хирургически индуцированным у них эндометриозом. Эти исследования, проведённые Burgova et al. [68–71], привели к открытию

противоэндометриозного действия ДНКЖ с различными тиол-содержащими лигандами. Несомненно, полученный результат может стать надёжной базой для создания на основе этих комплексов лекарств, которые могут стать полезными при лечении эндометриоза – заболевания женщин репродуктивного периода, захватывающего в последнее время всё большую их популяцию.

Благодарности. Выражаю благодарность моему сотруднику – Николаю Ткачеву за помощь в компьютерном оформлении рисунков.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванин А. Ф. (2015) *Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина*, Институт компьютерных исследований, Ижевск/Москва, Россия.
2. Lu, T.-T., Wang, Y.-M., Hung, C.-H., Chiou, S.-J., and Liaw, W.-F. (2018) Bioinorganic chemistry of the natural [Fe(NO)₂] motif: evolution of a functional model for NO-related biomedical application and revolutionary development of a translational model, *Inorg. Chem.*, **57**, 12425-12443, doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b01818.
3. Vanin, A. F. (2019) *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms*, Cambridge Scholar Publishing, Cambridge, UK.
4. Lehnert, N., Kim, E., Dong, H. T., Harland, J. B., Hunt, A. P., et al. (2021) The biologically relevant coordination chemistry of iron and nitric oxide: electronic structure and reactivity, *Chem. Rev.*, **121**, 14682-14905, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00253.
5. Vanin, A. F. (2021) Physico-chemistry of dinitrosyl iron complexes as a determinant of their biological activity, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10356, doi: 10.3390/ijms221910356.
6. Налбандян Р. М., Ванин, А. Ф., Блюменфельд Л. А. (1964) Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках, Тезисы докладов на конференции «Свободно-радикальные процессы в биологических системах», с. 18.
7. Ванин А. Ф., Налбандян Р. М. (1965) Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках, *Биофизика*, **10**, 167-168.
8. Mallard, J. R., and Kent, M. (1964) Difference observed between electron spin resonance signals from surviving tumour tissues and from their corresponding normal tissue, *Nature*, **204**, 1192, doi: 10.1038/2041192a0.
9. Ванин А. Ф., Блюменфельд Л. А., Четвериков А. Г. (1967) Исследование методом ЭПР комплексов негеминового железа в клетках и тканях, *Биофизика*, **12**, 829-858.
10. Vithaythil, A. J., Ternberg, J. L., and Commoner, B. (1965) Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis, *Nature*, **207**, 1246-1249, doi: 10.1038/2071246a0.
11. Lancaster, J.R., and Hibbs, J. B. (1990) EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1223-1227, doi: 10.1073/pnas.87.3.1223.
12. Ванин А. Ф. (1967) Идентификация комплексов двухвалентного железа с цистеином в биологических системах, *Биохимия*, **32**, 226-232.
13. McDonald, C. C., Philips, W. D., and Mower, H. F. (1965) An electron spin resonance study of some complexes with iron, nitric oxide and anionic ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3319-3326, doi: 10.1021/ja01093a007.
14. Четвериков А. Г., Рууге Э. К., Бурбаев Д. Ш., Ванин А. Ф. (1969) Изменение формы сигнала ЭПР с $g_{cp} = 2,03$ в биологических системах в зависимости от условий регистрации, *Биофизика*, **14**, 932-935.
15. Vanin, A. F., Sanina, N. A., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. Sh., Lozinsky, V. I., et al. (2007) Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands: spatial and electronic structures, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 82-93, doi: 10.1016/j.niox.2006.07.005.
16. Vanin, A. F., Poltorakov, A. P., Mikoyan, V. D., Kubrina, L. N., and Burbaev, D. Sh. (2011) Poly-

- nuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **23**, 136-149, doi: 10.1016/j.niox.2010.05.285.
17. Enemark, J. Y., and Feltham, R. D. (1974) Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl, *Coord. Chem. Rev.*, **13**, 339-406, doi: 10.1016/S0010-8545(00)80259-3.
 18. Vanin, A. F., Malenkova, I. V., and Serezhenkov, V. A. (1997) Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: Optical and electron paramagnetic resonance studies, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 191-203, doi: 10.1006/niox.1997.0122.
 19. Vanin, A. F., and Burbaev, D. Sh. (2011) Electronic and spatial structures of water-soluble dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands underlying their activity to act as bnitric oxide and nitrosonium ion donors, *Biophys. J.*, **2011**, 878236, doi: 10.1155/2011/878236.
 20. Vanin, A. F. (2019) What is the mechanism of nitric oxide transformation into nitrosonium ions ensuring S-nitrosating processes in living organisms, *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 279-292, doi: 10.1007/s12013-019-00886-1.
 21. Ванин А. Ф. (2020) Свободно-радикальная природа молекул оксида азота как фактор, определяющий их превращения в живых организмах в катионы нитрозония, *Биофизика*, **65**, 421-438, doi: 10.31857/S00063029220030011.
 22. Vanin, A. F. (2020) How is nitric oxide (NO) converted into nitrosonium cations (NO⁺) in living organisms? (Based on the results of optical and EPR analysis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands, *Appl. Magn. Reson.*, **51**, 851-876, doi: 10.1007/s00723-020-01270-6.
 23. Truzzi, D. R., Medeiros, N. M., Augusto, O., and Ford, P. C. (2021) Dinitrosyl iron complexes (DNICs). From spontaneous assembly to biological roles, *Inorg. Chem.*, **60**, 15835-15845, doi: 10.1021/acs.inorgchem.1c00823.
 24. Borodulin, R. R., Kubrina, L. N., Mikoyan, V. D., Poltorakov, A. P., Shvydkiy, O. V., Burbaev, D. Sh., Serezhenkov, V. A., et al. (2013) Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO⁺ donors, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **29**, 4-16, doi: 10.1016/j.niox.2012.11.001.
 25. Vanin, A. F., Tronov, V. A., and Borodulin, R. R. (2021) Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF-7 human breast cancer cell culture), *Cell Biochem. Biophys.*, **79**, 93-102, doi: 10.1007/s12013-020-00962-x.
 26. Williams, D. L. H. (2007) *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.
 27. Бородкин Г. И., Шубин В. Г. (2017) Нитрозоний-катион в химических и биохимических реакциях: достижения и перспективы, *Успехи химии*, **86**, 18-46, doi: 10.1070/RCR4662.
 28. Khan, S., Kayahara, M., Joashi, U., Mazarakis, N. D., Sarraf, C., et al. (1997) Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation, *J. Cell Sci.*, **110**, 2315-2322, doi: 10.1242/jcs.110.18.2315.
 29. Cui, X., Joannou, C. L., Huges, M. N., and Cammack, R. (1992) The bactericidal effects of transition metal complexes containing NO⁺ group on the food-spoilage bacterium *Clostridium sporogenes*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **98**, 67-70, doi: 10.1016/0378-1097(92)90133-9.
 30. Ванин А. Ф., Телегина Д. И., Микоян В. Д., Ткачев Н. А., Васильева С. В. (2022) Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов, *Биофизика*, **67**, 938-946, doi: 10.31857/S0006302922050106.
 31. Polukkody, R., Chupik, R. B., Montalvo, S. K., Khan, S., Bhuvanesh, N., et al. (2017) Toward biocompatible dinitrosyl iron complex: sugar-appended thiolates, *Chem. Commun.*, **53**, 1180-1183, doi: 10.1039/C6CC08659D.
 32. Гизатуллин А. Р., Акентиева Н. П., Санина Н. А., Шматко Н. Ю., Горячев Н. С. и др. (2018) Влияние динитрозильных комплексов железа (доноров NO) на метаболические процессы в фибробластах лёгких человека, *Докл. Росс. Акад. Наук*, **483**, 454-458, doi: 10.31857/S086956520003286-7.
 33. Pestol, D. C., Chupik, R. B., Khan, S., Elsbahy, M., Wooley, K. L., et al. (2019) Towards the optimization of dinitrosyl iron complexes as NO delivery agents to smooth muscle cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **16**, 3178-3187, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00389.
 34. Akentieva, N. P., Sanina, N. A., Gizatullin, A. R., Shkondina, N. I., Prikhodenko, T. R., et al. (2019) Cytoprotective effects of dinitrosyl iron complexes on viability of human fibroblasts and cardiomyocytes, *Front. Pharmacol.*, **10**, 1277, doi: 10.3389/fphar.2019.01277.
 35. Kleschyov, A. L., Strand, S., Schmitt, S., Gottfried, D., Skatchkov, M., et al. (2006) Dinitrosyl-iron triggers apoptosis in Jurkat cells despite overexpression of Bcl-2, *Free Radic Biol. Med.*, **40**, 1340-1348, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.001.
 36. Wu, S.-C., Lu, C.-Y., Chen, Y.-L., Lo, F.-C., Wang, T.-Y., et al. (2016) Water-soluble dinitrosyl iron complex (DNIC): a nitric oxide vehicle triggering cancer cell death via apoptosis, *Inorg. Chem.*, **55**, 9383-9392, doi: 10.1021/acs.inorgchem.6b01562.
 37. Wu, C.-R., Huang, Y.-D., Hong, Y.-H., Liu, Y.-H., Narwane, M., et al. (2021) Endogenous conjugation of biomimetic dinitrosyl iron complexes with protein vehicles for oral delivery of nitric oxide to brain activation of hippocampal neurogenesis, *JACS Au*, **1**, 998-1013, doi: 10.1021/jacsau.1c00160.
 38. Vedernikov, Yu. P., Mordvintcev, P. I., Malenkova, I. V., and Vanin, A. F. (1992) Similarity between the vaso-

- relaxing activity of dinitrosyl iron complexes and endothelium-derived relaxing factor, *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 313-317, doi: 10.1016/0014-2999(92)90386-i.
39. Mülsch, A., Mordvintcev, P., Vanin, A. F., and Busse, R. (1991) The potent vasodilating and guanylyl cyclase activating dinitrosyl-iron(II) complex is stored in a protein-bound form in vascular tissue and its release by thiols, *FEBS Lett.*, **294**, 252-256, doi: 10.1016/0014-5793(91)81441-a.
40. Flitney, F. W., Megson, L. I., Flitney, D. E., and Butler, A. R. (1992) Iron-sulfur cluster nitrosyls: a novel class of nitric oxide generator: mechanism of vasodilator action on rat isolated tail artery, *Brit. J. Pharmacol.*, **107**, 842-847, doi: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14534.x.
41. Vanin, A. F., Mokh, V. P., Serezhenkov, V. A., and Chazov, E. I. (2007) Vasorelaxing activity of stable powder preparation of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 322-330, doi: 10.1016/j.niox.2006.12.003.
42. Kleschyov, A. L., Mordvintcev, P. I., and Vanin, A. F. (1985) Role of nitric oxide and iron in hypotensive action of nitrosyl iron complexes with various anionic ligands, *Studia Biofizika*, **105**, 930-102.
43. Мордвинцев П. И., Путинцев М. Д., Галаган М. Е., Орановская О. В., Медведев О. С. и др. (1988) Гипотензивная активность у наркотизированных животных динитрозильных комплексов железа с белками, *Бюлл. Всесоюз. Кардиолог. Центра*, **1**, 46-51.
44. Галаган М. Е., Орановская Е. В., Мордвинцев П. И., Медведев О. С., Ванин А. Ф. (1988) Гипотензивный эффект динитрозильных комплексов железа на бодрствующих животных, *Бюлл. Всесоюз. Кардиолог. Центра*, **2**, 75-79.
45. Lakomkin, V. L., Vanin, A. F., Timoshin, A. A., Kapelko, V. I., and Chazov, E. I. (2007) Long-lasting hypotensive action of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 413-418, doi: 10.1016/j.niox.2007.03.002.
46. Chazov, E. I., Rodnenkov, O. V., Zorin, A. V., Lakomkin, V. L., Gramovich, V. V., et al. (2012) Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **26**, 148-156, doi: 10.1016/j.niox.2012.01.008.
47. Timoshin, A. A., Lakomkin, V. L., Abramov, A. A., Ruuge, E. K., Kapelko, V. I., et al. (1915) The hypotensive effect of the nitric oxide donor Oxacom at different routes of its administration to experimental animals, *Eur. J. Pharmacol.*, **765**, 525-532, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.09.011.
48. Галаган М. Е., Киладзе С. В., Ванин А. Ф. (1997) Реакция динитрозильных комплексов негемового железа с диэтилдитиокарбаматом в крови анестезированных крыс: её специфическое проявление на физико-химическом и физиологическом уровнях, *Биофизика*, **42**, 687-692.
49. Shekhter, A. B., Rudenko, T. G., Serezhenkov, V. A., and Vanin, A. F. (2007) Dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione accelerate skin wound healing, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **52**, 534-538.
50. Shekhter, A. B., Rudenko, T. G., Istranov, L. P., Guller, A. E., Borodulin, R. R., et al. (2015) Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating wound healing, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **78**, 8-18, doi: 10.1016/j.ejps.2015.06.002.
51. Мордвинцев П. И., Руднева В. Г., Ванин А. Ф., Шимкевич Л. Л., Ходоров Б. И. (1986) Ингибирующее действие низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа на агрегацию тромбоцитов, *Биохимия*, **51**, 1851-1857.
52. Архипова М. М., Микоян В. Д., Ванин А. Ф. (2008) Влияние экзогенных доноров оксида азота и ингибиторов его ферментативного синтеза на ишемию вены конъюнктивы глаз кролика при её экспериментальной тромбозе, *Биофизика*, **53**, 315-325.
53. Шамова Е. Б., Бичан О. Д., Дрозд Е. С., Горудко И. В., Чижик С. А. и др. (2011) Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами оксида азота, *Биофизика*, **56**, 265-271.
54. Andreev-Andriyevsky, A. A., Mikoyan, V. D., Serezhenkov, V. A., and Vanin, A. F. (2011) Penile erectile activity of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **24**, 217-223, doi: 10.1016/j.niox.2011.04.008.
55. Shumaev, K. B., Gubkin, A. A., Serezhenkov, V. A., Lobysheva, I. I., Kosmachevskaya, O. V., et al. (2008) Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **18**, 37-46, doi: 10.1016/j.niox.2007.09.085.
56. Giliano, N. Ya., Konevega, L. V., Noskin, L. A., Serezhenkov, V. A., Poltorakov, A. P., et al. (2011) Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: studies with HeLa cell culture, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **24**, 151-159, doi: 10.1016/j.niox.2011.02.005.
57. Stuehr, D. J., Gross, S. S., Sakuma, I., Levi, R., and Nathan, C. F. (1989) Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide, *J. Exp. Med.*, **169**, 1011-1020, doi: 10.1084/jem.169.3.1011.
58. Lancaster, J. R., and Hibbs, J. B. (1990) EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1223-1227, doi: 10.1073/pnas.87.3.1223.
59. Stadler, J., Bergonia, H. A., DiSilvio, M., Sweetland, M. A., Billiar, T. R., et al. (1993) Nonheme nitrosyl-iron complex formation in rat hepatocyte: detection by EPR spectroscopy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**, 4-11, doi: 10.1006/abbi.1993.1173.

60. Watts, R. N., Hawkins, C., Ponka, P., and Richardson, D. R. (2006) Nitrogen monoxide (NO) – mediated iron release from cells is linked with NO-induced glutathione efflux via multidrug resistance-associated proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7670-7675, doi: 10.1073/pnas.0602515103.
61. Vanin, A. F., Men'shikov, G. B., Moroz, I. A., Mordvintsev, P. I., Serezhenkov, V. A., et al. (1992) The source of non-heme iron that binds nitric oxide in cultivated macrophages, *Biochim. Biophys. Acta*, **1135**, 275-279, doi: 10.1016/0167-4889(92)90231-y.
62. Tangeras, A., Flatmark, T., and Bakstrom, D. (1980) Mitochondrial iron not bound in heme and iron-sulfur centers, *Biochim. Biophys. Acta*, **589**, 162-175, doi: 10.1016/0005-2728(80)90035-3.
63. Voevodskaya, N. V., Serezhenkov, V. A., Cooper, C. E., Kubrina, L. N., and Vanin, A. F. (2002) Exogenous ferrous iron is required for the nitric oxide-catalyzed destruction of the iron-sulphur center in adrenodoxin, *Biochem. J.*, **368**, 633-639, doi: 10.1042/BJ20020788.
64. Crack, J. C., Smith, L. J., Stapleton, M. R., Peck, J., Watmough, N. J., et al. (2011) Mechanistic insight the nitrosylation of [4Fe-4S] cluster of WhiB-like proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 1112-1121, doi: 10.1021/ja109581t.
65. Tucker, N. P., Hicks, M. G., Clarke, T. A., Crack, J. C., Chandra, G., et al. (2008) The transcriptional repressor protein NsrR senses nitric oxide directly via a [2Fe-2S] cluster, *PLoS One*, **11**, e3623, doi: 10.1371/journal.pone.0003623.
66. Kudhair, B. K., Hounslow, A. M., Rolfe, M. D., Crack, J. C., Hunt, D. M., et al. (2017) Structure of a WbI protein and implications for NO sensing by *M. tuberculosis*, *Nature*, **8**, 2280, doi: 10.1038/s41467-017-02418-y.
67. Ванин А. Ф. (2020) Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами как доноры катионов нитрозония могут подавлять вирусные инфекции (гипотеза), *Биофизика*, **65**, 818-823, doi: 10.31857/S0006302920040250.
68. Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Пьянков О. В., Багрянская Е. Г., Микоян В. Д., и др. (2022) Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка, *Биофизика*, **67**, 969-981, doi: 10.31857/S0006302922050167.
69. Burgova, E. N., Tkachev, N. A., Paklina, O. V., Miko-yan, V. D., Adamyan, L. V., et al. (2014) The effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione and S-nitrosoglutathione on the development of experimental endometriosis in rats, *Eur. J. Pharmacol.*, **741**, 37-44, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.017.
70. Vanin, A. F., Burgova, E. N., and Adamyan, L. V. (2015) Dinitrosyl iron complexes with glutathione suppress surgically induced experimental endometriosis in rats, *Austin J. Reprod. Med. Infertil.*, **2**, 1019-1032, doi: 10.26420/austinjreprodmedinfertil.2015.1019.
71. Burgova, E. N., Khristidis, Y. I., Kurkov, A. V., Miko-yan, V. D., Shekhter, A. B., et al. (2019) The inhibiting effect of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands on the growth of endometrioid tumours in rats with experimental endometriosis, *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 69-77, doi: 10.1007/s12013-019-00865-6.

POSITIVE (REGULATORY) AND NEGATIVE (CYTOTOXIC) ACTION OF DINITROSYL IRON COMPLEXES ON LIVING ORGANISMS

Review

A. F. Vanin

*Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: vanin.dnic@gmail.com*

Proposed mechanism of dinitrosyl iron complex (DNIC) formation the main step of which is the disproportion of two NO molecules bound with Fe²⁺ ion leads to resonance structure of dinitrosyl-iron fragment as the [Fe²⁺(NO)(NO⁺)]. The latter allows to say about the complex capacity to function as donors of both neutral NO molecules as well as nitrosonium cations (NO⁺) that has been supported by experimental way. The consideration of biological activity of DNIC with thiol-containing ligands demonstrates that NO molecules and nitrosonium cations released from the complexes exert respectively positive (regulatory) or negative (cytotoxic) effect on living organisms. Enhancement of selective release of nitrosonium cations with simultaneous including of releasing NO molecules and iron ions into biologically non-active mononitrosyl iron complexes with dithiocarbamate derivatives can be achieved by this derivative using as an approach for DNIC decomposition in living organisms.

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