

УДК 577.3

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

© 2022 г. А.Ф. Ванин

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

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

Поступила в редакцию 04.03.2022 г.

После доработки 04.03.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

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

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

DOI: 10.31857/S0006302922030024, EDN: AMYDCZ

КАТИОНЫ НИТРОЗОНИЯ — КОМПОНЕНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

В настоящее время установлено, что один из универсальных регуляторов метаболических процессов — оксид азота (NO), функционирующий во всех живых организмах, способен оказывать на них не только позитивное, регуляторное, но и негативное, цитотоксическое действие [1]. Последнее в большей степени характерно не для нейтральной, молекулярной формы NO, а для его одноэлектронно-окисленной формы — катиона нитрозония (NO⁺) [2–6]. Сейчас большинством исследователей предполагается, что эта форма появляется в живых организмах в присутствии кислорода, окисляющего NO до диоксида азота (NO₂) с последующим его превращением в триоксид азота (N₂O₃), представляющий собой аддукт диоксида и оксида азота. Реакция диспропорционирования этих компонентов аддукта собственно и приводит к появлению донора катионов нитрозония (NO + NO₂⁻) — соединения, ха-

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

Вместе с тем были получены данные о том, что катионы нитрозония могут появляться в живых организмах и в отсутствие кислорода, т.е. без участия диоксида азота, в анаэробных условиях в ходе образования в живых организмах динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [8–10]. Есть основание предполагать, что включение NO в эти комплексы сопровождается трансформацией половины его молекул в катионы нитрозония в качестве нитрозильных лигандов в железо-динитрозильном фрагменте ДНКЖ, одна из резонансных структур которого описывается как Fe²⁺(NO)(NO⁺) [11–14].

В основе указанной трансформации лежит реакция диспропорционирования двух молекул NO (их взаимное одноэлектронное окисление-восстановление), чему способствует попарное связывание молекул NO с ионом Fe²⁺ на начальной стадии образования ДНКЖ в присутствии анионных (L⁻) лигандов (схема 1) [13, 14].

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

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

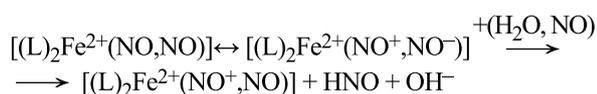


Схема 1. Предполагаемый механизм синтеза М-ДНКЖ.

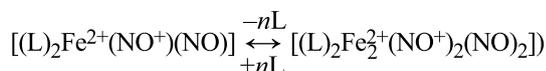


Схема 2. Равновесие между М- и Б-ДНКЖ.

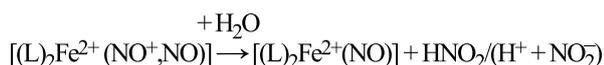


Схема 3. Возникновение мононитрозильных комплексов железа.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

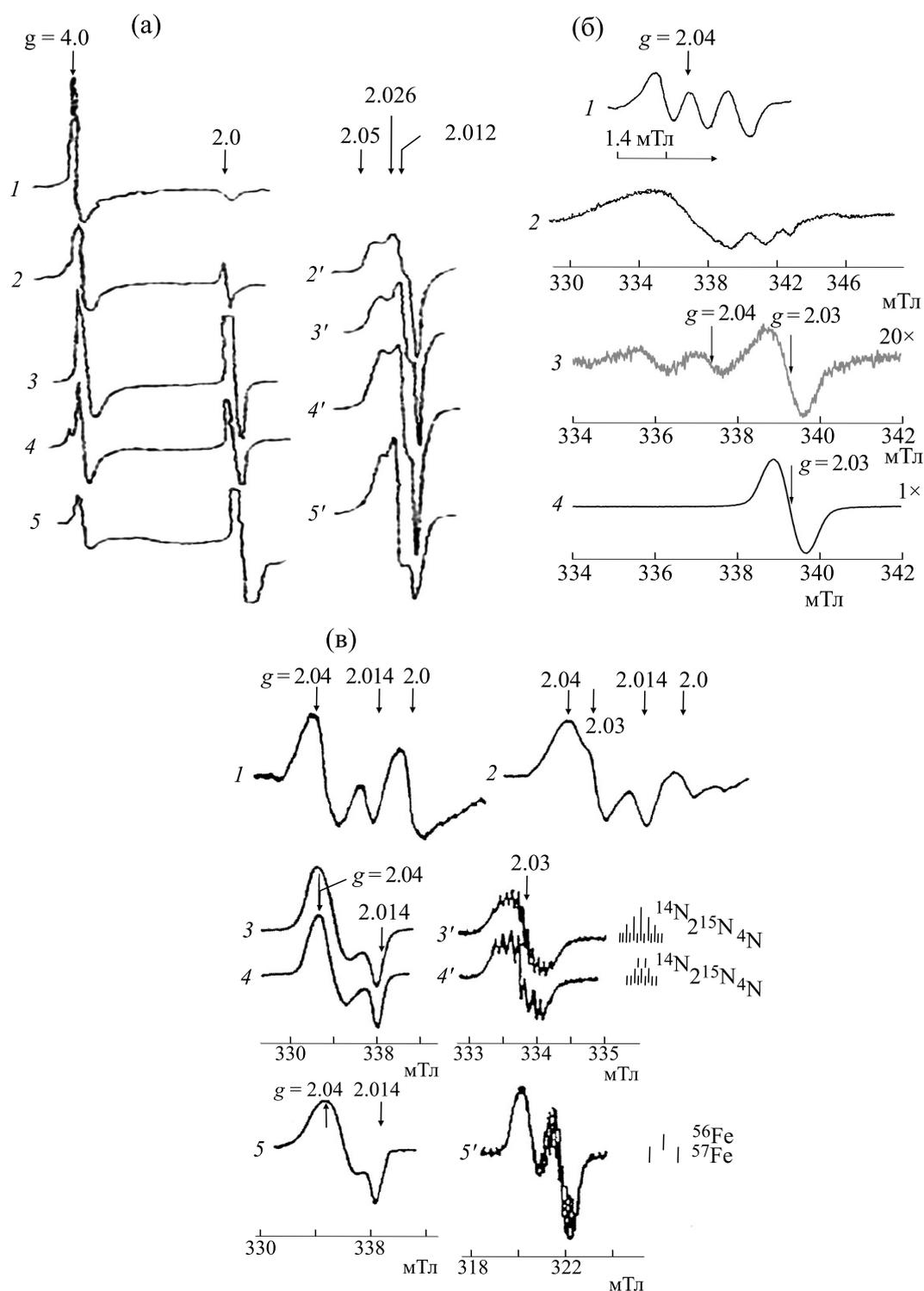


Рис. 1. Сигналы ЭПР М-ДНКЖ и МНКЖ с различными анионными лигандами. (а) – Сигналы ЭПР высокоспиновых МНКЖ (спектры 1–5) и низкоспиновых М-ДНКЖ (спектры 2'–5') соответственно с ЭДТА (спектр 1), цитратом (спектры 2, 2'), аскорбатом (спектры 3, 3'), фосфатом (спектры 4, 4') и водой (спектры 5, 5') Запись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

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

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

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА КАК ДОНОРЫ КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ

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

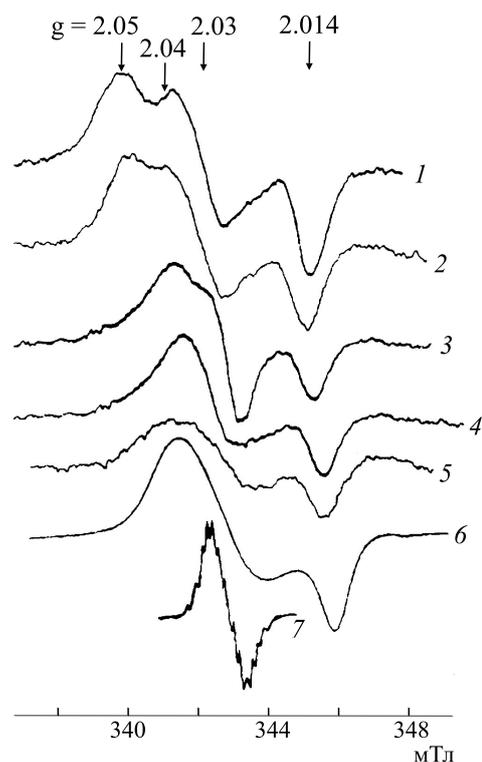


Рис. 2. Сигналы ЭПР растворов БСА, обработанных ДНКЖ с фосфатом (спектр 1); обработанных $\text{Fe}^{2+} + \text{NO}$ (спектр 2); после добавления цистеина к препарату 1 (спектр 3); после вычитания сигнала ЭПР М-ДНКЖ с цистеином (спектр 7) из спектра 3 (спектр 4); после осаждения белка сульфатом аммония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

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



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

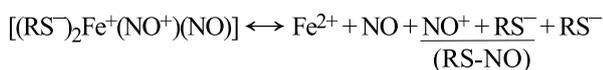


Схема 5. Химическое равновесие между М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и составляющими их компонентами.

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

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

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

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

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

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

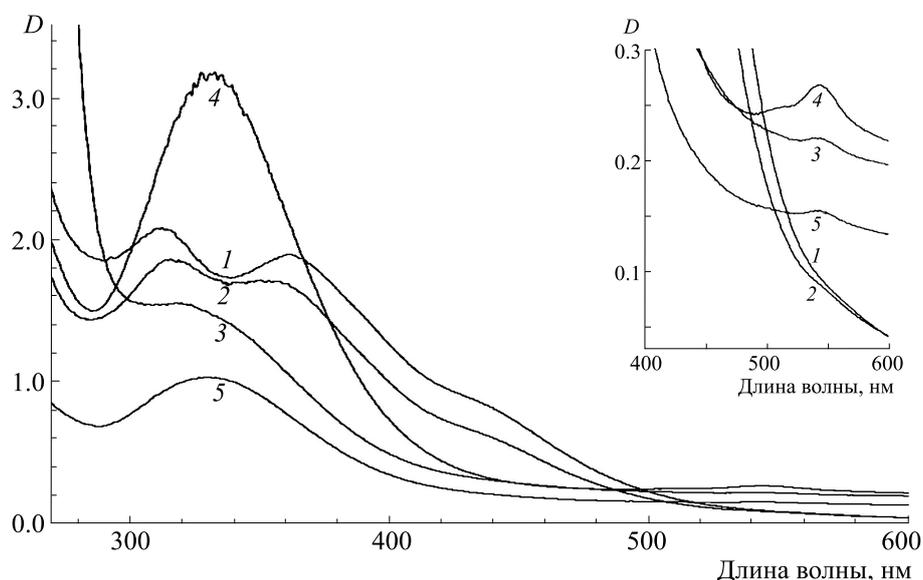


Рис. 3. Спектры поглощения 1 мМ растворов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношениях концентраций NAC и Fe^{2+} , равных 2 : 1 (кривая 1) или 1.5 : 1 (кривая 2). Кривые 3 и 4 — соответственно спектры поглощения тех же комплексов, подвергнутых нагреванию при 80°C в анаэробных условиях в течение 8–9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

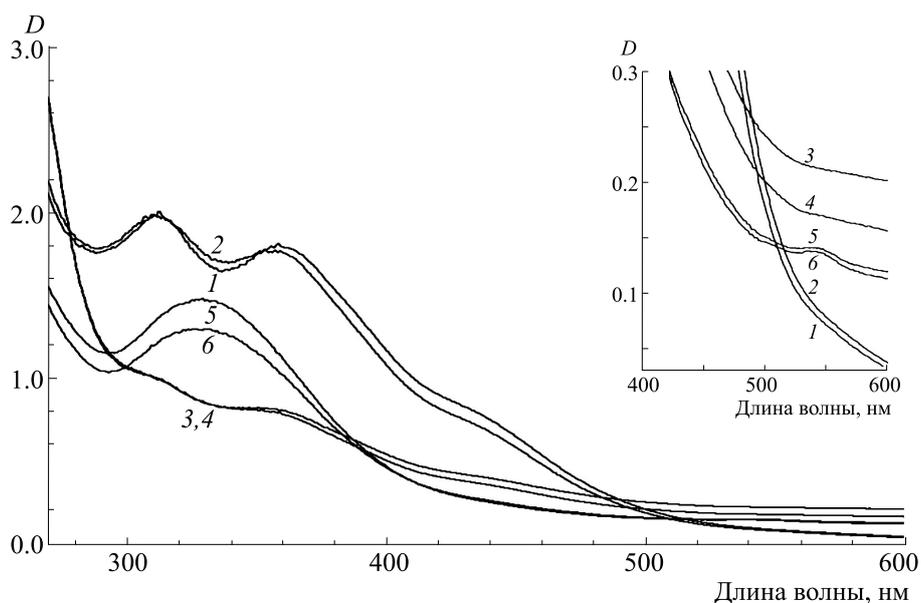


Рис. 4. Спектры поглощения растворов Б-ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином, синтезированных при соотношениях концентраций НАС и Fe^{2+} , равных 3 : 1 (кривая 1) или 1.5 : 1 (кривая 2). Кривые 3, 4 и 5, 6 – соответственно спектры поглощения тех же комплексов, разбавленных в два раза [13, 14].

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

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

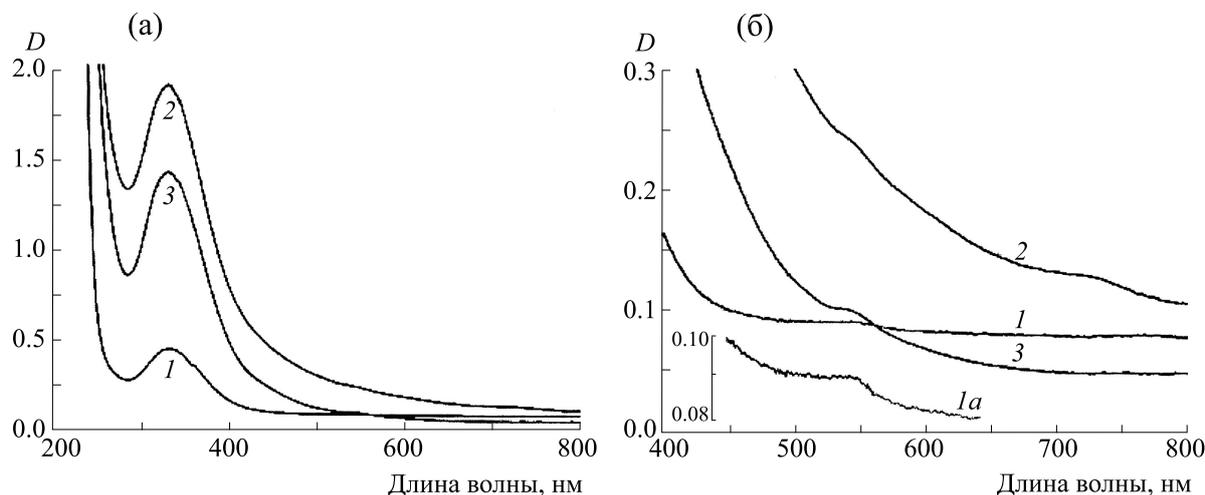


Рис. 5. Образование нитроглютамина как индикатора превращения оксида азота в анионы нитрита, появляющегося при распаде М-ДНКЖ с молекулами воды. Эти М-ДНКЖ были синтезированы обработкой газообразным NO 30 мМ растворов НЕРЕС-буфера (pH 7.0) с последующим добавлением к ним 20 мМ Fe^{2+} (кривые 2 и 3),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

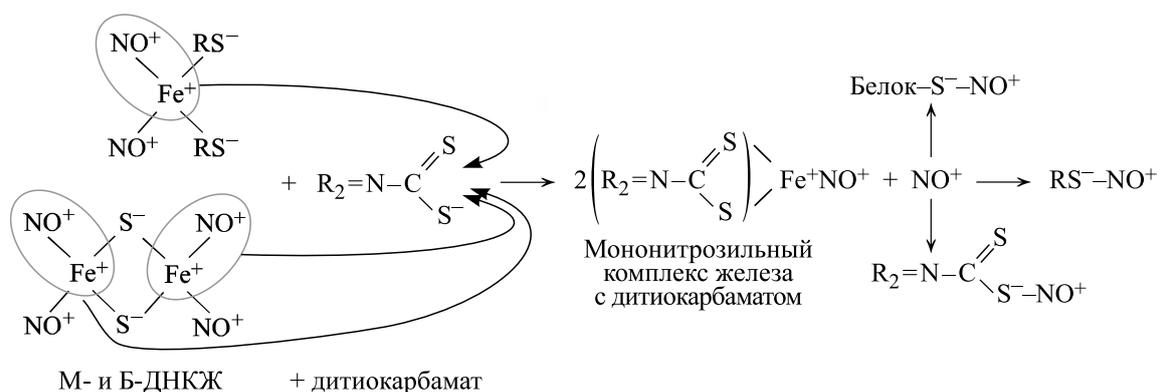


Рис. 6. Механизм превращения Б- и М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с ДЭТК или МГД. Высвобождающиеся при этом катионы нитрозония могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе ДЭТК или МГД [26–28].

при обработке газообразным NO 20 мМ растворах Fe²⁺ в дистиллированной воде. Эти комплексы полностью распадались в течение 20–30 мин после откачки NO, о чем свидетельствовало исчезновение зеленой окраски раствора и образование выпадающих в осадок гидроокисных комплексов железа. Последующее добавление в этот раствор избытка глутатиона, приводившее к подкислению раствора до pH 1–2, сопровождалось появлением оптического поглощения раствора на 334 нм, характерного для нитрозоглутатиона. Образование последнего, очевидно, было обусловлено связыванием глутатиона с катионами нитрозония, возникавших в качестве компонентов азотистой кислоты, образующейся в результате гидролиза анионов нитрита.

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

Как было нами показано, при обработке ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами производными дитиокарбамата – диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) или N-метил-D-глюкаминдитиокарбаматом (МГД) эти агенты перехватывают на себя железо-мононитрозильную [Fe²⁺-NO] группу из железо-динитрозильных [Fe²⁺(NO⁺)(NO)] фрагментов ДНКЖ с образованием сравнительно стойких (не оказывающих биологического действия на клетки и ткани) МНКЖ с ДЭТК или МГД, сопровождающимся, как показано на рис. 6, высвобождением в раствор катионов нитрозония [26–28].

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

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

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

Могли ли молекулы NO и ионы железа, входящие в состав ДНКЖ, оказывать цитотоксическое действие, сопоставимое с цитотоксической активностью катионов нитрозония – на этот вопрос ответ отрицательный. Как было показано в работе [29], оценка цитотоксического действия молекул NO и катионов нитрозония в экспериментах на культуре клеток фибробластов Swiss 3T3 показала, что величина 50%-го цитотоксического действия (IC₅₀) для катионов составила 0.02 мМ против 1.0 мМ для молекул NO. Если же учесть, что в наших опытах на клетках MCF-7 при их обработке смесью Б-ДНКЖ-МС (0.5 мМ) + МГД (1.0 мМ) (рис. 7б) оба эти агента полностью тра-

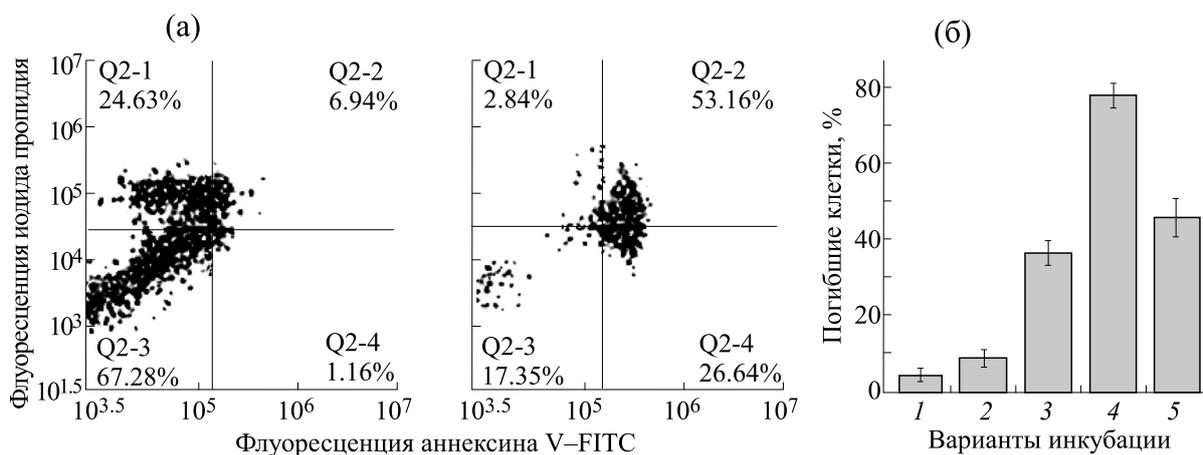


Рис. 7. Гибель клеток MCF-7 при их обработке М-ДНКЖ-МС (0.5 мМ) и МГД (1.0 мМ) (по окрашиванию смеси «аннексин + йодид пропидия»). (а) – 2D-диаграммы, полученные методом флоуцитометрии клеточной культуры. Клетки инкубировали или только с Б-ДНКЖ-МС или со смесью Б-ДНКЖ-МС + МГД. (б) – Гибель клеток в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

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

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

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

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

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

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

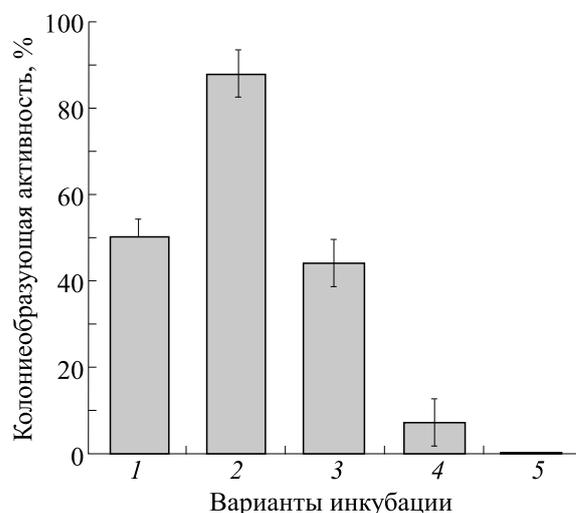


Рис. 8. Влияние на колониеобразующую активность бактерий *E. coli* TN530 добавления ДЭТК (2.5 мМ, столбик 1), В-DNIC-GSH (0.5 мМ, столбик 2), суммарного действия ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH при отсутствии взаимодействия между Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК (столбик 3), при одновременном введении в культуру Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК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

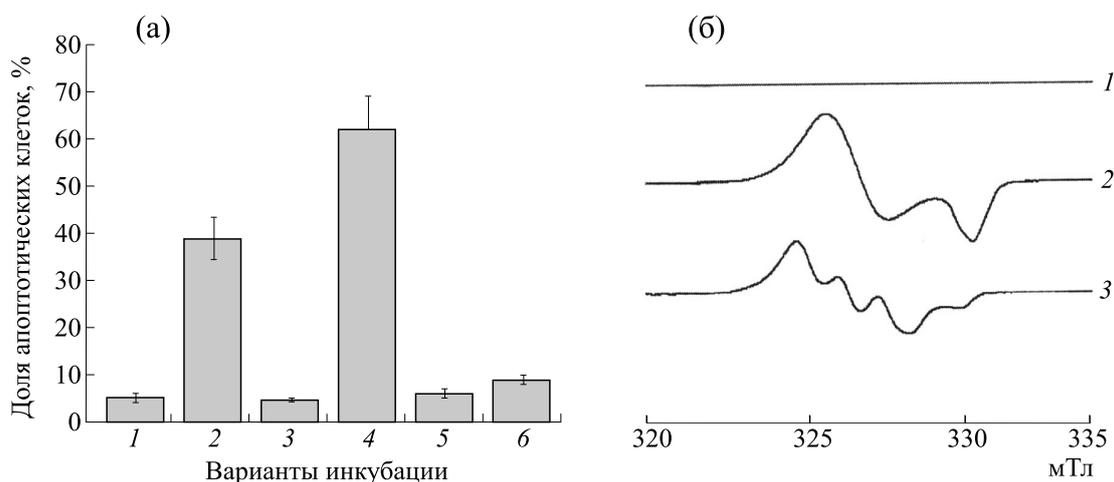


Рис. 9. (а) – Доля (в %) клеток Jurkat в состоянии апоптоза в контроле (столбик 1), после обработки М-ДНКЖ-ТС (столбик 2), М-ДНКЖ+GSH (столбик 3), М-ДНКЖ-ТС + МГД (столбик 4), МГД (столбик 5) и Fe-ТС (столбик 6). (б) – трансформация сигнала ЭПР (сигнал 2), регистрируемого в культуре клеток Jurkat после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

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

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

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

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

A.F. Vanin

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

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

Keywords: nitrosonium cations, dinitrosyl iron complexes, nitric oxide