

ЦИТОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОМ НА КЛЕТКИ *Escherichia coli* ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ КАТИОНАМИ НИТРОЗОНИЯ, ВЫСВОБОЖДАЮЩИМИСЯ ИЗ ЭТИХ КОМПЛЕКСОВ

© 2022 г. А.Ф. Ванин*, #, В.И. Телегина**, В.Д. Микоян*, Н.А. Ткачев*, С.В. Васильева**

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

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

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

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 15.07.2022 г.

Продemonстрировано бактериостатическое действие биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* TN300, определявшееся по колоние-образующей активности этих клеток. Бактериостатическое действие, инициированное этими комплексами, резко усиливалось в присутствии диэтилдитиокарбамата. Предполагается, что этот эффект был обусловлен повышением количества катионов нитрозония (NO^+), высвобождавшихся из комплексов в результате их распада под действием диэтилдитиокарбамата. Аналогичный результат был получен на клетках *E. coli* при их обработке диэтилдитиокарбаматом через 40 мин после контакта клеток с нитритом натрия или S-нитрозоглутатионом. При этом уровень динитрозильных комплексов железа, появившихся в бактериальных клетках под действием нитрита или S-нитрозоглутатиона, был таким же, как и при обработке клеток комплексами с глутатионом. Что касается бактериостатического эффекта молекул NO, выделявшегося из нитрита или S-нитрозоглутатиона при их кратковременном контакте с бактериями, в дозовом отношении он был на порядок ниже бактериостатического действия NO^+ . Отсюда следует, что именно катионы нитрозония, высвобождающиеся из динитрозильных комплексов железа, были ответственны за обнаруженное бактериостатическое действие этих комплексов на клетки *E. coli*.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, оксид азота, катион нитрозония, S-нитрозоглутатион, бактериостатическое действие, клетки *Escherichia coli*.

DOI: 10.31857/S0006302922050106, EDN: JIRKIZ

В соответствии с современными представлениями в качестве основного эффектора иммунологической защиты в организме животных и человека при бактериальной инфекции выступает система эндогенного оксида азота (NO), продуцируемого ферментативным путем из L-аргинина [1–4]. Однако до сих пор остается нерешенным вопрос, какой из компонентов этой системы — NO или продукт его одноэлектронного окисления ка-

тион нитрозония (NO^+) — ответственен за подавление пролиферации бактерий в организме животных и человека, обусловленной соответственно превращением молекул NO в пероксинитрит, характеризующийся высокой цитотоксической активностью [3–6] или способностью NO^+ S-нитрозировать различные жизненно важные белки [3, 4, 7–9], и тем самым подавлять их активность.

Цель настоящей работы состояла в попытке ответить на этот вопрос в экспериментах на клетках *Escherichia coli* с использованием в качестве доноров NO and NO^+ динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). Как было показано в работах [10–12], появление этих агентов в ДНКЖ определяется механизмом их образования, определяемым реакцией диспропорционирования молекул NO, попарно связывающихся с ионом двухва-

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ — мооядерная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ — биядерная форма динитрозильных комплексов железа, МНКЖ — мононитрозильные комплексы железа, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, МГД — N-метил-D,L-глуксаминдитиокарбамат, GSH — глутатион, Б-ДНКЖ-GSH — биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, GS-NO — S-нитрозоглутатион, КОА — колониеобразующая активность, СТС — сверхтонкая структура.

лентного железа в присутствии тиолсодержащих (RS^-) лигандов, как это показано на схеме 1. В соответствии с этой схемой появляющийся в ходе диспропорционирования молекул NO анион нитроксила (NO^-) гидролизуется, т. е. протонируется и выходит в форме молекулы нитроксила (HNO) из лигандного окружения железа с последующей трансформацией двух молекул HNO в закись азота (N_2O) и воду. Освободившееся место у иона железа занимает третья молекула NO, что и приводит к образованию моноядерной формы ДНКЖ (М-ДНКЖ), характеризующейся в соответствии со схемой 1 резонансной структурой

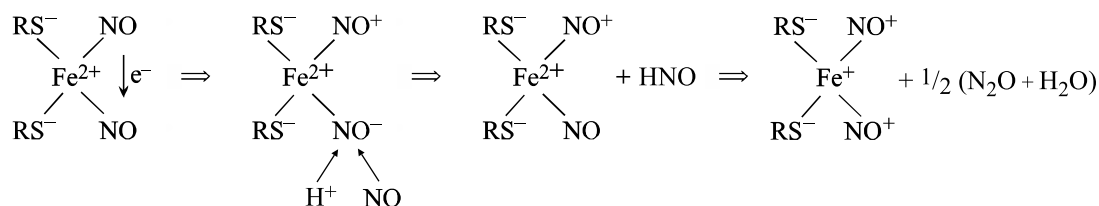


Схема 1. Механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции $Fe^{2+} + NO + RS^-$ [10–12].

Как показано в работах [10–13], приведенные выше резонансные структуры для М-ДНКЖ характерны и для биядерной формы ДНКЖ (Б-ДНКЖ) — $[(RS^-)_2Fe_2^{2+}(NO^+)_2(NO)_2]$ или $[(RS^-)_2Fe_2^{2+}(NO^+)_4]$.

Согласно данным, приводимым в работах [11, 12], катионы нитрозония, также, как и молекулы NO, могут высвобождаться из ДНКЖ, причем в равном количестве, в ходе установлении химического равновесия между этими комплексами и их компонентами, а также при необратимом распаде последних, обусловленным удалением из ДНКЖ

$[(RS^-)_2Fe^+(NO^+)_2]$ или $[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO^+)(NO)]$. Что касается возможного гидролиза катиона нитрозония, появляющегося в ДНКЖ в результате диспропорционирования молекул NO, его взаимодействие с анионом гидроксила, которое приводило бы к трансформации NO^+ в азотистую кислоту или нитрит, блокируется в результате нейтрализации положительного заряда на этом нитрозильном лиганде электронной плотностью, поступающей на него от атомов тиоловой серы тиолсодержащих лигандов, характеризующихся высокой π -донорной активностью.

железа или тиолсодержащих лигандов. Среди агентов, вызывающих распад этих комплексов, особое место занимают производные дитиокарбамата (формула $R_2=N-CS_2$). Этим соединения способны перехватывать на себя железомононитрозильную группу $[Fe^{2+}-NO]$ из железодинитрозильных фрагментов $[Fe^{2+}-(NO)(NO^+)]$ ДНКЖ с последующим образованием стабильных, ЭПР-детектируемых мононитрозильных комплексов (МНКЖ) с производными дитиокарбамата, как это показано на схеме 2 [14–16].

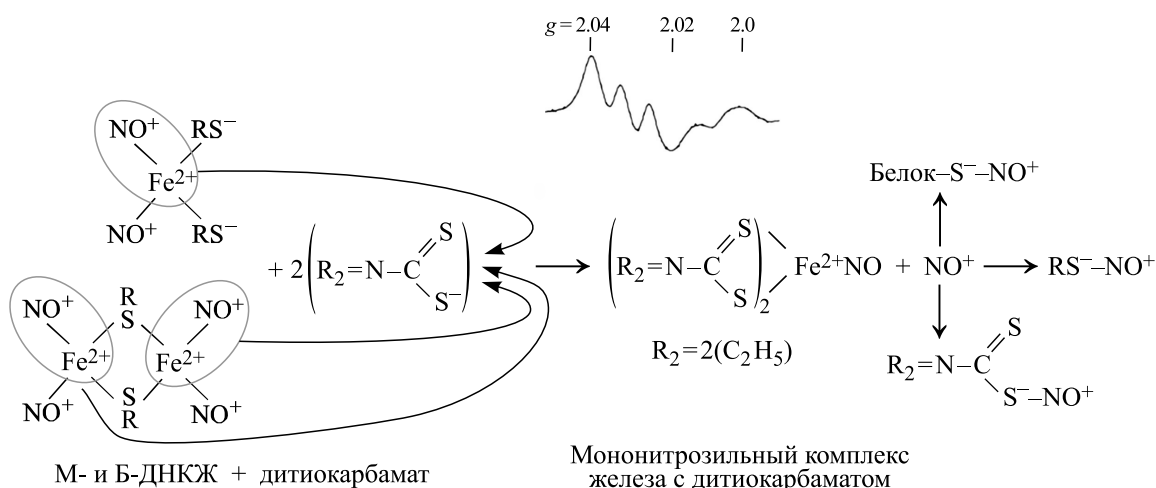


Схема 2. Механизм превращения Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с ДЭТК или МГД. Высвобождающиеся при этом катионы нитрозония могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе ДЭТК или МГД. На врезке сверху приводится зарегистрированный при 77 К ЭПР-сигнал со значениями g-фактора 2.04 и 2.02 и триплетной сверхтонкой структурой, характерный для МНКЖ с производными дитиокарбамата.

Ранее такого рода трансформация ДНКЖ под действием производных дитиокарбамата — диэтилдитиокарбамата (ДЭТК) и N-метил-D,L-глуксаминдитиокарбамата (МГД) в живых организмах была продемонстрирована нашей группой [15, 16].

Было показано, что в клетках и тканях образующиеся в ходе этой трансформации МНКЖ-ДЭТК или МНКЖ-МГД жестко связывают нейтральные молекулы NO, предотвращая тем самым действие этих молекул, исходно входивших в ДНКЖ, на их биологические мишени. В результате молекулы NO «выходят из игры». Что касается катионов нитрозония, в соответствии со схемой 2 они высвобождаются из распадающихся ДНКЖ в свободной форме с последующим связыванием с различными тиолами. Как было показано в работах [17, 18], взаимодействие этих катионов именно с тиолами, приводящее к образованию S-нитрозотиллов, а не с анионами гидроксила, приводящее к гидролизу этих катионов, определяется существенно большим сродством катионов нитрозония к тиолам.

Предполагается, что происходящее при этом S-нитрозирование разнообразных тиолсодержащих белков могло обеспечивать цитотоксическое действие ДНКЖ [19–24]. Такого рода действие Б-ДНКЖ с меркаптосукциноматом наблюдалось нами также на культуре опухолевых клеток MCF7, оно резко усиливалось в присутствии МГД, повышавшего уровень катионов, высвобождавшихся из Б-ДНКЖ [25].

Цель настоящей работы состояла в детальном изучении вклада ДЭТК в антибактериальное (бактериостатическое) действие Б-ДНКЖ с глутатионом (GSH) на бактерии *Escherichia coli* с тем, чтобы определить какой из компонентов этих комплексов — молекулы NO или катионы нитрозония — способны подавлять размножение этих клеток (их колониеобразующую активность).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Были использованы сульфат железа (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, нитрит натрия и диэтилдитиокарбамат натрия (Sigma, США). Газообразный NO получали в реакции сульфата железа с нитритом натрия в 0.1 М HCl с последующей очисткой методом низкотемпературной сублимации в вакууме [13].

Синтез биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и S-нитрозоглутатиона. Биядерные комплексы железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) синтезировали обработкой растворов сульфата железа и GSH газообразным NO при молярном соотношении Fe^{2+} : GSH, равном 1 : 2, и давлении NO 100–150 мм рт. ст. После размешивания 0.5 мл раствора сульфата железа в дистиллированной воде (pH 5.5) и 4.5 мл раствора

GSH в 15 mM HEPES-буфере при pH 8.0 соответственно в верхней и нижней частях аппарата Тунберга с последующей откачкой воздуха из аппарата в него вводили NO. Затем после 5 мин встряхивания аппарата, растворы железа и GSH смешивали в атмосфере NO, снова встряхивали 5–10 мин, что было достаточно для образования Б-ДНКЖ-GSH, после чего из аппарата откачивали NO и определяли по интенсивности полос поглощения на 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции, соответственно равными $\epsilon = 4600$ и $3700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ), концентрацию полученного комплекса [13].

Синтез S-нитрозоглутатиона (GS-NO), основанный на способности азотистой кислоты (HNO_2), возникающей при протонировании нитрита в кислой среде, инициировать S-нитрозирование тиолов, проводили следующим образом. 11 mM раствор GSH смешивали на воздухе с 10 mM раствором нитрита натрия с последующим подкислением исходно нейтрального раствора до pH 2–3, что сразу же приводило к розовому окрашиванию раствора. Через полтора часа pH раствора повышали до нейтральных значений. Концентрацию полученного таким образом GS-NO оценивали по интенсивности его полосы поглощения на 334 нм с $\epsilon = 980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Эксперименты на бактериальных клетках. В экспериментах на бактериальных клетках *Escherichia coli* TN530 их выживаемость оценивали по величине колониеобразующей активности (КОА) (в % по отношению к той же величине для необработанных, контрольных клеток). Суспензию клеток выращивали на жидкой среде LB при 37°C в течение 18 ч. Затем аликвоту разбавляли той же средой в соотношении 1 : 50 и выращивали в ней клетки 3 ч до экспоненциальной стадии — до титра $(3–5) \cdot 10^8$ кл/мл, соответствовавшего стандартному (контрольному) образцу. Изучение влияния Б-ДНКЖ-GSH, нитрита натрия и GS-NO на бактериальные клетки проводили следующим образом: 1) определялась дозовая зависимость бактериостатического действия этих агентов по отделимости; 2) и 3) определялось влияние ДЭТК на бактеростатическое действие указанных агентов при одновременном введении в клеточную культуру ДЭТК и каждого из этих агентов или при введении ДЭТК через 40 мин после контакта клеток с Б-ДНКЖ-GSH, нитритом натрия и GS-NO. В первом случае 1 мл Б-ДНКЖ-GSH, нитрита натрия или GS-NO в возрастающей концентрации добавляли в кювету с 1 мл клеток. Смесь инкубировали в течение 30 мин, а затем инокулировали на агаре с разбавлением 1 : 10 с последующим инкубированием на нем в течение 24 ч при 37°C и последующим (для оценки бактериостатической активности Б-ДНКЖ-GSH, нитрита натрия или GS-NO) подсчетом колоний — величины КОА

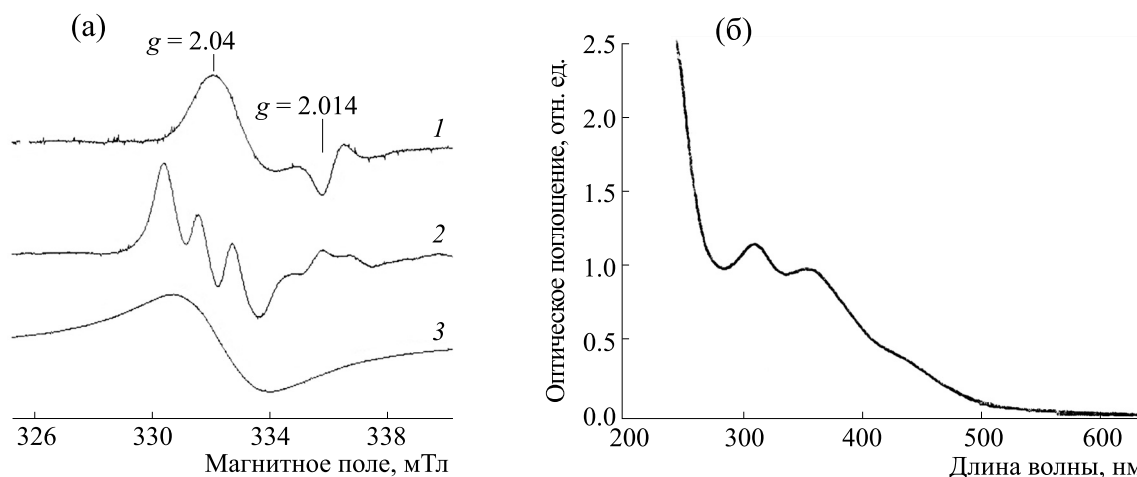


Рис. 1. (а) — Сигналы ЭПР М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (спектр 1) и МНКЖ-ДЭТК, зарегистрированные для последних в гидрофобной (спектр 2) или водной (спектр 3) средах. Запись при 77 К. (б) — Спектр оптического поглощения Б-ДНКЖ-GSH.

в % (1 клетка = 1 колония). Таким же образом изучали влияние ДЭТК (2.5 мМ) на бактериостатическое действие на бактерии Б-ДНКЖ-GSH, нитрита натрия или GS-NO (в концентрации 0.5 мМ) при одновременном введении с ними ДЭТК или через 40 мин после них.

Оптические и ЭПР-измерения. Оптические измерения растворов Б-ДНКЖ-GSH проводили на спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu Europa GmbH, Германия) в плоских кварцевых кюветах с оптическим путем 10 мм при комнатной температуре на воздухе. ЭПР-спектры М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (GSH и клеточными тиолсодержащими белками), а также ЭПР-спектры МНКЖ-ДЭТК, возникавших в бактериальной культуре, регистрировали при 77 К в кварцевом сосуде Дьюара с жидким азотом на модифицированном радиоспектрометре RadioPan (Польша) при СВЧ мощности 5 мВт и амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля, равной 0.2 мТл. Концентрацию ЭПР-активных парамагнитных центров оценивали методом двойного интегрирования их сигналов ЭПР, используя в качестве стандарта М-ДНКЖ-GSH с известной концентрацией. Часть ЭПР-измерений проводилась при комнатной температуре с использованием кварцевых капилляров диаметром 1 мм, в которые помещали исследуемые растворы.

Статистическая обработка результатов. Каждый результат оценивался как среднее трех независимых измерений $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические характеристики Б-ДНКЖ-GSH и МНКЖ-ДЭТК. В противоположность М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, характе-

ризующимися сигналом ЭПР с $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$ ($g_{\text{ср}} = 2.03$), называемым сигналом 2.03 [26] и приведенным на рис. 1а, Б-ДНКЖ-GSH диамагнитны и, следовательно, ЭПР-недетектируемые. Как указывалось выше, их концентрация могла определяться по интенсивности их полос оптического поглощения на 310 и 360 нм в спектре, приводимом на рис. 1б.

Что касается сигнала ЭПР МНКЖ-ДЭТК, то, будучи растворимыми в гидрофобных средах, например, в клеточных мембранах, эти комплексы, в соответствии с результатами предыдущих публикаций [15, 16], характеризовались сигналом ЭПР, приведенным на рис. 1а (со средним значением g -фактора 2.04 и разрешенной триплетной сверхтонкой структурой (СТС)). Если же эти комплексы локализовались в водной среде, где они были слабо растворимыми, триплетная СТС в их сигнале «смазывалась», в результате чего сигнал трансформировался в бесструктурный симметричный синглет с центром при $g = 2.04$, приведенный на рис. 1а.

Антибактериальное (бактериостатическое) действие Б-ДНКЖ-GSH на клетки *E. coli*. Как следует из рис. 2, клетки *E. coli* оказались достаточно устойчивыми к бактериостатическому действию на них Б-ДНКЖ-GSH. 50%-я величина КОА достигалась лишь при ~5 мМ концентрации этих комплексов. Более того, при их низких концентрациях (0.03–0.1 мМ) способность клеток к размножению даже повышалась: КОА возрастала по сравнению с контролем до 120%. Аналогичный эффект обнаруживался и в опытах с обработкой клеток ДЭТК.

Как указывалось выше, влияние ДЭТК на бактериостатическое действие Б-ДНКЖ-GSH было изучено при их концентрациях соответственно

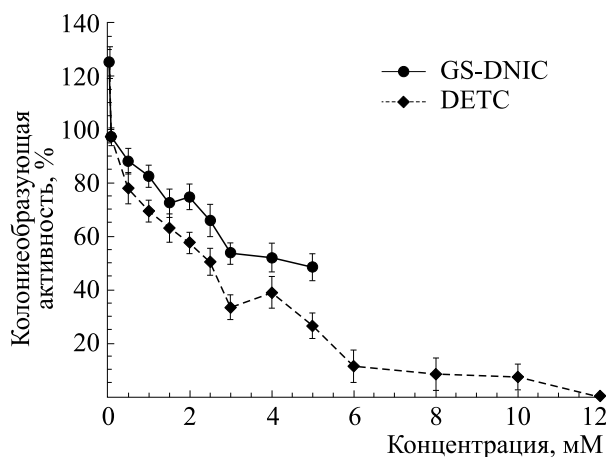


Рис. 2. Дозовая зависимость влияния Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК на колониобразующую активность клеток *E. coli* TN530.

2.5 и 0.5 мМ, для которых, согласно дозовым кривым, приведенным на рис. 2, величины КОА оказались равными $50 \pm 5\%$ и $88 \pm 5\%$. В соответствии с этими величинами, если бы Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК действовали на клетки одновременно, не влияя на состояние друг от друга, то, согласно теории независимых вероятностных процессов, их суммарное действие определялось бы 44%-й величиной КОА (рис. 3, колонка 3). В реальности же при одновременном контакте клеток с ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH эта величина снижалась до $7 \pm 5\%$ (рис. 3, колонка 4). Если же ДЭТК добавляли к клеткам через 40 мин после введения Б-ДНКЖ-GSH, клетки полностью прекращали размножаться — величина КОА снижалась до нулевого уровня (рис. 3, колонка 5).

В соответствии с данными, приводимыми во «Введении», столь резкое усиление бактериостатического действия Б-ДНКЖ-GSH под влиянием ДЭТК могло быть обусловлено распадом Б-ДНКЖ-GSH, сопровождающимся, согласно схеме 2, образованием ЭПР-активных МНКЖ-ДЭТК и высвобождением из Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония, которые и могли оказывать на бактериальные клетки негативное действие. ЭПР-измерения клеточной массы полностью подтвердили это предположение. Вместо сигнала ЭПР с $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$ ($g_{\text{ср}} = 2.03$), характерного для МНКЖ с тиолсодержащими лигандами (сигнала 2.03), регистрируемого при 77 К в клетках, обработанных только Б-ДНКЖ-GSH и приведенного на рис. 1а, при одновременном введении ДЭТК в клетках регистрировался бесструктурный синглетный сигнал ЭПР, приведенный на рис. 1а и характерный для МНКЖ-ДЭТК, локализованного в водной среде, очевидно, в межклеточной жидкости.

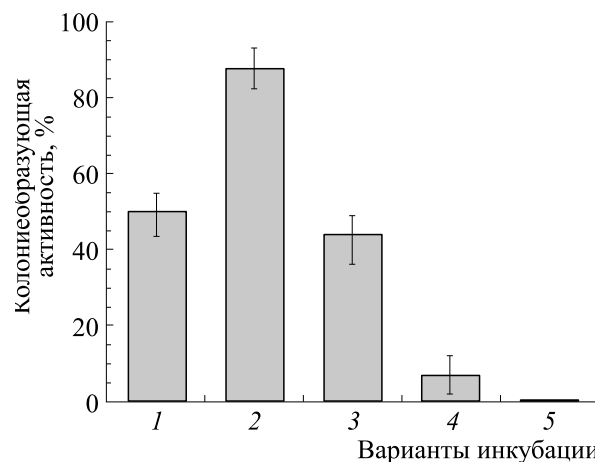


Рис. 3. Влияние на колониобразующую активность бактерий *E. coli* TN530 добавления к ним ДЭТК (2.5 мМ, колонка 1), Б-ДНКЖ-GSH (0.5 мМ, колонка 2), предполагаемого суммарного действия ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH при отсутствии взаимодействия между ними (колонка 3), при одновременном введении в клеточную культуру Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК (колонка 4), при введении ДЭТК через 40 мин после введения Б-ДНКЖ-GSH (колонка 5).

Если же ДЭТК вводили через 40 мин после Б-ДНКЖ-GSH, то в клеточной культуре при 77 К регистрировался сигнал ЭПР с триплетной СТС, приведенный на рис. 1а, характерный для МНКЖ-ДЭТК, локализованного в гидрофобной среде, очевидно, в клеточных мембранах. Этот сигнал регистрировался вместо ЭПР-сигнала 2.03, приведенного на рис. 1а и наблюдавшегося в клетках к этому времени перед добавлением ДЭТК.

Таким образом есть все основания утверждать, что резкое усиление бактериостатического действия Б-ДНКЖ-GSH при одновременном введении с ним ДЭТК было обусловлено катионами нитрозония, высвобождавшимися из Б-ДНКЖ-GSH. Что касается молекул NO, исходно входивших в состав этих комплексов, они включались в устойчивые МНКЖ-ДЭТК, и как сказано выше, «выходили из игры», т.е. не могли оказывать на клетки никакого действия.

Сигнал 2.03, характерный для М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, не обнаруживался в клетках, не обработанных Б-ДНКЖ-GSH. Не обнаруживался в этих клетках после их обработки ДЭТК и сигнал ЭПР, характерный для МНКЖ-ДЭТК.

Бактериостатическое действие на клетки *E. coli* нитрита натрия (NaNO_2) и S-нитрозоглутатиона. Устойчивость клеток *E. coli* к бактериостатическому действию NaNO_2 и GS-NO в дозовом отношении (рис. 4) оказалась примерно такой же, как и для Б-ДНКЖ-GSH — для всех них 50%-я вели-

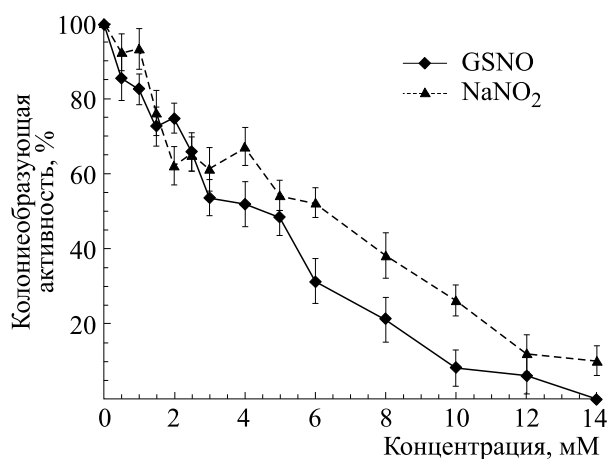


Рис. 4. Дозовая зависимость бактериостатического действия нитрита натрия и GS-NO на клетки *E. coli* TN530.

чина КОА достигалась при ~5 мМ концентрации этих соединений.

Это совпадение могло определяться тем, что уже через 40 мин инкубации клеток в 0.5 мМ NaNO₂ или GS-NO в них, судя по появлению сигнала 2.03, возникали М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, причем в концентрации, примерно равной концентрации этих комплексов в бактериальных клетках, обработанных 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH. Этот результат полностью согласуется с предыдущими результатами нашей группы [12, 16], а также данными других авторов [27–29] о появлении в микроорганизмах, клетках и тканях животных как М-, так и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при контакте указанных биообъектов с нитритом или S-нитрозотиолами, очевидно, в результате поступления в них газообразного NO, высвобождавшегося из этих соединений. При снижении времени контакта бактериальных клеток с 0.5 мМ NaNO₂ или GS-NO до 3–5 мин образование заметного количества ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами не обнаруживалось.

Что касается стимулирующего влияния ДЭТК на бактериостатическое действие 0.5 мМ NaNO₂ или GS-NO, в отличие от аналогичных опытов с Б-ДНКЖ-GSH, оно обнаруживалось при добавлении ДЭТК только через 40 мин после введения NaNO₂ и GS-NO и не имело места при одновременном введении ДЭТК и этих агентов (рис. 5, соответственно колонки 8, 9 и 6, 7).

При этом, судя по приводимым ниже результатам ЭПР-анализа, в первом случае МНКЖ-ДЭТК возникали в результате взаимодействия ДЭТК с М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ, возникавшими до этого в присутствии NaNO₂ или GS-NO. МНКЖ-ДЭТК возникали в клеточной культуре и во вто-

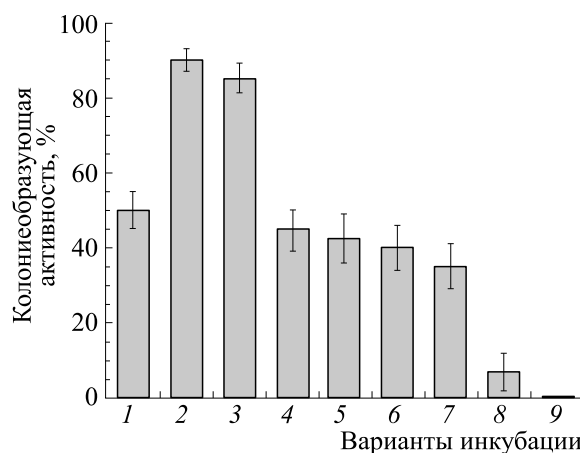


Рис. 5. Влияние на колониеобразующую активность клеток *E. coli* TN530 2.5 мМ ДЭТК (колонка 1), 0.5 мМ NaNO₂ или GS-NO (колонки 2 и 3), предполагаемого суммарного действия 2.5 мМ ДЭТК и 0.5 мМ NaNO₂ или 0.5 мМ GS-NO при отсутствии взаимодействия между ними (колонки 4 и 5), при одновременном введении в клеточную культуру 2.5 мМ ДЭТК и 0.5 мМ NaNO₂ или 0.5 мМ GS-NO (колонки 6 и 7), при введении 2.5 мМ ДЭТК через 40 мин после введения 0.5 мМ NaNO₂ или 0.5 мМ GS-NO (колонки 8 и 9).

ром случае, но не при участии ДНКЖ, а при участии главным образом NO, происходившего из NaNO₂ или GS-NO и железа, включавшегося в образование МНКЖ-ДЭТК из инкубационной среды и из бактерий.

Образование МНКЖ-ДЭТК не из М-ДНКЖ и Д-ДНКЖ, а в реакции ДЭТК с NO и примесным железом не могло приводить к появлению в клеточной культуре катионов нитрозония, что, очевидно, и вело к тому, что при одновременном добавлении к клеткам ДЭТК, NaNO₂ или GS-NO не наблюдалось заметное влияние ДЭТК на бактериостатическое действие нитрита и GS-NO.

Результаты ЭПР-измерений, которые позволили нам сделать этот вывод, состояли в следующем. При обработке бактериальных клеток ДЭТК через 40 мин после их контакта с NaNO₂ или GS-NO в клетках при 77 К регистрировался сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК с триплетной СТС, приведенный на рис. 1а. Это означает, что комплексы возникали при взаимодействии с ДНКЖ, возникшими в клетках, в гидрофобных компартментах которых локализовались растворяющиеся в них МНКЖ-ДЭТК. Этот процесс и приводил к появлению в клетках катионов нитрозония, подавлявших размножение этих клеток. При одновременной обработке клеток ДЭТК, NaNO₂ или GS-NO в клеточной культуре при 77 К регистрировался бесструктурный симметричный сигнал МНКЖ-ДЭТК, приведенный на рис. 1в, что сви-

детельствовало о локализации этих комплексов не в клетках, а в водной межклеточной среде, характеризующейся слабой растворимостью в ней МНКЖ-ДЭТК. Отсюда следует, что эти комплексы возникали не в реакции ДЭТК с ДНКЖ, которые могли бы возникать в клетках, а в межклеточной среде в реакции ДЭТК с NO, образующимся из NaNO_2 или GS-NO, и ионами Fe^{2+} , которые могли поступать из среды инкубации или из самих клеток. Очевидно, что этот процесс не мог приводить к появлению в межклеточной среде катионов нитрозония.

Последнее полностью согласуется с результатами измерений КОА клеток при одновременном их контакте с ДЭТК, NaNO_2 или GS-NO (рис. 5, колонки 6 и 7). Величины КОА составляли соответственно 40 ± 5 и $35 \pm 5\%$, что было сопоставимо с рассчитанными величинами КОА, при одновременном (суммарном), независимом друг от друга действии ДЭТК, нитрита натрия или GS-NO на бактериальные клетки (рис. 5, колонки 4 и 5).

Концентрации ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и МНКЖ-ДЭТК в клеточной суспензии. Сигнал ЭПР М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (сигнал 2.03), превращающийся в более интенсивный сигнал ЭПР с триплетной СТС МНКЖ-ДЭТК, мы зарегистрировали в клетках *E. coli* после их обработки сначала газообразным NO при давлении 100 торр в течение 15 мин в соответствии с работой [13], а затем ДЭТК. Судя по интенсивности сигнала ЭПР М-ДНКЖ, появлявшихся в клетках при их обработке NO, их концентрация в клеточной суспензии составляла 2.0 ± 0.5 мкМ и была практически такой же, как и концентрация тех же комплексов, возникавших в той же суспензии при введении в нее на 40 мин 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH, NaNO_2 или GS-NO — соответственно 1.5 ± 0.5 , 1.5 ± 0.5 и 2.5 ± 0.5 мкМ. При последующем введении в эти суспензии ДЭТК (2.5 мМ), концентрация образующихся МНКЖ-ДЭТК достигала соответственно 4.0 ± 0.5 , 5.0 ± 0.5 и 5.0 ± 0.5 мкМ, тогда как в клетках, предварительно обработанных газообразным NO, концентрация этих комплексов составляла 6.5 ± 0.5 мкМ. Согласно результатам наших работ [15, 16], более высокий уровень МНКЖ-ДЭТК по сравнению М-ДНКЖ объясняется включением в реакцию с ДЭТК биядерных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, образующихся в клетках в более высоком количестве по сравнению с их мономерными аналогами.

Образование в бактериальных клетках М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ при их обработке как газообразным NO, так и его донорами примерно в одинаковой концентрации могло быть обусловлено лимитирующим влиянием на синтез этих комплексов одного из компонентов ДНКЖ. Поскольку при таком синтезе ни уровень газообраз-

ного NO, ни избыток железа (соответственно в экспериментах с обработкой клеток газообразным NO или Б-ДНКЖ-GSH) не влияли на концентрацию образующихся ДНКЖ, есть основание утверждать, что лимитирующим фактором в образовании этих комплексов могли выступать клеточные тиолсодержащие соединения (преимущественно тиолсодержащие белки).

Что касается уровня МНКЖ-ДЭТК, возникавших в клетках после их одновременной обработки ДЭТК (2.5 мМ) и 0.5 мМ NaNO_2 или GS-NO, он оказался равным 50 мкМ. Это означает, что количество NO, быстро возникавшего из нитрита или GS-NO и включавшегося в МНКЖ-ДЭТК было не ниже этой концентрации. Она оказалась существенно большей уровня М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с эндогенными тиолсодержащими лигандами, возникавших в клетках (~1.5 и 5 мкМ) через 40 мин их инкубации с нитритом или GS-NO. Соответственно и уровень высвобождавшихся из них катионов нитрозония был на том же низком уровне. Тем не менее, бактериостатический эффект, вызываемый NO (50 мкМ), возникавшего из нитрита и GS-NO (колонки 2 и 3 на рис. 5), был существенно ниже по сравнению с действием на клетки катионов NO^+ (1.5 - 5 мкМ), высвобождавшихся под действием ДЭТК из М- и Б-ДНКЖ, возникших в клетках через 40 мин их инкубации с нитритом или GS-NO (колонки 8 и 9 на рис. 5). Этот факт однозначно свидетельствует о более высокой бактериостатической активности этих катионов по сравнению с аналогичной активностью молекулярного NO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Главный результат проведенных нами исследований состоит в обнаружении резкого усиления бактериостатического (негативного) действия на бактерии *Escherichia coli* TN530 биядерных ДНКЖ-GSH под влиянием ДЭТК. Аналогичный результат был получен ранее в работе [30] и в нашей работе [25] в экспериментах на культурах опухолевых клеток соответственно Jurkat и MCF-7. В этих работах вместо ДЭТК использовали МГД, хорошо растворимое в воде производное дитиокарбамата, а вместо Б-ДНКЖ-GSH М-ДНКЖ — тиосульфат [30] или Б-ДНКЖ-меркаптосукцинат [25], вводившиеся в клеточные культуры одновременно с МГД. Результатом было резкое усиление гибели клеток по сравнению с аналогичным действием на клетки МГД, тиосульфата или меркаптосукцината при их добавлении в клеточные культуры по отдельности.

В вышеупомянутых работах [25, 30], как и в нашей настоящей работе, были использованы экзогенные, синтезированные химическим путем ДНКЖ. Между тем уже в первых наших публика-

циях в 1960-е годы, рассмотренных позже в монографиях А.Ф. Ванина [31, 32], и до настоящего времени было продемонстрировано образование в живых организмах и клеточных культурах эндогенных М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, возникавших в этих биообъектах при появлении NO из его эндогенных и экзогенных источников. Есть основание полагать, что эти эндогенные комплексы могут функционировать в качестве основных эффекторов Т-клеточного иммунитета. В пользу этого может говорить факт обнаружения в 1990-е годы М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в активированных макрофагах, эффективно продуцирующих NO при участии индуцибельной формы NO синтазы (iNOS) [33–36]. Эти комплексы могли переходить из макрофагов в сокультивируемые с ними опухолевые клетки с последующей гибелью этих клеток [34].

Поскольку ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, действительно, могут выступать в качестве доноров катионов нитрозония [10–12], и эти катионы могут, как мы показали в настоящей работе, подавлять размножение клеток *E. coli*, а также вызывать гибель опухолевых клеток [25, 30], не исключено, что способность иммунокомпетентных клеток подавлять размножение различных патогенных бактерий определяется образованием в них ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами как донорами катионов нитрозония. Цитотоксическое действие последних, как основных эффекторов системы Т клеточного иммунитета может определяться их способностью S-нитрозировать различные жизненно важные тиолсодержащие белки и ферменты [30].

Среди этих ферментов могут оказаться протеазы различных вирусов, включая коронавирусы SARS-CoV-2, так что не исключено, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут оказаться полезными при лечении ковида. Предположение об этом было сделано в работе [37] и подтверждено при испытании смеси Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в экспериментах на сирийских хомячках, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2 [38].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Данная работа не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. A. de Groote and F. C. Fang, Clin. Infection Dis., **21** (Suppl. 2), S162 (1995).
2. F. C. Fang, J. Clin. Invest., **99**, 2818 (1997).
3. J. L. Jones, J. G. Ganopoulos, A. Labbe, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., **88**, 401 (2010).
4. L. A. Bowman, S. McLean, R. K. Pool, et al., Adv. Microbiol. Physiol., **59**, 135 (2011).
5. H. Ischiropoulos and F. B. Al-Mehdi, FEBS Lett., **364**, 279 (1995).
6. M. J. Juedes, and G. N. Wogan, Mutat. Res., **349**, 51 (1996).
7. D. D. Schraier, J. S. Chouake, J. D. Nosanchuk, et al., Virulence, **3**, 271 (2012).
8. S. Spiro, FEMS Lett., **31**, 193 (2007).
9. D. Seth, D. T. Hess, A. Hausladen, et al., Mol. Cell, **69**, 451 (2018).
10. A. F. Vanin, Austin J. Anal. Pharmaceut. Chem., **5**, 1109 (2018).
11. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys., **77**, 279 (2019).
12. A. F. Vanin, Appl. Magn. Resonance, **50**, 851 (2020).
13. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **23**, 136 (2011).
14. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., (2013) Nitric Oxide Biol. Chem., **29**, 4 (2013).
15. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **62**, 1 (2017).
16. В. Д. Микоян, Е. Н. Бургова и А. Ф. Ванин, Биофизика, **65**, 1142 (2020).
17. D. A. Wink, R. W. Nims, J. F. Darbyshir, et al., Chem. Res. Toxicol., **7**, 519 (1994).
18. V. G. Kharitonov, A. R. Sandquist, and V. S. Sharma, J. Biol. Chem., **270**, 28158 (1995).
19. X. Cui, C. L. Joannou, M. N. Hughes, et al., FEBS Lett., **98**, 67 (1992).
20. K. Yoshida, T. Akaaki, K. Doi, et al., Infection and Immunity, **61**, 3552 (1993).
21. J. Green, M. D. Rolfe, and L. J. Smith, Virulence, **5**, 1 (2013).
22. J. R. Laver, S. McLean, A. H. Bowman, et al., Antioxid. Redox Signal., **18**, 309 (2013).
23. R. Grosser, A. Weiss, L. N. Shaw, et al., J. Bacteriol., **198**, 2043 (2016).
24. S. B. Wiegand, L. Traeger, H. R. Nguyen, et al., Redox Biol., **39**, 101826 (2021).
25. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys., **79**, 93 (2021).
26. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **2**, 224 (1998).
27. J. C. Woolum, E. Tiezzi, and B. Commoner, Biochim. Biophys. Acta, **160**, 311 (1968).
28. A. Samouilov, H. Li, and J. L. Zweier, in *Radicals for Life. The Various Forms of Nitric Oxide*, Ed. by E. van Faassen and A. F. Vanin (Elsevier, Amsterdam, 2007), p. 313.
29. T. Yoshimura, in *Radicals for Life. The Various Forms of Nitric Oxide*, Ed. by E. van Faassen and A. F. Vanin (Elsevier, Amsterdam, 2007), p. 337.

30. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 1340 (2006).
31. А. Ф. Ванин, *Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: Физико-химия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, М.-Ижевск, 2015).
32. A. F. Vanin, *Dinitrosyl iron complexes as a 'working form' of nitric oxide in living organisms* (Cambridge Scholars Publ., Cambridge, UK, 2019).
33. J. R. Lancaster and J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1223 (1990).
34. C. Pellat, Y. Henry, and J.-C. Drapier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 119 (1990).
35. J.-C. Drapier, C. Pellat, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.*, **266**, 10162 (1991).
36. A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, S. Hauschildt, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1177**, 37 (1993).
37. А. Ф. Ванин, *Биофизика*, **65**, 818 (2020).
38. А. В. Шиповалов, А. Ф. Ванин, О. В. Пьянков и др., *Биофизика*, **67**, 981 (2022).

Cytostatic Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione on *Escherichia coli* Cells Is Related to Nitrosonium Cations Released from These Complexes

A.F. Vanin^{*,#}, V.I. Telegina^{**}, V.D. Mikoyan^{*}, N.A. Tkachev^{*}, and S.V. Vasilieva^{**}

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

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

Our study has shown that a bacteriostatic effect of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione is observed for *Escherichia coli* TN300 cells, it has been measured using the colony-forming efficiency assay. The bacteriostatic effect evoked by these complexes increased considerably in the presence of diethyldithiocarbamate. Our results suggested that this effect was caused by the increase in the number of nitrosonium cations (NO^+) released from DNICs that decomposed under the action of diethyldithiocarbamate. Similar results were obtained when *E. coli* cells were treated with diethyldithiocarbamate 40 min after addition of sodium nitrite or S-nitrosoglutathione. Notably, the total DNICs level observed in the bacterial cells due to the effects of sodium nitrite or S-nitrosoglutathione was almost the same as obtained after treatment with complexes with glutathione. As to bacteriostatic effects of the molecules of NO released from nitrite or S-nitrosoglutathione during the short-time reaction with bacteria, it was significantly smaller than bacteriostatic effects of NO^+ . Therefore, it was assumed that nitrosonium cations released from DNICs were responsible for the observed bacteriostatic effect of these complexes on *E. coli* cells.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, nitrosonium cations, S-nitrosoglutathione, bacteriostatic effect, Escherichia coli cells