

АНТИНИТРОЗАТИВНАЯ СИСТЕМА КАК ФАКТОР РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ К ЦИТОТОКСИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ МОНООКСИДА АЗОТА

© 2015 г. А.Ф. Ванин, Л.А. Островская*, Д.Б. Корман*, В.Д. Микоян, Л.Н. Кубрина, Р.Р. Бородулин, М.М. Фомина*, Н.В. Блюхтерова*, В.А. Рыкова*

Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4;

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4*

E-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru; larros@list.ru

Поступила в редакцию 18.11.14 г.

Обнаружено торможение роста перевиваемой солидной опухоли у мышей линии BDF₁ (карциномы Льюис) при внутрибрюшинном ежедневном введении животным на 1–5-е и 7–11-е сутки после перевивки опухоли водного раствора биядерной формы динитрозильных комплексов железа с глутатионом в дозе 200 мкмоль на 1 кг (в пересчете на одну Fe(NO)₂-группу в составе комплексов). При соотношениях динитрозильных комплексов железа и свободного глутатиона в растворе, равных 1:1 и 1:10, торможение роста опухоли в ходе введения комплексов (11 суток) составляло соответственно 70 и 85%. После прекращения введения динитрозильных комплексов железа начинался усиленный рост опухоли, более быстрый, чем в контроле. Методом ЭПР обнаружено избирательное накопление динитрозильных комплексов железа в опухоли, а также накопление в ней нитрозильных комплексов гемопротейнов. Последние обнаруживались в опухоли и у контрольных животных. Предполагается, что задержка развития опухоли в ходе введения мышам биядерной формы динитрозильных комплексов железа обусловлена инактивацией под действием NO, высвобождающегося из этих комплексов, гемосодержащих белков, обеспечивающих антинитрозативную защиту, вырабатываемую в злокачественных опухолях.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, карцинома легких Льюис, монооксид азота.

Ранее на модели экспериментального эндометриоза крыс нами было обнаружено ингибирование роста доброкачественных эндометриодных опухолей (ЭМО) под влиянием динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с глутатионом (GS), представленных моноядерной (М-ДНКЖ)-(GS)₂Fe(NO)₂ и биядерной (Б-ДНКЖ)-(GS)₂Fe₂(NO)₄ формами [1–5].

Введение ДНКЖ с глутатионом (ДНКЖ-GS) в разовой дозе 12,5 мкмоль/кг (в пересчете на одну Fe(NO)₂-группу) внутрибрюшинно (в/б), ежедневно, десятикратно, начиная со вторых–третьих суток после операции (пересадка 2-миллиметровых фрагментов эпителия матки на внутреннюю поверхность брюшины), приводило к полному ингибированию развития ЭМО у большинства животных. Размеры опухолей, развившихся у контрольных животных за период наблюдения (1 месяц), достигали 1 см в диаметре. Применение ДНКЖ по указанной

схеме животным с развившимися опухолями (1 см) приводило к исчезновению из ЭМО эндометриальных цист, обеспечивающих пролиферацию этих опухолей, т.е. и на стадии уже развившегося эндометриоза ДНКЖ способны подавлять этот процесс.

Было предположено, что цитотоксическое действие ДНКЖ на эндометриодные опухоли было обусловлено разрушительным действием на эти комплексы хелаторов железа, продуцируемых данными быстропролиферирующими опухолями, для их обеспечения железом. Забирая на себя железо из ДНКЖ, эндогенные хелаторы тем самым обеспечивали появление вблизи или внутри ЭМО значительного количества NO, высвобождающегося из ДНКЖ с последующим его окислением в цитотоксический пероксинитрит. Это предположение было сделано исходя из результатов исследования влияния ДНКЖ с различными тиолсодержащими лигандами на пролиферацию клеток HeLa, в которых было показано, что динитрозильные комплексы могли оказывать цитотоксическое действие на клетки при быстром распаде

Сокращения: ЭМО – эндометриодные опухоли, М- и Б-ДНКЖ – моно- и биядерные динитрозильные комплексы железа, GS – глутатион.

ДНКЖ под действием различных экзогенных хелаторов железа [6]. Этот распад приводил к высвобождению из комплексов значительного количества NO. Последующая реакция NO с анионами супероксида приводила к образованию большого количества высокотоксичного пероксинитрита, что и вызывало гибель клеток HeLa по механизму апоптоза.

В связи с вышесказанным представлялось интересным проверить, могут ли ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами оказывать цитотоксическое действие и на быстропролиферирующие злокачественные опухоли по механизму, предполагаемому для аналогичного действия указанных комплексов на ЭМО. Такого рода исследования, проведенные нами на модели перевиваемой солидной опухоли мышей – карциноме легких Льюис, показали, что ежедневное внутрибрюшинное введение этим животным (мыши линии BDF₁) ДНКЖ-GS в дозе 25–50 мкмоль/кг в течение 10 суток, начиная со следующих суток после перевивки опухоли, приводит к торможению роста подкожной опухоли, развивающейся у мышей. Через неделю после перевивки опухоли на фоне продолжающегося введения животным ДНКЖ начинался усиленный рост этой опухоли [7].

В настоящей работе приводятся результаты дальнейших исследований влияния на развитие карциномы Льюис ДНКЖ-GS при тех же условиях эксперимента, но при более высокой дозе этих комплексов (200 мкмоль/кг в пересчете на одну Fe(NO)₂-группу в комплексе).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. При синтезе препаратов Б-ДНКЖ с глутатионом использовали сернокислое железо (FeSO₄·7H₂O) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион и нитрит натрия (Sigma, США).

Синтез Б-ДНКЖ с глутатионом. Синтез препарата ДНКЖ с глутатионом, в котором преобладала биядерная форма этих комплексов (Б-ДНКЖ), проводили по методике, описанной в [8]. В соответствии с этой методикой, синтез этих комплексов лимитровался уровнем нитрита, точнее уровнем S-нитрозоглутатиона (GS-NO), образующегося из нитрита и глутатиона в кислой среде. Последующее превращение GS-NO в ДНКЖ-GS осуществляли повышением pH раствора GS-NO в присутствии 10-кратного избытка двухвалентного железа. После выдерживания этого раствора при 4°C в течение ночи, приводившего к полному превращению GS-NO в ДНКЖ-GS, железо, не включившееся в эти комплексы и выпавшее из раствора в

форме гидроокисных комплексов, удаляли фильтрацией раствора на бумаге. При молярном соотношении исходных препаратов железа (FeSO₄·7H₂O), NaNO₂ и глутатиона, равным 1:1:2 и pH раствора 7,4, полученный препарат ДНКЖ-GS был представлен в основном в форме Б-ДНКЖ. Кроме него в растворе сохранялся свободный глутатион в молярном соотношении к Б-ДНКЖ, равном 1:1. В ряде опытов использовали препарат Б-ДНКЖ, к которому после удаления от него гидроокисного железа добавляли глутатион (с поддержанием pH раствора при 7,4), так что молярное соотношение глутатион Б-ДНКЖ повышалось до 10:1.

Концентрацию синтезированного Б-ДНКЖ с глутатионом оценивали оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции, равными соответственно 9200 и 7400 М⁻¹см⁻¹ [9]. При концентрациях исходных реагентов (FeSO₄·7H₂O), NaNO₂ и глутатиона, равных соответственно 40, 40 и 80 мМ, выход Б-ДНКЖ с глутатионом составлял 10 или 20 мМ (в пересчете на одну Fe(NO)₂-группу в Б-ДНКЖ).

Биологический эксперимент. Эксперименты проведены на 60 мышах линии BDF₁, самках с массой тела 18–20 г разведения питомника РАМН «Столбовая». В качестве опухолевой тест-системы служила солидная опухоль мышей – карцинома легких Льюис, перевиваемая подкожно в соответствии со стандартной методикой [10].

Водный раствор Б-ДНКЖ с глутатионом вводили мышам внутрибрюшинно десятикратно (на 1–5-е и 7–11-е сутки после перевивки опухоли) в дозе 200 мкмоль/кг (в пересчете на одну Fe(NO)₂-группу) Б-ДНКЖ. В опытах использовали два раствора Б-ДНКЖ, содержащих свободный глутатион в молярном соотношении с Б-ДНКЖ, равном 1:1 и 10:1. Контрольная группа животных и каждая группа животных, получавших это терапевтическое воздействие, состояла из 20 животных. Половину всех животных забивали на 11-й день после перевивки опухоли. Наблюдение за второй половиной животных продолжали в течение всего периода развития опухоли, вплоть до гибели животных.

ЭПР-измерения образцов тканей животных. Для оценки уровня ДНКЖ, накопившегося в тканях мышей в результате введения им Б-ДНКЖ-GS за час перед последней (десятой) инъекцией комплексов, половина животных была забита с последующим извлечением опухоли, печени, легких, селезенки, мозга и крови,

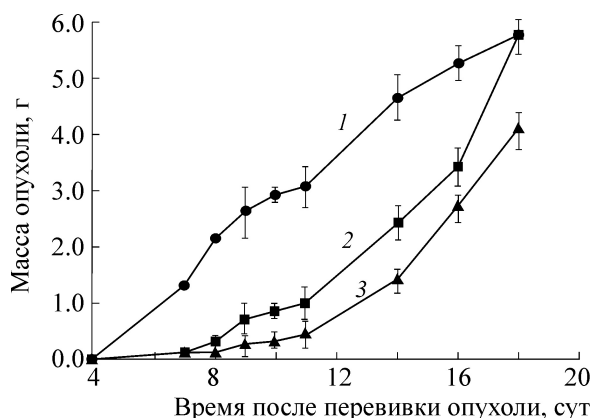


Рис. 1. Кинетика изменения массы опухоли при развитии карциномы Льюис в контроле (кривая 1) и при воздействии препаратов ДНКЖ-GS-1 (кривая 2) и ДНКЖ-GS-10 (кривая 3) в разовой дозе 200 мкмоль/кг, внутривенно, с 1-х по 11-е сутки.

которые помещали в соответствующие цилиндрические ампулы диаметром 4 мм с последующим замораживанием в жидком азоте. Аналогичную процедуру проводили с контрольными животными (без введения им Б-ДНКЖ-GS). Вес извлеченных из этих ампул замороженных образцов тканей цилиндрической формы составлял не менее 0,5 г при длине образца не менее 3 см. При такой длине образец полностью заполнял рабочий объем резонатора радиоспектрометра.

Для получения образцов опухолей, селезенки и легких массой 0,5 г смешивали опухоли, взятые от трех мышей, легких и селезенки – от двух животных. Измерения спектров ЭПР проводили на модифицированном радиоспектрометре фирмы «Радиопан» (Польша) при температуре жидкого азота (77 К).

Концентрацию парамагнитных центров в образцах опухолей и печени (М-ДНКЖ и нитрозильных комплексов гемопротеинов) проводили методом двойного интегрирования с использованием в качестве эталонного образца раствора М-ДНКЖ с глутатионом, полученного путем повышения рН 10 мМ раствора Б-ДНКЖ с глутатионом от нейтральных значений до рН 11. Это подщелачивание приводило к полной трансформации диамагнитного Б-ДНКЖ (10 мМ) в парамагнитный М-ДНКЖ с глутатионом (20 мМ), характеризующийся сигналом ЭПР со следующими значениями $g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,013$, $g_{\text{ср}} = 2,03$ [9].

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка оценок массы опухолей у 10 животных проведена с использованием пакета компьютерных программ «Statistica 6.0». Результаты оценок методом ЭПР концентрации

М-ДНКЖ и нитрозильных комплексов гемопротеинов в образцах тканей мышей представлены как среднее значение (по трем образцам) \pm ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучено влияние двух препаратов ДНКЖ-GS, имеющих различные соотношения Б-ДНКЖ:свободный глутатион в растворе, равные 1:1 и 1:10 (ДНКЖ-GS-1 и ДНКЖ-GS-10 соответственно), на развитие карциномы Льюис.

Кинетика изменения массы опухоли у животных, получавших препараты ДНКЖ-GS-1 и ДНКЖ-GS-10 в разовой дозе 200 мкмоль/кг, внутривенно, десятикратно, ежедневно, и у контрольных мышей охарактеризована данными, приведенными на рис. 1.

Видно, что на протяжении всего курса воздействия препаратов (вплоть до 11-ти суток) наблюдается торможение роста опухоли, наиболее выраженное при воздействии Б-ДНКЖ с повышенным содержанием свободного глутатиона (препарат ДНКЖ-GS-10). Последнее, очевидно, обусловлено стабилизирующим влиянием свободного глутатиона на Б-ДНКЖ, обнаруженном в работе [11], что обеспечивало более эффективное действие этого комплекса на опухоли. Торможение роста карциномы Льюис под влиянием препаратов ДНКЖ-GS-1 и ДНКЖ-GS-10 составило 70 и 85% соответственно (11-е сутки развития опухоли). Прекращение курса применения Б-ДНКЖ сопровождалось дальнейшим развитием опухолей со скоростью, примерно одинаковой для обоих препаратов (рис. 1).

Средняя продолжительность жизни контрольных и леченых животных была примерно одинаковой (28–30 суток).

Аналогичная кинетика изменения массы опухоли (карцинома Льюис) наблюдалась нами ранее при введении мышам ДНКЖ-GS в меньших дозах (25 и 50 мкмоль/кг). Торможение роста опухоли под влиянием этих доз препарата составляло 75–90% по сравнению с контролем, однако длилось не более семи суток с последующим возобновлением роста опухолей на фоне продолжавшегося в течение четырех суток воздействия ДНКЖ-GS [7].

ЭПР-измерения тканей мышей, проводившиеся при 77 К, позволили выявить в опухолях и тканях органов парамагнитную М-ДНКЖ-форму, характеризующуюся сигналом ЭПР с компонентой при $g_{\perp} = 2,04$ (рис. 2а, в, д, и). Появление этой формы было обусловлено пере-

носом парамагнитных $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -фрагментов из Б-ДНКЖ на тиоловые группы белков. О белковой природе возникающих М-ДНКЖ свидетельствовало сохранение формы сигнала ЭПР с компонентой при $g = 2,04$ при повышении температуры его регистрации от 77 К до комнатной температуры (данные не приводятся). Это сохранение было обусловлено низкой подвижностью белковой глобулы, содержащей М-ДНКЖ, недостаточной для усреднения анизотропии сигнала ЭПР при $g = 2,04$, определяющей его форму [12]. В образцах тканей контрольных животных (рис. 2б,г,е,з,к,м) этот сигнал не обнаруживался.

Появление белоксвязанных М-ДНКЖ в клетках печени леченых животных в концентрации $2,5 \pm 1,2$ нмоля/г влажной ткани, очевидно, связано с включением внутрибрюшинно вводившихся Б-ДНКЖ непосредственно в печень по воротной вене. Появление этих же комплексов в опухолях, селезенке и легких леченых животных, очевидно, обусловлено их поступлением в эти ткани из циркулирующей крови, куда они попадали из брюшины после в/б введения препаратов.

Обращает на себя внимание резкое различие в концентрации М-ДНКЖ в опухолях, с одной стороны ($1,2 \pm 0,5$ нмоля/г влажной ткани), и в селезенке и легких – с другой (соответственно $0,3 \pm 0,1$ и $0,25 \pm 0,05$ нмоля/г влажной ткани). Это наблюдение может рассматриваться как свидетельство определенной избирательности распределения препаратов ДНКЖ-GS в организме животных с преимущественным накоплением в ткани опухоли.

Интересный результат был получен для опухолей контрольных животных (не получавших Б-ДНКЖ-GS). Во всех трех образцах, каждый из которых представлял собой смесь опухолей, взятых от трех животных, был зарегистрирован сигнал ЭПР, характерный для нитрозильных комплексов гемопротеинов (рис. 2г). Концентрация комплексов в пересчете на 1 грамм ткани составляла $9,0 \pm 1,5$ нмолей. Эти же комплексы в той же концентрации обнаруживались, наряду с белоксвязанными М-ДНКЖ, и в опухолях леченых животных (рис. 2 в).

В крови как контрольных, так и экспериментальных животных регистрировали только сигналы ЭПР свободных радикалов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования подтверждают полученные нами ранее данные о способности Б-ДНКЖ-GS (в особенности при наличии в

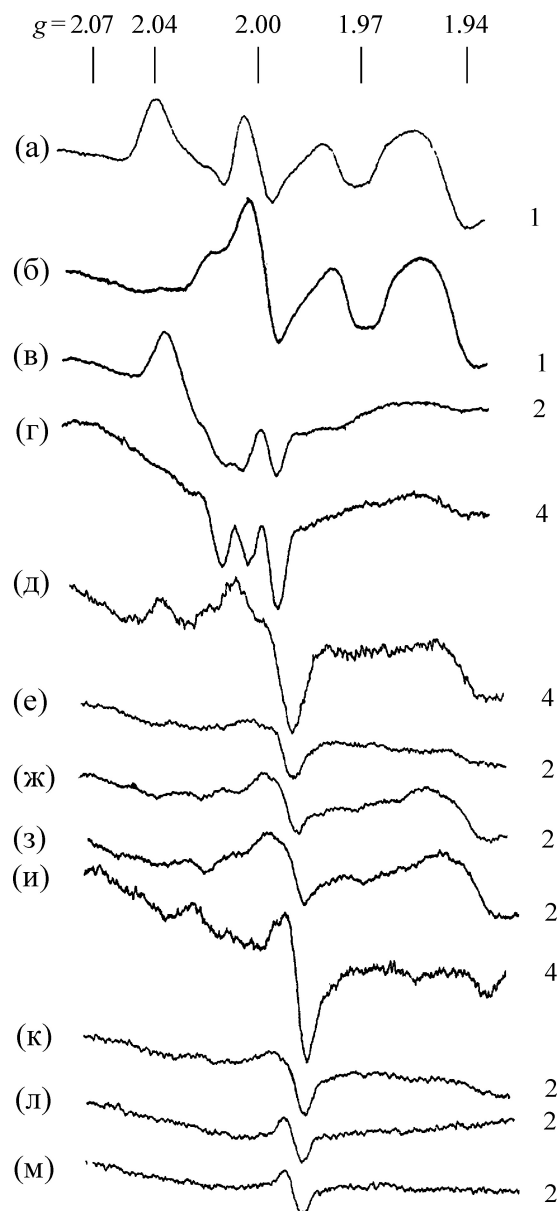


Рис. 2. Спектры ЭПР парамагнитных центров в печени мышей в опыте и контроле (а, б), в ткани опухоли Льюис в опыте и контроле (в, г), селезенке в опыте и контроле (д, е), мозге в опыте и контроле (ж, з), легких в опыте и контроле (и, к), в крови в опыте и контроле (л, м). Сигнал при $g = 2,04$ (в спектрах а, в, д, и) обусловлен белоксвязанными М-ДНКЖ, сигнал при $g = 2,0$ (во всех спектрах) – свободно-радикальными центрами, сигнал при $g = 1,97$ (в спектрах а, б) – комплексами молибдена, сигнал при $g = 1,94$ (во всех спектрах, кроме л, м) – восстановленными железо-серными белками, сигнал при $g = 2,07-1,97$ с триплетной сверхтонкой структурой (спектры в, г) – нитрозильными комплексами гемопротеинов. Спектры зарегистрированы при 77 К. Справа указано усиление радиоспектрометра в отн. ед.

этом препарате свободного глутатиона – ДНКЖ-GS-10) ингибировать рост карциномы

легких Льюис на начальной стадии развития на 70–90% по сравнению с контролем [7]. При этом длительность периода ингибирования роста опухоли имеет дозо-зависимый характер и составляет 11 и 7 суток при применении ДНКЖ-GS в разовых дозах 200 и 50 мкмоль/кг соответственно.

Другое дозо-зависимое отличие в действии Б-ДНКЖ-GS состояло в том, что при применении меньших доз препарата (50 мкмоль/кг) активация роста опухолей начиналась за четверо суток до прекращения курса лечения, тогда как при использовании более высоких доз (200 мкмоль/кг) возобновление опухолевого роста наблюдалось только после окончания применения препарата (11-е сутки после перевивки опухоли).

Характерным, однако, для действия Б-ДНКЖ-GS, как и для большинства противоопухолевых препаратов, является тот факт, что период ингибирования развития опухоли сменяется возобновлением ее роста, причем нередко с более высокой, чем в контроле, скоростью (рис. 1).

Очевидно, что имеются существенные различия в эффектах Б-ДНКЖ-GS в отношении карциномы Льюис и доброкачественных эндометриоидных опухолей. В то время как на модели карциномы Льюис наблюдалось лишь временное ингибирование опухолевого роста с последующей пролиферацией клеток выжившей фракции, развитие ЭМО полностью подавлялось при введении препаратов в дозах, практически на порядок меньших по сравнению с использованными в настоящих исследованиях на карциноме Льюис. Столь различная реакция доброкачественных и злокачественных опухолей на рассматриваемое терапевтическое воздействие, вероятно, отражает фундаментальные различия в природе этих двух видов опухолевого роста.

Представляется уместным предположить, что злокачественная опухоль ведет себя в отношении NO и его производных подобно бактериям, у которых при их контакте с этими агентами вырабатывается антинитрозативная система, удаляющая NO из клеток бактерий и тем самым предотвращающая его цитотоксическое действие на бактерии [13].

Выработка антинитрозативной системы в бактериях инициируется под действием NO экспрессией генов, ответственных за синтез ряда гемсодержащих белков, способных окислять NO до нитрита/нитрата или восстанавливать его до закиси азота (N_2O) [13]. Учитывая автономный характер поведения опухолевых клеток, напоминающих в этом отношении поведе-

ние в организме животных и человека бактерий, есть основание предполагать, что аналогичная антинитрозативная система развивается при контакте с NO и в опухолях, т.е. под действием NO (эндогенного или высвобождающегося из вводимых Б-ДНКЖ) экспрессируется синтез гемсодержащих белков, «убирающих» NO из опухолей.

Как же, в рамках этих предположений, объяснить задержку роста опухоли Льюис под влиянием Б-ДНКЖ на начальной стадии ее развития? Эта задержка может быть обусловлена действием избытка NO, выделяющегося при распаде Б-ДНКЖ, на гемсодержащие белки, непрерывно синтезируемые при запуске генов, ответственных за антинитрозативную защиту. Известно, что в присутствии NO и кислорода гемовое железо в гемсодержащих белках окисляется до ферри-состояния, неспособного катализировать как окисление, так и восстановление NO. Исходя из этого, можно предположить, что обнаруженная нами задержка роста раковой опухоли могла быть обусловлена инактивацией гемсодержащих белков, обеспечивающих защиту этой опухоли от NO, под действием на эти белки NO, выделяющегося из Б-ДНКЖ. Как только введение последних прекращалось, белки начинали функционировать, обеспечивая более эффективную защиту от NO, чем в контроле, что и приводило к ускоренному росту раковой опухоли.

Второй вывод из проведенных нами исследований состоит в том, что организм реагирует на появление раковых опухолей преимущественной транспортировкой в них ДНКЖ, а также оксида азота, связывающегося с гемсодержащими белками опухолей с образованием в них парамагнитных нитрозильных комплексов гемового железа. Это означает, что иммунная система животных «замечает» появление у них раковых опухолей, обеспечивая с помощью иммунокомпетентных клеток направленный перенос в эти опухоли эндогенного NO, обнаруживаемого в них методом ЭПР по образованию нитрозильных комплексов негемового и гемового железа. Иное дело, что появление эндогенного NO в злокачественных опухолях не приводит к их гибели, наблюдавшейся для ЭМО. Это обусловлено не тем, что иммунная система «не замечает» раковой опухоли, а тем, что эта опухоль выстраивает антинитрозативную защиту, предотвращающую действие на нее NO.

И, наконец, третье важное заключение из результатов наших исследований. Если, действительно, окажется, что устойчивость злокачественных опухолей можно снять супрессией ге-

нов, экспрессирующих синтез белков антинитрозативной защиты, то в этом случае ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут оказаться более эффективными в блокировании роста этих опухолей, чем другие доноры NO, например S-нитрозотиолы или NO-аты.

Мы исходим из гипотезы, изложенной во введении, которая «сработала» в наших исследованиях, продемонстрировавших цитотоксическое действие Б-ДНКЖ-GS на незлокачественные ЭМО. Согласно этой гипотезе, быстропролиферирующие ткани, а к ним можно отнести и злокачественные опухоли, должны продуцировать для их обеспечения железом соединения, способные поставлять его из окружающей среды в клетки опухолей. Эти соединения, связывая железо, могут эффективно разрушать ДНКЖ с тиолатными лигандами, появившиеся вблизи этих клеток или внутри их, чем и может обеспечиваться избирательное цитотоксическое действие NO, выделяющегося из этих комплексов на опухолевые ткани. Такое избирательное действие вряд ли возможно при использовании, например, S-нитрозотиолов. Как показали исследования на крысах с экспериментальным эндометриозом, S-нитрозоглутатион, вводившийся как донор NO в область локализации ЭМО (внутрь брюшины), не подавлял, а, наоборот, как соединение, оказывающее неизбирательное цитотоксическое действие на различные ткани в брюшине, усиливал рост ЭМО [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. Н. Бургова, Л. В. Адамян, Н. А. Ткачев и др., *Биофизика* **57**, 105 (2012).
2. Л. В. Адамян, Е. Н. Бургова, Н. А. Ткачев и др., *Биофизика* **58**, 302 (2013).
3. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, L. V. Adamyan, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **727**, 140 (2014).
4. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, O. V. Paklina, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **741**, 37 (2014).
5. А. Ф. Ванин, Л. В. Адамян, Е. Н. Бургова и др., *Биофизика* **59**, 766 (2014).
6. N. Ya. Giliano, L. V. Konevega, L. A. Noskin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **24**, 151 (2011).
7. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **59**, 508 (2014).
8. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvidkyi, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 110 (2013).
9. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 1236 (2013).
10. Е. М. Трещалин, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в кн. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, ред. Р.Н. Хабаров, изд. 2 (Медицина, М., 2005).
11. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **29**, 4 (2013).
12. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2**, 224 (1998).
13. J. Green, M. D. Rolfe, and L. J. Smith, *Virulence* **5**, 1 (2013).

Anti-nitrosative System as a Factor of Malignant Tumor Resistance to Cytotoxic Effect of Nitrogen Monoxide

A.F. Vanin*, L.A. Ostrovskaya**, D.B. Korman**, V.D. Mikoyan*, L.N. Kubrina*, R.R. Borodulin*, M.M. Fomina**, N.V. Bluchterova**, and V.A. Rykova**

*Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

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

The inhibitory action of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione on the growth of implanted solid tumor in BDF₁ mice bearing Lewis lung carcinoma cells was found. The effect was induced by intraperitoneal injection of the binuclear dinitrosyl iron complexes to mice at a dose of 200 μM/kg daily on days 1–5 and 7–11. At the binuclear dinitrosyl iron complexes: free glutathione ratios of 1:1; and 1:10 in solutions, the inhibitory effect of the DNICs reached the level of 70% and 85%, respectively. When B-DNICs were not further infused, intensive tumor growth, a more rapid rate of tumor growth than control, was observed. The selective accumulation of DNICs as well as iron nitrosyl complexes of heme-containing proteins in tumors were detected by EPR method. The latter were found also in the tumors in control animals. Tumor growth delay in course of B-DNIC administration to the mice is supposed to be due to the elaboration of anti-nitrosative defense in tumor tissue in response to the action of NO released from B-DNIC.

Key words: dinitrosyl iron complexes, Lewis lung carcinoma, NO