

## ДОСТАВКА ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В ЛЕГКИЕ ЖИВОТНЫХ

© 2015 г. Г.Н. Можокина, Н.А. Елистратова, В.Д. Микоян\*, А.Ф. Ванин\*

Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, 127994, Москва, ул. Достоевского, 4;

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

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

Поступила в редакцию 20.01.15 г.

Продемонстрировано эффективное накопление биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом в ткани легкого при подкожном паралимфатическом введении этих комплексов в водном растворе в разовой дозе 2 мкмоль/кг дважды в сутки с перерывом в 2 ч. Через 2 ч после повторного введения концентрация этих комплексов достигала 16 мкмоль/кг ткани, снижаясь за последние 2 ч до 7 мкмоль/кг ткани. При однократном введении биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом концентрация их через 2 и 4 ч была в два раза ниже, чем в предыдущих опытах. Возможно, при полученных концентрациях динитрозильных комплексов железа в легких будет наблюдаться бактерицидный эффект в отношении микобактерий туберкулеза и в отношении быстропролиферирующих опухолей легких.

*Ключевые слова:* динитрозильные комплексы железа, кожные раны, монооксид азота.

Низкомолекулярные динитрозильные комплексы железа (соответственно М- и Б-ДНКЖ) с тиолсодержащими (RS) лигандами в виде их моно- и биядерной форм (формулы соответственно  $[(RS)_2Fe(NO)_2]$  и  $[(RS)_2Fe_2(NO)_4]$ ), выступающие в организме животных и человека в качестве доноров одного из универсальных регуляторов метаболических процессов – монооксида азота (NO), способны оказывать на животных и человека разнообразное биологическое действие – как регуляторное, так и цитотоксическое [1,2]. В организме животных и человека в результате перехода  $Fe(NO)_2$  фрагментов из низкомолекулярных М- и Б-ДНКЖ на тиоловые группы белков в белок-связанные ДНКЖ подавляющая часть низкомолекулярных Б-ДНКЖ превращается в более стабильные белок-связанные ДНКЖ [3,4]. Последние, как депо NO, обеспечивают существование в течение сравнительно длительного времени находящихся с ними в химическом равновесии низкомолекулярных ДНКЖ, которые, как высокоподвижные соединения, и оказывают на организм животных и человека указанное биологическое действие.

Регуляторный характер этого воздействия определяется способностью низкомолекулярных ДНКЖ передавать молекулы монооксида азота и ионы нитрозония ( $NO^+$ ) на мишени их биологического действия – соответственно гемовые и тиоловые группы белков. Этот перенос лежит в основе вазодилаторного и гипотензивного действия ДНКЖ [5,6], их способности подавлять агрегацию тромбоцитов [7], ускорять заживление кожных ран [8]. Цитотоксическая активность ДНКЖ проявляется при быстром распаде этих комплексов, вызванном действием на них различных экзогенных или эндогенных хелаторов железа [1,2,9]. Высвобождающиеся при этом молекулы NO окисляются в реакции с супероксидом до пероксинитрита, который и оказывает токсическое действие на клетки и ткани [10]. Цитотоксический эффект ДНКЖ продемонстрирован в отношении развития эндометриоза у крыс [11,12] и в отношении культуры злокачественных клеток Jurkat [13]. В исследованиях [14,15] показано, что взаимодействие NO с важными регуляторными белками микобактерий туберкулеза – железо-серными белками WhiB – приводит к образованию белок-связанных ДНКЖ, что приводит к изменению пролиферативной активности микобактерий.

Монооксид азота и его производные, продуцируемые иммуннокомпетентными клетками,

Сокращения: М- и Б-ДНКЖ – моно- и биядерные динитрозильные комплексы железа, RS – тиолсодержащие лиганды, Глт, GS – глутатион.

как бактерицидные агенты могут обеспечивать защиту от туберкулезной инфекции. На моделях туберкулеза у мышей было показано, что прогрессирование туберкулезного поражения внутренних органов зависит от уровня NO [16]. Под влиянием избытка NO микобактерии переходили из стадии активной пролиферации в латентное, нерепликативное состояние, что приводило к резкому ослаблению патогенного действия микобактерий на ткани легких [17,18]. В опытах на культуре микобактерий туберкулеза использование соединений, доноров NO – NO-атов или S-нитрозотиолов (RS–NO), приводило к гибели микобактерий [19,20]. Однако в опытах на инфицированных животных, когда использовались высокие дозы этих соединений, последние вызывали гибель не только микобактерий в тканях легких, но и самих этих тканей. Обусловлено это было самопроизвольным распадом NO-атов и RS–NO не только в области локализации микобактерий, но и во всей ткани легкого [20].

В связи с этим, весьма целесообразным представляется разработка способов доставки ДНКЖ в организм животных с целью обеспечения цитотоксического действия этих комплексов на микобактерии туберкулеза и безопасных для макроорганизма. Ранее была изучена эффективность и безопасность ингаляционного пути введения ДНКЖ в организм мышей [21], при котором содержание белок-связанных ДНКЖ в легких уже через 2 ч после окончания ингаляции резко снижалось и не обеспечивало бактерицидного эффекта у инфицированных животных. При этом у большинства мышей был высокий риск развития гемоторакса после ингаляции.

В настоящей работе исследовано распределение белок-связанных ДНКЖ в крови, легких, печени, парааортальных и бифуркационных лимфатических узлах крыс при введении им ДНКЖ с глутатионом (Глт, GS) подкожно в область паховых лимфатических узлов в зависимости от дозы и кратности введения. Оценка этого распределения проводилась методом ЭПР по интенсивности характерного для ЭПР-сигнала М-ДНКЖ при  $g_{cp} = 2,03$  [3].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 2 мМ раствор препарата Б-ДНКЖ-Глт, полученный пятикратным разбавлением 10 мМ раствора этого комплекса, синтезированного согласно описанному ранее «простейшему» стандартному методу синтеза этого комплекса [22]. В основе этого метода лежит способность S-нитрозоглутатиона (GS–

NO) вступать в реакцию с ионами  $Fe^{2+}$  с образованием при участии глутатиона соответствующих М-ДНКЖ. При нейтральных значениях pH даже при наличии в среде значительного количества глутатиона М-ДНКЖ-Глт предпочитает [23] переходить в Б-ДНКЖ-Глт по схеме:



В соответствии с [22], синтез 10 мМ раствора Б-ДНКЖ с глутатионом проводили следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на воздухе добавляли 248 мг глутатиона (80 мМ), вызывавшего подкисление раствора до 3,0, с последующим введением в него 112 мг (40 мМ) сернокислого железа, приводившего к дальнейшему снижению pH до 2,8. После этого в раствор добавляли 27,6 мг (40 мМ) нитрита натрия, что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленному образованием S-нитрозоглутатиона (GS–NO).

Судя по интенсивности оптического поглощения при длине волны 334 нм, характерного для GS–NO, реакция заканчивалась через 2 ч с образованием 40 мМ этого соединения. После этого pH раствора повышали до 7,2, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся процессом образования Б-ДНКЖ в растворе. Для полного превращения GS–NO в Б-ДНКЖ требовалось несколько часов. После удаления образовавшегося за это время осадка гидроокиси трехвалентного железа полученный раствор с последующей модификацией (добавлением глутатиона, см. ниже) использовали в экспериментах на животных.

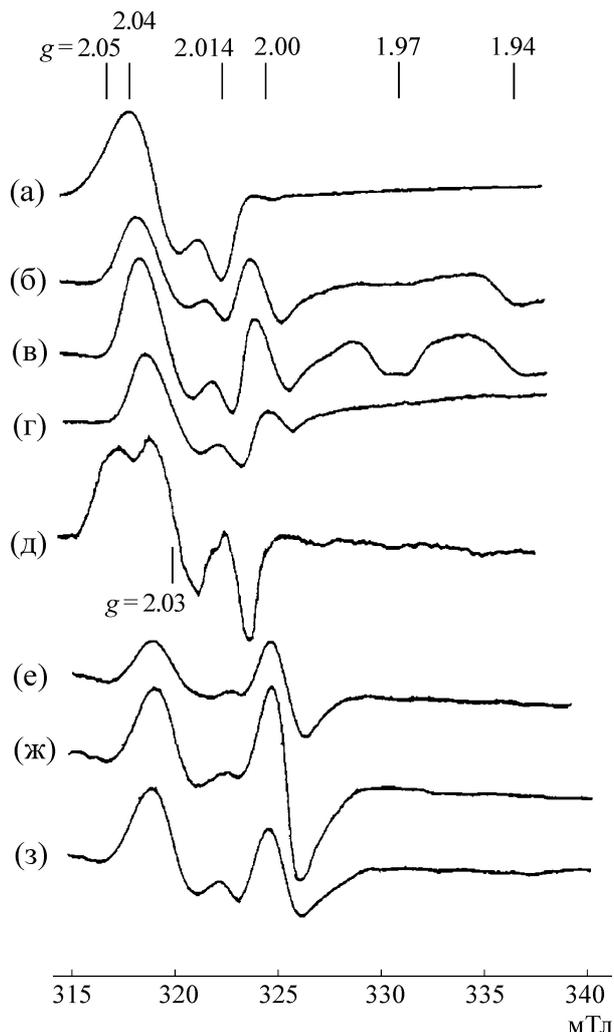
Оценку полученного количества Б-ДНКЖ с глутатионом (мол. вес 846 Да) проводили оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм, характеризующихся коэффициентами экстинкции соответственно 9200 и 7400  $M^{-1}cm^{-1}$  [23]. Согласно этой оценке, концентрация Б-ДНКЖ в растворе составляла ~10 мМ или 20 мМ в пересчете на один атом железа в комплексе. Молярное отношение Б-ДНКЖ к свободному (несвязанному с Б-ДНКЖ) глутатиону в растворе составляло 1:2. Далее в этом растворе растворяли 100 мМ глутатиона с последующим повышением pH до 7,4. В результате молярное отношение Б-ДНКЖ к свободному глутатиону снижалось до 1:12. Этот раствор Б-ДНКЖ-Глт (после пятикратного разбавления дистиллированной водой) использовали в опытах на животных.

Эксперименты проводили на крысах-самцах массой 250–300 г, разделенных на две группы. В первой группе животным вводили Б-ДНКЖ-

Глт в разовой дозе 2 мкмоль/кг однократно в подкожно-жировую клетчатку в области паховых лимфатических узлов (паралимфатически) с последующим забоем животных через 2 и 4 ч после введения препарата. Животным второй группы Б-ДНКЖ-Глт вводили аналогичным способом в той же разовой дозе, но дважды в сутки (суточная доза 4 микромоль/кг) с интервалом в 4 ч между введениями. Забой этих животных проводили также через 2 и 4 ч после второго введения. После забоя у крыс брали кровь, печень, легкие, парааортальные и бифуркационные лимфатические узлы, которые помещали в цилиндрические ампулы диаметром 4 мм с последующим их замораживанием в жидком азоте. Перед ЭПР-измерениями замороженные ткани извлекали из ампул и регистрировали в них спектры ЭПР при 77 К (или после размораживания) при комнатной температуре. Эти измерения проводили на модифицированном радиоспектрометре «Радиопан» (Польша) при условиях, приведенных на рисунке. Оценку концентраций М-ДНКЖ, появляющихся в тканях крыс, проводили путем сопоставления амплитуды сигналов с  $g = 2,03$  в этих тканях и сигнала ЭПР М-ДНКЖ с глутатионом, полученного добавлением к синтезированному препарату Б-ДНКЖ 10-кратного избытка глутатиона с последующим повышением рН до 11. Эта процедура приводила к превращению всего Б-ДНКЖ в М-ДНКЖ с концентрацией последнего, равной 5 мМ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке приведены спектры ЭПР, зарегистрированные при 77 К и комнатной температуре в крови, лимфатических узлах, печени и легких крыс после введения им подкожно в область паховых лимфоузлов Б-ДНКЖ с глутатионом. Во всех спектрах представлены сигналы ЭПР М-ДНКЖ (при  $g_{\perp} = 2,04$ ,  $g_{\parallel} = 2,014$ ,  $g_{\text{ср}} = 2,03$ ) и свободных радикалов (при  $g = 2,0$ ). В спектре печени наблюдаются также сигналы ЭПР комплексов молибдена (при  $g = 1,97$ ) и восстановленных железо-серных белков (при  $g = 1,94$ ), регистрируемые только при 77 К [24]. Сигнал при  $g = 1,94$  обнаруживался и в ткани лимфатических узлов. При повышении температуры регистрации спектров ЭПР лимфатических узлов, печени и легких от 77 К до комнатной температуры, форма сигнала ЭПР М-ДНКЖ не менялась. Это сохранение однозначно свидетельствовало о белковой природе ДНКЖ, ответственных в тканях животных за эти сигналы. Как было показано ранее, подвижность белковой глобулы, содержащей бе-



Форма спектров ЭПР крови (а,д), лимфатических узлов (б,е), печени (в,ж) и легких (г,з) крыс после введения им Б-ДНКЖ-Глт. Спектры зарегистрированы при 77 К (а-г) или при комнатной температуре (д-з) при амплитуде ВЧ-модуляции магнитного поля 0,1 мТл и мощности СВЧ-поля 1 мВт. Усиление радиоспектрометра разное.

лок-связанные ДНКЖ, при комнатной температуре, как правило, недостаточна для усреднения анизотропии  $g$ -фактора, как это имеет место для низкомолекулярных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [4]. В результате последние при комнатной температуре регистрируются вместо широкого анизотропного сигнала с  $g_{\perp} = 2,04$ ,  $g_{\parallel} = 2,01$ , регистрируемого при 77 К, дают узкий изотропный сигнал ЭПР с центром при  $g = 2,03$  [4].

Что касается сигналов ЭПР комплексов молибдена и восстановленных железо-серных белков, они при комнатной температуре регистрации не обнаруживались из-за характерного для этих центров сильного спин-решеточного взаи-

Содержание белок-связанных ДНКЖ (в мкмоль/кг ткани) в крови, печени, лимфатических узлах и легких крыс через 2 и 4 ч после однократного (1-я группа) и через 2 и 4 ч после повторного введения (2-я группа) ДНКЖ-Глт

Ткани	1-я группа животных		2-я группа животных	
	Через 2 ч	Через 4 ч	Через 2 ч	Через 4 ч
Кровь	17,0 ± 8,0	1,8 ± 0,6	35,0 ± 16,0	14,0 ± 2,0
Печень	3,0 ± 0,7	1,0 ± 0,5	9,0 ± 3,0	6,0 ± 2,0
Лимфатические узлы	1,0 ± 0,3	0,5 ± 0,3	9,0 ± 3,0	6,0 ± 2,0
Легкие	9,0 ± 0,5	3,0 ± 1,0	16,0 ± 3,0	7,0 ± 2,0

модействия, обеспечивающего резкое уширение их сигналов ЭПР при этой температуре [24]. Как следует из формы сигналов ЭПР М-ДНКЖ, регистрируемых в лимфатических узлах, печени и легких и характеризующихся только двумя разными значениями тензора  $g$ -фактора ( $g_{\perp} = 2,04$ ,  $g_{\parallel} = 2,01$ ), М-ДНКЖ в этих тканях имеют аксиальную симметрию. Что касается аналогичных центров в крови крыс, то, судя по форме их сигнала ЭПР, регистрируемого при комнатной температуре и характеризующегося тремя значениями  $g$ -фактора ( $g_1 = 2,05$ ,  $g_2 = 2,03$ ,  $g_3 = 2,014$ ), М-ДНКЖ в крови имеет более низкую, ромбическую симметрию. При регистрации его сигнала при 77 К его форма искажается из-за эффекта «высаливания» белковых компонентов крови в ходе ее замораживания в жидком азоте, в результате чего форма сигнала ЭПР М-ДНКЖ в крови при 77 К становится близкой к сигналам ЭПР М-ДНКЖ в лимфатических узлах, печени и легких. Такого рода изменения характерны для сигнала ЭПР М-ДНКЖ, связанного с сывороточным альбумином, который, как показано в работе [4], и ответственен за сигнал с  $g_1 = 2,05$ ,  $g_2 = 2,03$ ,  $g_3 = 2,014$ , характерный для крови крыс.

Сохранение формы сигнала 2,03 в тканях лимфатических узлов, печени и легких при повышении температуры его регистрации с 77 К до комнатной свидетельствует также о малом вкладе в спектр ЭПР этих тканей сигнала ЭПР М-ДНКЖ крови, т.е. о низком содержании примесной крови в этих препаратах. Таким образом, приведенные на рисунке сигналы 2,03 следует рассматривать как сигналы ЭПР, обусловленные аксиально-симметричными М-ДНКЖ, связанными с белками тканей лимфатических узлов, печени и легких.

Результаты оценки концентрации белок-связанных ДНКЖ, появляющихся в крови, печени, лимфатических узлах и легких крыс через 2 и 4 ч после однократного введения крысам Б-ДНКЖ с глутатионом (1 группа) и через 2 и

4 ч после повторного введения этих комплексов (2 группа), приведены в таблице.

Полученные данные показывают, что при введении Б-ДНКЖ-Глт подкожно в области паховых лимфатических узлов достигается высокий уровень доставки ДНКЖ в ткань легкого. После повторного введения Б-ДНКЖ-Глт содержание белок-связанных комплексов значительно возрастает во всех тканях и остается высоким в течение 4 ч после инъекции. Таким образом, двукратное введение обеспечивает значимые концентрации белок-связанных ДНКЖ в легких на протяжении 8 ч и не создает угрозы развития гемоторакса.

Аналогичный результат был получен А.А. Тимошиным с соавторами, сопоставившими распределение Б-ДНКЖ-Глт в крови, сердце, легких, печени и почках у крыс через 2 ч после внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного или подкожного (вдали от лимфатических узлов) введения им этих комплексов в той же дозе (2 мкмоль/кг узлов) (персональное сообщение). При подкожном введении Б-ДНКЖ-Глт концентрации этих комплексов в крови, легких и печени практически были идентичными полученным в нашей работе. При других способах введения Б-ДНКЖ-Глт концентрация этих комплексов в легких через 2 ч после их введения в организм животных не превышала 3 мкмоль/кг ткани.

Как упоминалось во введении, ранее в работе [21] была изучена эффективность доставки Б-ДНКЖ с глутатионом в легкие мышей ингаляционным способом путем свободного вдыхания животными мелких капелек (диаметром 2–3 мкм) раствора с исходной концентрацией 200 мкмоль/мл в течение 0,5 ч. При этом содержание белок-связанных ДНКЖ было крайне низким и составило в легких, печени и крови, соответственно  $0,6 \pm 0,1$ ;  $0,4 \pm 0,2$  и  $0,02 \pm 0,01$  нмоль/г(мл) ткани. Через 2–3 ч после окончания ингаляции содержание этих комплексов снижалось до ЭПР-недетектируемого уровня – менее 0,001 нмоль/г ткани. И главное, обнару-

живалось резкое, опасное расширение кровеносных сосудов легких, обусловленное, по-видимому, высвобождением из Б-ДНКЖ значительного количества NO. Такого эффекта не обнаруживалось при введении Б-ДНКЖ паралимфатически, хотя концентрации белок-связанных комплексов были существенно выше.

Таким образом, есть основание полагать, что подкожное паралимфатическое двукратное введение Б-ДНКЖ-Глт является оптимальным способом их доставки в легкие, при котором создаются высокие концентрации белок-связанных комплексов. Возможно, при этих концентрациях будет наблюдаться бактерицидный эффект в отношении микобактерий туберкулеза и в отношении быстро пролиферирующих тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-00708-а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. F. Vanin, Open Conf. Proc. J. **4**, 31 (2013).
2. А. Ф. Ванин, Л. В. Адамян, Е. Н. Бургова и др., Биофизика **59**, 766 (2014).
3. A. F. Vanin, Nitric Oxide Biol. Chem. **21**, 1 (2009).
4. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **2**, 224 (1998).
5. A. F. Vanin, V. P. Mokh, V. A. Serezhenkov, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **16**, 322 (2007).
6. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **26**, 148 (2012).
7. П. И. Мордвинцев, В. Г. Руднева, А. Ф. Ванин и др., Биохимия **51**, 1851 (1986).
8. А. Б. Шехтер, Т. Г. Руденко, В. А. Сереженков и др., Биофизика **52**, 539 (2007).
9. N. Ya. Gilliano, L. V. Konevega, L. A. Noskin, et al., Nitric Oxide Biol. & Chem. **24**, 151 (2011).
10. S. Czabo, H. Ischiropoulos, and R. Radi, Nature Reviews **6**, 662 (2007).
11. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, L. V. Adamyan, et al., Eur. J. Pharmacology **727**, 140 (2013).
12. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, O. V. Paklina, et al., Eur. J. Pharmacology **741**, 37 (2014).
13. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., Free Radf. Biol. Med. **40**, 1340 (2006).
14. J. C. Crack, L. J. Smith, M. R. Stapleton, et al., J. Am. Chem. Soc. **18**, 2656 (2011).
15. J. C. Crack, J. Green, A. J. Thomson, et al., Acc. Chem. Res. **47**, 3196 (2014).
16. M. Voskuil, I. R. Bartek, K. Visconti, et al., Front. Microbiol. **2**, 1 (2011).
17. D. G. Russel, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2**, 569 (2001).
18. A. O'Carra, P. S. Redford, F. W. McNab, et al., Annu. Rev. Immunol. **31**, 475 (2013).
19. H. Ohno, G. Zhu, V. P. Mohan, et al., Cell Microbiol. **5**, 637 (2003).
20. C. Nathan and M. U. Shiloh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 8841 (2000).
21. А. Ф. Ванин, Г. Н. Можоккина, Н. А. Ткачев и др. Биофизика **58**, 295 (2013).
22. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvidkiy et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **35**, 110 (2013).
23. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem. **23**, 136 (2010).
24. N. R. Orme-Johnson, R. E. Hansen, H. Beinert, et al., J. Biol. Chem. **249**, 1922 (1974).

## Transport of Dinitrosyl Iron Complexes into Animal Lungs

G.N. Mojokina\*, N.A. Elistratova\*, V.D. Mikoyan \*\*, and A.F. Vanin \*\*

\*Research Institute of Phthisiopulmonology, Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Dostoevskogo 4, Moscow, 127994 Russia

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

Effective accumulation of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione was shown after a subcutaneous para lymphatic injection of an aqueous solution of a dinitrosyl-iron complex into animal lung tissue at a single-dose of 2 micromoles per kilogram two times a day with a 2-h interval. Two hours later after the administration was repeated the concentration of these complexes was 16 micromoles per kilogram of tissue dropping down for the last two hours to 7 micromoles per kilogram of tissue. At one dose injection of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione their concentration in 2 and 4 hours was two times lower than in the previous experiments. Presumably at the obtained concentration of dinitrosyl iron complexes a bactericidal effect in lungs can be observed against mycobacterium tuberculosis and rapidly proliferating lung tumors.

Key words: dinitrosyl iron complexes, skin wounds, NO