

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВ РАЗНООБРАЗНОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭТОГО НАПРАВЛЕНИЯ

© 2017 г. А.Ф. Ванин* **

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

**Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, 119991, Москва, Грубецкая ул., 8

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

Поступила в редакцию 27.04.17 г.

Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, возникающие в тканях животных в парамагнитной (ЭПР-детектируемой) моноядерной и диамагнитной (ЭПР-недетектируемой) биядерной формах при появлении в организме животных монооксида азота NO, обеспечивают стабилизацию и депонирование последнего (в форме белок-связанных динитрозильных комплексов железа) и его перенос (в форме низкомолекулярных динитрозильных комплексов) к мишеням биологического действия, выступая при этом не только в качестве доноров NO, но и доноров ионов нитрозолия NO⁺. Последнее определяет способность динитрозильных комплексов железа S-нитрозировать разнообразные тиолсодержащие белки, что и обеспечивает участие этих комплексов в широком спектре физиологических и биохимических процессов. В этом, как и в дозовом отношении, динитрозильные комплексы железа имитируют систему эндогенного NO. Этот факт, а также широкая распространенность данных комплексов (главным образом в диамагнитной форме) позволяют рассматривать эти комплексы в качестве «рабочей формы» NO. Предполагается, что созданные на основе этих комплексов лекарственные средства могут резко поднять эффективность современной медицины.

Ключевые слова: оксид азота, динитрозильные комплексы железа.

МОНООКСИД АЗОТА И ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

За последние 25–30 лет в биологии произошло важнейшее событие – было показано, что практически во всех представителях живого мира – человеке и животных, растениях и бактериях – непрерывно ферментативным путем продуцируется простейшее химическое соединение – монооксид азота (NO), функционирующее в этих системах в качестве одного из универсальных регуляторов различных физиологических и биохимических процессов и, кроме того, в качестве одного из основных эффекторов системы клеточного иммунитета [1–3]. Это

открывает новые пути в создании на основе NO-генерирующих соединений лекарств разнообразного терапевтического действия. Более того, цитотоксическое действие этих соединений на патогенные бактерии и микобактерии может способствовать решению проблем, которые сейчас встают в связи с потерей биологической активности многих антибиотиков. Наконец, выяснение механизма противопухолевого действия NO может обеспечить существенный прорыв в онкологии.

В организме животных и человека NO образуется в результате окисления кислородом amino/иминогруппы в гуанидиновом остатке L-аргинина, катализируемом тремя изозимами NO-синтаз (NOS) – двумя конститутивными изоформами – эндотелиальной и нейрональной NOS – eNOS и nNOS (или соответственно NOS-3 и NOS-1) и индуцибельной формой NOS (iNOS или NOS-2). В результате этого окисления из одной молекулы L-аргинина высвобождается одна молекула NO, при этом L-аргинин

Сокращения: NOS – NO-синтаза, ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ – моноядерные ДНКЖ, Б-ДНКЖ – биядерные ДНКЖ, СТС – сверхтонкая структура, МНКЖ – моноядерные комплексы железа, АД – артериальное давление.

превращается в другую аминокислоту – L-цитрулин [4].

В качестве основных мишеней биологического действия NO выступают гемсодержащие белки, взаимодействие NO с гемовым железом в которых приводит к резкому изменению биохимической активности этих белков. Наиболее известным из этих белков является гуанилатциклаза, катализирующая превращение гуанозинтрифосфата в циклический гуанозинмонофосфат [1]. В качестве широкого набора биологических мишеней NO выступают также тиолсодержащие белки [1], превращающиеся в реакции с ионизированной формой NO – ионом нитрозония (NO^+) в соответствующие S-нитрозотиолы (RS-NO). Это превращение резко усиливает эффективность реакции окисления тиоловых групп до дисульфидов, а также связывание различных биологически активных соединений с этими группами [5].

NO является свободнорадикальной молекулой. Наличие у нее одного неспаренного электрона обеспечивает высокую реакционную способность NO в реакциях с другими свободными радикалами, возникающими в живых системах и, в первую очередь, с радикалом супероксида – O_2^- . Диффузионно-контролируемая реакция NO с этим свободным радикалом с константой скорости $k = 5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ приводит к образованию пероксинитрита (ONOO^-), сравнительно устойчивого при щелочных значениях pH, но быстро распадающегося при протонировании, происходящем при физиологических значениях pH [6,7]. Высвобождающийся при этом распаде гидроксильный радикал, взаимодействующий практически со всеми внутриклеточными компонентами, определяет высокую окислительную активность и тем самым цитотоксическое действие пероксинитрита на живые системы [6,7].

Высокая эффективность реакций NO с супероксидом и другими внутриклеточными агентами в принципе может существенно снизить уровень NO в клетках и тканях. Для предотвращения этого Природа использует способность NO обратимо включаться в различные соединения, более устойчивые в живых системах по сравнению со свободным NO. Первый класс этих соединений уже упоминался выше – это S-нитрозотиолы (RS-NO). Другой класс подобных соединений – динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами. В живых системах они представлены двумя формами – моноядерной (содержащей один атом железа) – М-ДНКЖ и биядерной (содержащей два атома железа) – Б-ДНКЖ, характеризующимися формулами $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]$ и

$[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}_2^+(\text{NO}^+)_4]$ соответственно. М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами парамагнитны с $S = 1/2$ [8–13].

Сигнал ЭПР этих комплексов, зарегистрированный нами еще в 1964–1967 гг. сначала в дрожжевых клетках, а затем в тканях животных [14–17], приводится на рис. 1. Одновременно с нами этот сигнал был зарегистрирован английскими исследователями Дж. Мэллардом и М. Кентом [18] и группой Б. Коммонера в США [19] в карциноме печени крыс, индуцированной различными гепатоканцерогенами. Как следует из рис. 1, английские исследователи наблюдали лишь слабый пик при $g = 2,03$, тогда как американские исследователи регистрировали более интенсивный пик при тех же значениях g -фактора, причем этот пик появлялся в печени крыс через две недели после введения животным соответствующего гепатоканцерогена и затем через последующие две недели не обнаруживался. Отмечу, что, в отличие от английских и американских исследователей, только нам удалось уже при первом обнаружении центров, ответственных за сигнал при $g = 2,03$, зарегистрировать этот сигнал в полной его форме.

Этот сигнал, характеризующийся значениями g -фактора $g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,014$, $g_{\text{ср}} = 2,03$ и названный нами в соответствии со средним значением g -фактора сигналом 2,03 был «перезоткрыт» в 90-е годы прошлого века, после того как была установлена роль монооксида азота как универсального регулятора биологических процессов. Сигнал был зарегистрирован в клетках и тканях животных различного типа, способных продуцировать NO из L-аргинина [20–33]. В качестве примера этого «перезоткрытия» на рис. 1д приводится запись сигнала 2,03 в активированных макрофагах животных, продуцирующих NO из L-аргинина при участии iNOS [20].

Еще в 60-е годы прошлого века нами было обнаружено, что при повышении температуры регистрации сигнала 2,03 от низких температур (например, от температуры жидкого азота) до комнатной температуры форма этого сигнала, регистрируемого, например, в дрожжевых клетках, не меняется (рис. 2) [17]. Она определяется анизотропией g -фактора, и ее сохранение при комнатной температуре регистрации сигнала 2,03 однозначно свидетельствует о белковой природе М-ДНКЖ, ответственных за этот сигнал, т.е. о включении белковых тиолсодержащих групп цистеиновых остатков в эти комплексы.

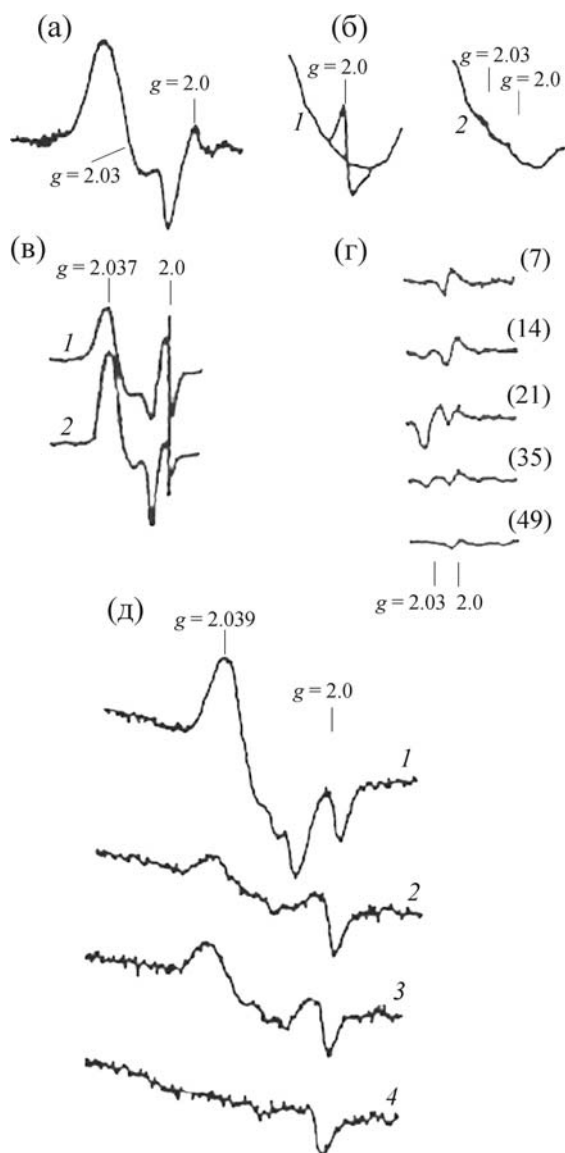


Рис. 1. (а)–(г) – Регистрация в 1960-е годы сигнала 2,03 в высушенных дрожжах [14,15] (а), в химически индуцированной гепатоме крыс [18] (б, спектр 1), в печени голубя и кролика [19] (в, спектры 1 и 2 соответственно) [16] и химически индуцированной гепатоме крыс (г) (указаны сутки после введения гепатоканцерогена); (д) – регистрация сигнала 2,03 в 1990 г. в активированных макрофагах животных в присутствии L-аргинина (спектр 1), в присутствии L-аргинина с ингибитором NOS N-метил-L-аргинином (спектр 2), в неактивированных (контрольных) макрофагах (спектр 3) и в контрольных макрофагах в присутствии ингибитора NOS (спектр 4) [20]. Сигналы ЭПР, приведенные на рис. (б), (в) и (д), зарегистрированы при 77 К, на рис. (а) и (г) – при комнатной температуре.

Низкая подвижность белковой глобулы, включающей в себя М-ДНКЖ, недостаточна для усреднения анизотропии g -фактора, как это имеет место для низкомолекулярных аналогов М-ДНКЖ, например, М-ДНКЖ с цистеином

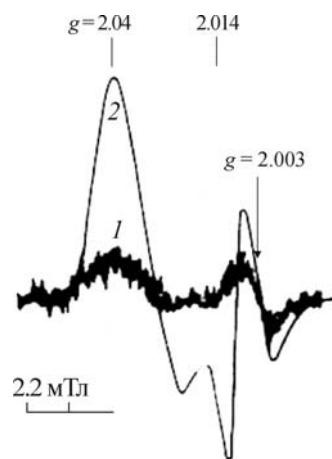


Рис. 2. Сигнал 2,03, зарегистрированный при комнатной температуре во влажных (спектр 1) и высушенных (спектр 2) дрожжах [17].

или глутатионом (рис. 3). При комнатной температуре регистрации эти комплексы дают узкий симметричный сигнал с центром при $g = 2,03$ и тринадцатикомпонентной сверхтонкой структурой (СТС) (рис. 3г), обусловленной сверхтонким взаимодействием неспаренного электрона с ядрами азота ^{14}N (со спином ядра $I = 1$) двух NO-лигандов и с четырьмя протонами ($I = 1/2$) метиленовых групп двух цистеиновых лигандов. При замене ^{14}N на ^{15}N ($I = 1/2$) тринадцатикомпонентная СТС заменяется на девятикомпонентную (рис. 3е). Расшифровка этих СТС приведена с правой стороны рис. 3г,е. При понижении температуры регистрации, например, до температуры жидкого азота, низкомолекулярные М-ДНКЖ дают сигнал ЭПР, совпадающий по форме с сигналом 2,03, регистрируемым в клетках и тканях (рис. 3а–в,д). Именно это совпадение, обнаруженное нами еще в 60-е годы прошлого века [34], позволило идентифицировать парамагнитные центры, ответственные за сигнал 2,03 в живых системах (комплексы 2,03), как М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [8,9,16]. Такая идентификация была подтверждена опытами, в которых при воздействиях на комплексы 2,03 и низкомолекулярные М-ДНКЖ хелаторов железа, блокаторов тиоловых групп, соединений, способных замещать эти группы в нитрозильных комплексах железа и т.п., сигналы ЭПР изменялись в обоих случаях одинаковым образом [16].

Идентификация комплексов 2,03 как М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами была подтверждена и опытами по обработке изолированных тканей животных и дрожжевых клеток газообразным NO, а также при введении нитрита как донора NO в питьевую воду жи-

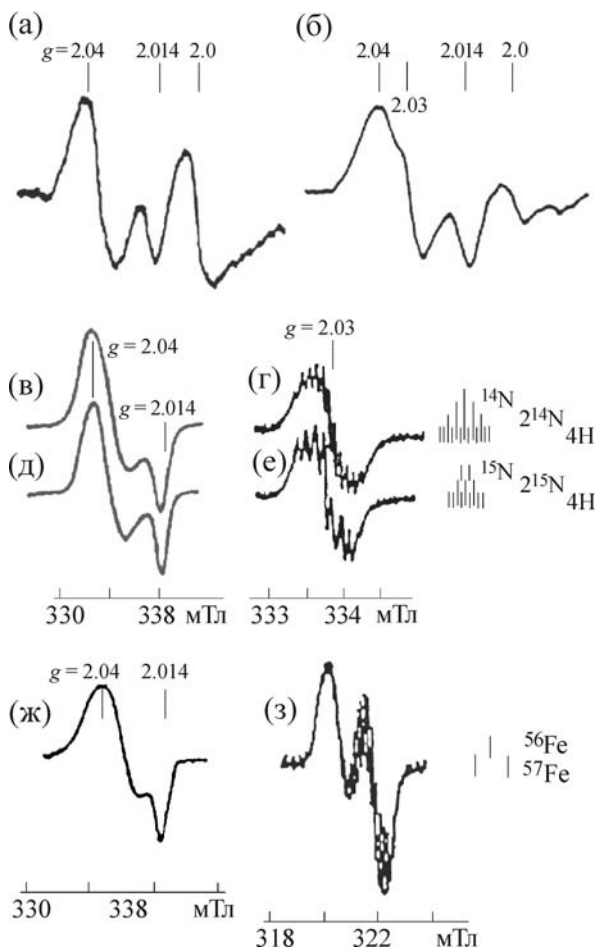


Рис. 3. Сигнал 2,03, зарегистрированный во влажной печени кролика (а) и влажных дрожжах (б) [36], и ЭПР-спектры растворов ДНКЖ с цистеином, содержащих ^{14}NO (в,г), ^{15}NO (д,е) или ^{57}Fe (ж,з). Запись проведена при комнатной температуре (а,б,г,е,з) или 77 К (в,д,ж). Справа приведена расшифровка сверхтонкой структуры, характерной для растворов ДНКЖ с цистеином. Сверхтонкое взаимодействие с двумя ядрами азота ^{14}N ($I = 1$) или ^{15}N ($I = 1/2$) дает соответственно квинтетную или триплетную сверхтонкую структуру, которая подрасщепляется соответственно на 13 и 9 линий сверхтонкой структуры из-за сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона с четырьмя протонами метиленовых групп двух цистеиновых лигандов [9,34,35].

вотным или в среду культивирования дрожжей: во всех этих опытах в тканях животных и дрожжах было зарегистрировано образование комплексов 2,03 (рис. 4) [37]. Более того, при введении в питьевую воду наряду с нитритом изотопа железа ^{57}Fe ($I = 1/2$) обнаруживалось уширение сигнала 2,03, обусловленное СТС от ядра ^{57}Fe , точно такое же, как для сигнала ЭПР М-ДНКЖ с цистеином при замещении в нем обычного железа ^{56}Fe на ^{57}Fe (рис. 3ж и рис. 4а,в) [37]. При регистрации сигнала ЭПР

этого низкомолекулярного комплекса при комнатной температуре обнаруживалось дублетное сверхтонкое расщепление, свидетельствующее о наличии в М-ДНКЖ только одного атома железа (рис. 3ж, 4д).

Проведенные в последние годы исследования показали, что комплексы 2,03 (М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами) возникают преимущественно в клеточных культурах, способных продуцировать NO [38–42]. Что касается тканей животных, в них преимущественно образуется диамагнитная (ЭПР-невидимая) форма ДНКЖ – Б-ДНКЖ [43,44]. С точки зрения химической номенклатуры эти комплексы представляют собой тиоэфиры красной (биядерной) соли Руссена, впервые синтезированной этим французским химиком еще в середине XIX века. Эта соль включает в себя два железо-динитрозильных фрагмента, связанных двумя мостиковыми лигандами – атомами неорганической серы [45].

М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами находятся в химическом равновесии: при избытке тиолов в растворе Б-ДНКЖ переходят в М-ДНКЖ, при недостатке тиолов происходит обратное превращение (схема 1):

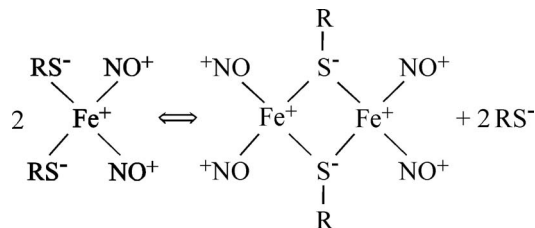


Схема 1. Химическое равновесие между М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [45].

Есть основание полагать, что диамагнетизм Б-ДНКЖ обусловлен спариванием спинов железо-динитрозильных фрагментов по серным мостикам («антиферромагнитным взаимодействием») [45]. При разрыве этих мостиков, т. е. при распаривании этих фрагментов, их раствор снова становится парамагнитным, причем в зависимости от указанного воздействия на Б-ДНКЖ могут возникать не только М-ДНКЖ, но и парамагнитные (ЭПР-активные) мононитрозильные моноядерные комплексы железа (МНКЖ). Такое превращение реализуется, например, при действии на Б-ДНКЖ (и также на М-ДНКЖ) производных дитиокарбаматов, например диэтилдитиокарбамата (схема 2), способных акцептировать железо-мононитрозильную группу из железо-динитрозильных фрагментов М- или Б-ДНКЖ:

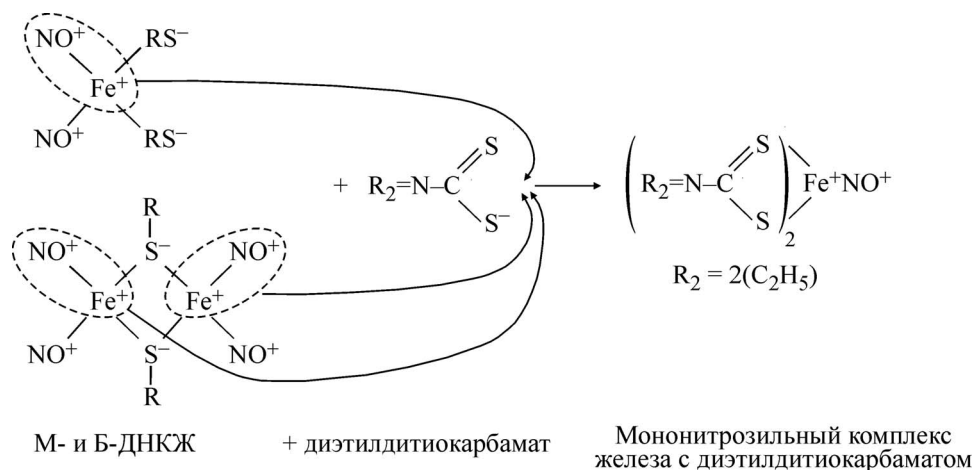


Схема 2. Превращение Б- или М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в парамагнитные мононитрозильные комплексы железа с ДЭТК [43,44].

Сигналы ЭПР МНКЖ с производными дитиокарбамата характеризуются (даже при их регистрации при низкой температуре) наличием хорошо разрешенной триплетной СТС, обусловленной сверхтонким взаимодействием неспаренного электрона с ядром азота нитрозильного лиганда, связанного с железом (рис. 5а) [46]. При замене в МНКЖ ^{56}Fe на ^{57}Fe эта СТС усложняется из-за появления дополнительной дублетной СТС от ядра ^{57}Fe (рис. 5в). При регистрации сигнала ЭПР этих комплексов при комнатной температуре изотопная замена железа приводит к замене симметричной триплетной СТС, характерной для МНКЖ с ^{56}Fe , на квадруплетную СТС (рис. 5б,г) [46].

Именно использование способности производных дитиокарбамата превращать диамагнитные Б-ДНКЖ в парамагнитные, ЭПР-видимые МНКЖ, позволило нам в последнее время показать, что в тканях животных при появлении в них NO возникают преимущественно Б-ДНКЖ, причем в концентрации, сопоставимой с количеством NO, т.е. практически полном его включении в эти комплексы [43,44]. Этот факт явился для нас последним аргументом для того, чтобы объявить ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами «рабочей формой» NO в живых системах [13]. Это заявление основывается еще и на том, что по своей биологической активности – по ее разнообразию и дозовому

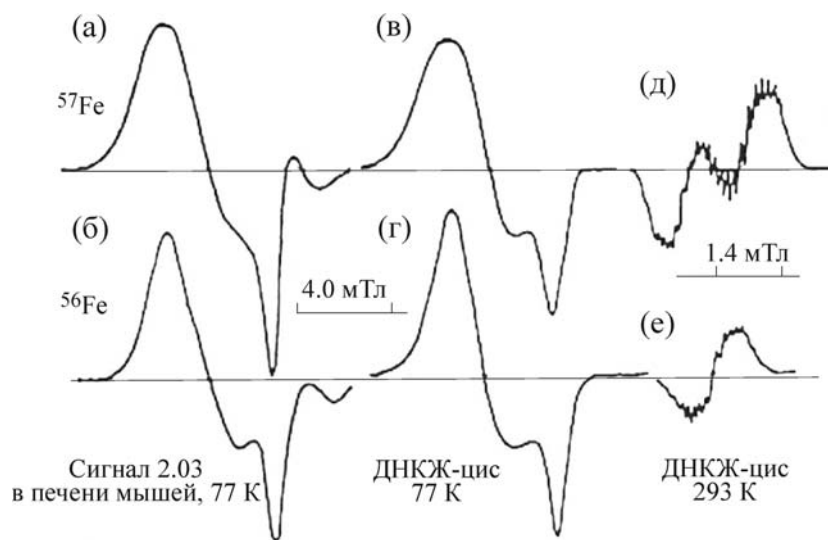


Рис. 4. Спектры ЭПР печени мышей, находившихся на питьевой диете с нитритом и цитратным комплексом железа ^{57}Fe (а) или ^{56}Fe (б) и М-ДНКЖ с цистеином и ^{57}Fe (в,г) или ^{56}Fe (д,е). Запись при 77 К (а-г) или при комнатной температуре (д,е) [37].

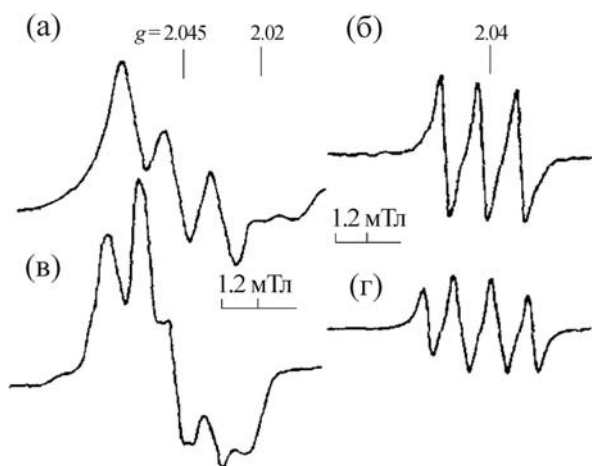


Рис. 5. Сигналы ЭПР МНКЖ с диэтилдитиокарбамамом с ^{56}Fe (а,б) или с ^{57}Fe (в,г), зарегистрированные при 77 К (а,в) или при комнатной температуре (б,г) [46].

выражению эти комплексы имитируют биологическую активность системы NO, продуцируемого в клетках и тканях животных ферментативным путем [13].

При дальнейшем изложении материала я постараюсь показать, каким образом физико-химические характеристики ДНКЖ определяют их биологическую активность, т. е. способность выступать в живых системах в качестве доноров NO и NO^+ , и какие перспективы могут открыться при использовании этих комплексов в качестве основы для создания новых лекарств разнообразного терапевтического действия.

ФИЗИКО-ХИМИЯ ДНКЖ, ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ ИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Первое представление об электронной структуре можно получить исходя из анализа механизма образования парамагнитных М-ДНКЖ. Дело в том, что эти комплексы могут возникать при воздействии газообразного NO на водные растворы (при нейтральных значениях pH), содержащие двухвалентное железо и тиолы. Сразу же возникает вопрос, каким образом взаимодействие двух молекул NO с двухвалентным железом, в результате чего возникает комплекс с четным числом ($n = 6$) неспаренных электронов – по два от нитрозильных лигандов и четыре – от железа, приводит к образованию парамагнитных железо-динитрозильных фрагментов с $S = 1/2$? Это превращение, согласно предложенной нами схеме 3, может происходить следующим образом [9,11,45]:

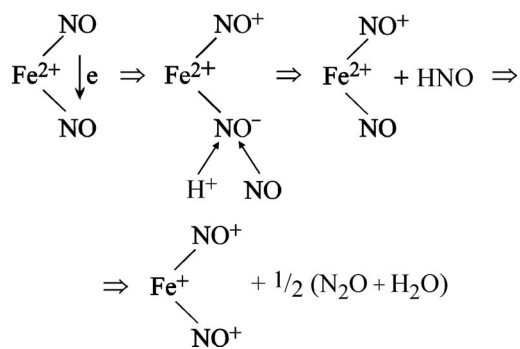
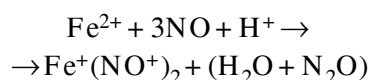


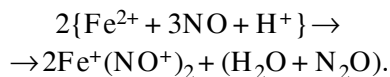
Схема 3.

Суммарная реакция:



или

(Реакция 1)



Предполагается, что при связывании двух молекул NO с ионом Fe^{2+} эти свободно-радикальные молекулы включаются в реакцию диспропорционирования, т.е. в реакцию взаимного окисления-восстановления с переходом в ионные формы – в ион нитрозония (NO^+) и ион нитроксила (NO^\bullet). Последний после протонирования выходит в форме молекулы нитроксила (HNO) из координационной сферы железа с последующим превращением HNO в реакции дисмутации с другой молекулой нитроксила в закись азота и воду. Его место у железа занимает другая молекула NO, что и приводит к образованию М-ДНКЖ, характеризующегося преимущественной локализацией неспаренного электрона на атоме железа (с электронной конфигурацией d^7) и незначительной локализацией неспаренной электронной плотности на нитрозильных лигандах. Таким образом, в ходе этих процессов образуются железо-динитрозильные фрагменты, в которых распределение неспаренной электронной плотности описывается формулой $\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2$.

В водных растворах ионы нитрозония в высшей степени неустойчивы – они мгновенно гидролизуются, превращаясь в анионы нитрита, так что железо-динитрозильный фрагмент в воде сам по себе существовать не может. Его стабилизация обеспечивается подключением к фрагменту тиолсодержащих лигандов. Высокая π -донорная активность атомов тиоловой серы, обеспечивающая перенос электронной плотности от этих атомов на нитрозильные лиганды,

приводит к снижению положительного заряда на этих лигандах и тем самым к ослаблению их взаимодействия с ионами гидроксила. В результате эффективность гидролиза нитрозильных лигандов резко снижается, что и обеспечивает сохранение М-ДНКЖ в водной среде [47].

При установлении химического равновесия между этими комплексами и составляющими их компонентами, в ходе которого нитрозильные и тиолсодержащие лиганды выходят из координационной сферы железа, один электрон переходит с атома железа на один из нитрозильных лигандов, в результате чего это равновесие характеризуется уравнением, приводимым на схеме 4 [9,45,47]:

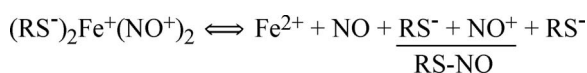


Схема 4.

Таким образом, в ходе установления химического равновесия между М-ДНКЖ и составляющими его компонентами, сопровождающегося переходом электронной конфигурации железа d^7 в d^6 -конфигурацию (Fe^{2+} -состояние), эти комплексы могут выступать в качестве доноров NO и NO^+ . Наличие последнего может обеспечивать образование S-нитрозотиолов ($RS-NO$), что подтверждается исследованиями, проведенными на клеточных культурах, способных продуцировать NO [40,48]. Накопление в них $RS-NO$ коррелировало с образованием М-ДНКЖ. Этот процесс прекращался в присутствии хелаторов железа, затруднявших образование М-ДНКЖ.

Очевидно, что в водном растворе ионы гидроксила могут выступать в качестве эффективных конкурентов тиоловых групп в их реакции с ионами нитрозония. Эта конкуренция может резко ослабляться при понижении pH в кислую сторону, что действительно имеет место для водных растворов Б-ДНКЖ с глутатионом при pH, равных 1–2, и наличии в растворе свободного (не включенного в ДНКЖ) глутатиона [49]. Что касается внутриклеточной среды, представляющей собой сложную смесь гидрофильных и гидрофобных соединений, процесс образования в ней $RS-NO$, инициируемый ДНКЖ [40,48], может, очевидно, реализоваться в нормальных (непатогенных) условиях.

При установлении химического равновесия между М-ДНКЖ и составляющими его компонентами, сопровождающемся переходом исходной электронной конфигурации d^7 в d^5 -конфигурацию (Fe^{3+} -состояние), железо-динитрозиль-

ные фрагменты могут в соответствии со схемами 5 и 6 выступать не только в качестве доноров NO и ионов нитрозония, но и в качестве доноров ионов нитроксила, инициирующих образование закиси азота (N_2O) [50]:

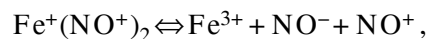


Схема 5.

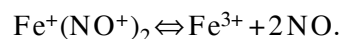
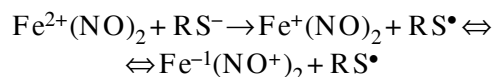


Схема 6.

Таким образом М-ДНКЖ с d^7 -электронной конфигурацией железа или, согласно классификации Энемарка–Фелтгама, принимающей в расчет суммарное число электронов на d -орбиталях железа и на верхних π -орбиталях нитрозильных лигандов [51], электронной конфигурации М-ДНКЖ, описываемой как $[Fe(NO_2)]^7$, может выступать в биосистемах преимущественно в качестве доноров NO и NO^+ .

Иная ситуация имеет место, если придерживаться мнения, что железо в М-ДНКЖ характеризуется d^9 -электронной конфигурацией или, согласно классификации Энемарка–Фелтгама, М-ДНКЖ находятся в электронной конфигурации $[Fe(NO_2)]^9$ [52–55]. Согласно работе [55], переход М-ДНКЖ в такую конфигурацию может инициироваться одноэлектронным восстановлением исходных комплексов $Fe^{2+}(NO)_2$, возникающих в растворах двухвалентного железа, обработанных газообразным NO (схема 7):



или

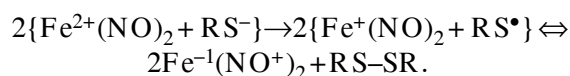


Схема 7.

Это восстановление может обеспечиваться присутствующими в растворе тиолами (RS^-). В результате исходная d^8 -электронная конфигурация железа в этих комплексах повышается до d^9 , т.е. до нечетного числа электронов на верхних орбиталях железа, что и обеспечивает парамагнетизм (ЭПР-активность) М-ДНКЖ.

В этом случае в зависимости от перехода исходной d^9 -электронной конфигурации в конфигурации d^6 или d^5 (соответствующие Fe^{2+} - или Fe^{3+} -состояниям железа) химическое рав-

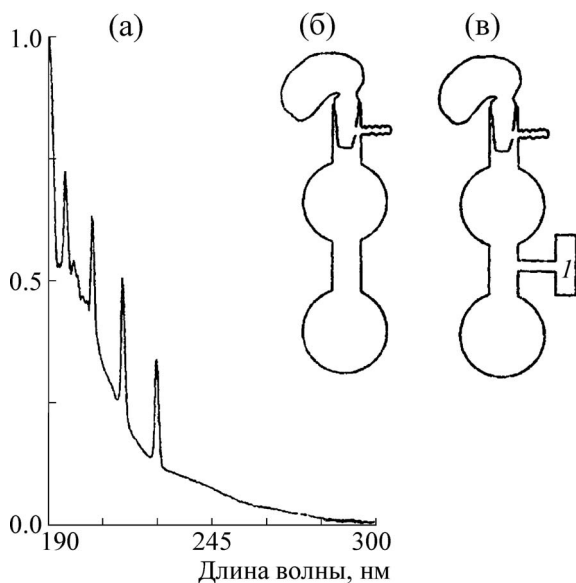


Рис. 6. Суммарный спектр поглощения NO_2 (широкое бесструктурное оптическое поглощение) и NO (четыре узких эквидистантных полосы) в газовой фазе (а); аппараты Тунберга, используемые для синтеза ДНКЖ (б) или для измерения спектров поглощения NO и NO_2 в газовой фазе (в) с использованием кварцевой цилиндрической кюветы (1) [50].

новесие между железо-динитрозильными фрагментами и составляющими их компонентами должно в соответствии со схемами 8 и 9 описываться следующим образом [50]:

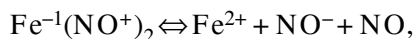


Схема 8.

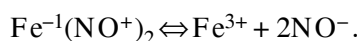


Схема 9.

Таким образом, М-ДНКЖ, характеризующиеся d^9 -электронной конфигурацией железа ($[\text{Fe}(\text{NO}_2)]^9$ по классификации Энемарка–Фелтгама), не могут выступать в качестве доноров ионов нитрозония, т.е. инициировать S-нитрозирование тиолов, что в свете имеющихся данных о механизме этого процесса, протекающего в клетках и тканях [40,48], делает предположение о $[\text{Fe}(\text{NO}_2)]^9$ электронной конфигурации М-ДНКЖ весьма проблематичным. Как следует из схем 8 и 9, М-ДНКЖ в этой электронной конфигурации выступает скорее в качестве доноров ионов нитроксила, т.е. закиси азота («вселяющего газа»), а не монооксида азота.

Итак, электронная структура М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, характеризую-

щаяся распределением в этих комплексах неспаренной электронной плотности как $(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2$, является, по-видимому, адекватной реальной ситуации с участием этих комплексов в биологических процессах. Что касается биядерной формы ДНКЖ, то ее включение в эти процессы происходит, очевидно, после превращения в М-ДНКЖ, происходящего в соответствии с приведенной выше схемой 1.

ДВА СПОСОБА СИНТЕЗА М- И Б-ДНКЖ С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

В настоящее время синтез водорастворимых М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, в частности с природными тиолами – цистеином, глутатионом или тиолсодержащими белками, осуществляется либо обработкой растворов тиолов и двухвалентного железа газообразным NO , либо в реакции смеси двухвалентного железа и тиолов с S-нитрозотиолами как донорами NO . Детально эти методы изложены в нашем методологическом обзоре [50]. Кратко их суть сводится к следующему. Синтез ДНКЖ с разнообразными тиолсодержащими соединениями с использованием газообразного NO проводится в аппарате Тунберга, приведенном на рис. 6б. В верхнюю его часть вводится раствор двухвалентного железа, в нижнюю – раствор тиола в НЕРЕС-буфере при нейтральном значении рН. После вакуумирования аппарата в него под давлением 100–150 мм рт. ст. подается газообразный NO , полученный в реакции Fe^{2+} с нитритом в растворе HCl и очищенный от примеси NO_2 методом низкотемпературной сублимации. После двух–трех минут встряхивания аппарата, приводящего к образованию в верхней части аппарата мононитрозильного комплекса двухвалентного железа, раствор последнего смешивается с раствором тиола, что и приводит после трех–пяти минут встряхивания аппарата к образованию ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. После откачки NO из аппарата этот комплекс может быть использован в соответствующих экспериментах.

При исходном молярном соотношении $\text{Fe}^{2+} : \text{тиол} = 1 : 2$ ДНКЖ, получаемые в ходе этого синтеза, представлены только их диамагнитной биядерной Б-ДНКЖ-формой, спектр поглощения которой (на примере Б-ДНКЖ с глутатионом) приводится на рис. 7а. В спектре представлены две основные полосы поглощения на 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции ϵ , равными 4600 и 3700 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (в пересчете на один $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -фрагмент в этих комплексах) [45]. Кроме того, в спектре представлены более сла-

бые полосы в длинноволновой части спектра (рис. 7, врезка в верхней части рисунка). По мере повышения исходного уровня тиолов кроме Б-ДНКЖ начинает образовываться и парамагнитная моноядерная М-ДНКЖ-форма. Однако ее доля при нейтральных значениях рН раствора остается существенно меньше доли Б-ДНКЖ. Так, при синтезе ДНКЖ с глутатионом при исходном соотношении Fe^{2+} : глутатион = 1 : 10 количество железа, включившегося в М-ДНКЖ, не превышает 10% от общего содержания железа в ДНКЖ. При аналогичном соотношении железа и цистеина доля М-ДНКЖ возрастает до 30%. Она резко возрастает (практически до 100%) при подщелачивании раствора до рН 10–11. При этом спектр поглощения, характерный для Б-ДНКЖ, трансформируется в спектр М-ДНКЖ с полосой поглощения на 390 нм с $\epsilon = 3900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (рис. 7б) [45]. Кроме того, комплекс дает сигнал 2,03, приведенный на том же рисунке в нижней части. Сигнал 2,03, но существенно меньшей интенсивности, обнаруживается и в смеси Б- и М-ДНКЖ при нейтральных значениях рН [45].

Аппарат Тунберга с присоединенной к нему цилиндрической кварцевой кюветой (рис. 6в) может быть использован для оценки примеси NO_2 в газообразном NO , используемом для синтеза М- и Б-ДНКЖ, по характерным для этих газов спектрам оптического поглощения. В коротковолновой области NO_2 дает широкую интенсивную полосу (см. рис. 6а), тогда как газообразный NO дает в этой области четыре узких эквидистантных полосы. Более того, по амплитуде этих полос можно оценить концентрацию NO , как это было сделано нами в работе [56].

Синтез ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами с использованием в качестве донора NO S-нитрозотиола возможен только на основе S-нитрозоглутатиона (GS-NO) как наиболее стабильного из S-нитрозотиолов, получаемых при смешивании тиолов и нитрита в кислой водной среде. Вкратце синтез ДНКЖ на основе GS-NO сводится к следующей, довольно простой процедуре, заключающейся, например, в следующем. К 15 мМ раствору HEPES-буфера, рН 7,4, добавляется последовательно глутатион, ферросульфат железа и затем нитрит в молярном соотношении 2 : 1 : 1, например 20 мМ глутатиона и по 10 мМ соли железа и нитрита [50,57]. Добавление в указанный раствор HEPES-буфера глутатиона приводит к снижению рН раствора до 3,0–3,5, при этих значениях дальнейшее введение соли двухвалентного железа приводит к его растворению без образо-

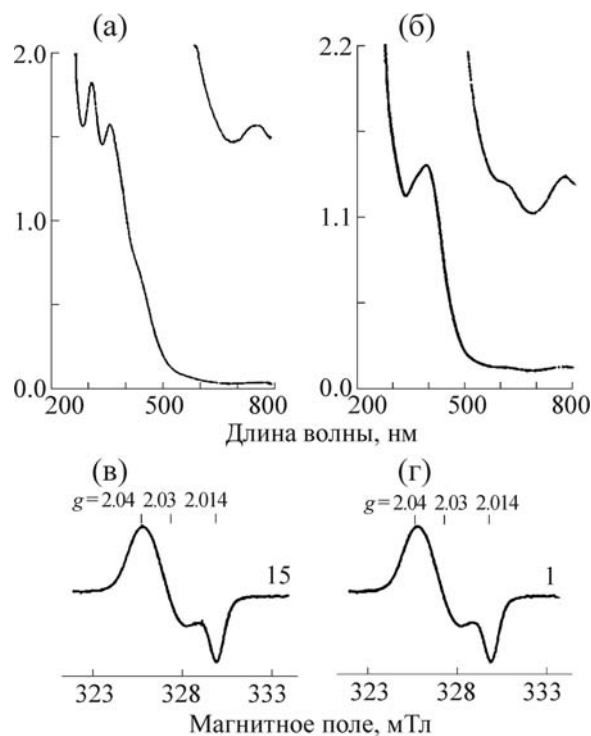


Рис. 7. Спектры поглощения Б-ДНКЖ (а) и М-ДНКЖ (б) с глутатионом; (в), (г) – сигналы 2,03, зарегистрированные в растворах этих комплексов при 77 К. На врезках на рис. (а) и (б) приводятся слабые полосы поглощения комплексов в диапазоне 500–800 нм. На рис. (в) и (г) справа у кривых указано усиление радиоспектрометра ЭПР в относительных единицах. Б-ДНКЖ был синтезирован в 15 мМ HEPES-буфере, рН 7,4 с использованием газообразного NO при исходном соотношении Fe^{2+} : глутатион = 1 : 5. М-ДНКЖ получен подщелачиванием раствора Б-ДНКЖ до рН 11,0 [45].

вания водонерастворимых гидроокисных комплексов железа. Кроме того, кислотный характер полученного раствора обеспечивает образование GS-NO после добавления в него нитрита натрия. Раствор при этом приобретает красную окраску, обусловленную образованием GS-NO . Этот процесс обычно заканчивается через один–полтора часа после добавления к раствору нитрита. После этого величина рН раствора повышается до нейтральных значений, обеспечивающих превращение GS-NO в соответствии со схемой 10 в М-ДНКЖ с глутатионом с последующей димеризацией этих комплексов в Б-ДНКЖ.

В эти комплексы включается половина исходного двухвалентного железа. Остальная его часть, не включившаяся в ДНКЖ, выпадает из раствора в форме нерастворимых гидроокисных комплексов железа. Для полного осаждения последних необходимо выдерживать полученные

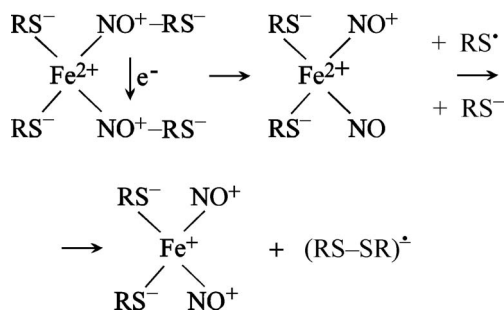


Схема 10.

растворы при комнатной температуре в течение ночи с последующим удалением осадка на фильтровальной бумаге.

Полученные таким путем Б-ДНКЖ с глутатионом можно превратить в смесь М- и Б-ДНКЖ с другими тиолсодержащими лигандами, добавляя в полученные растворы Б-ДНКЖ с глутатионом соответствующие тиолы, например, в десятикратном их избытке по отношению к количеству Б-ДНКЖ с глутатионом.

Следует отметить, что ранее при синтезе на основе Б-ДНКЖ с глутатионом лекарственного гипотензивного средства «Оксаком», включающего в себя в качестве наполнителя декстран [58], GS-NO смешивали с раствором глутатиона и ферросульфата не при кислых, а при нейтральных значениях pH. Для предотвращения осаждения соли железа в форме водонерастворимых гидроокисных комплексов в растворы вводили цитрат натрия, образующий с солью железа достаточно прочный комплекс. Оказалось, что после контакта этих комплексов с GS-NO только часть железа высвобождалась из этих комплексов для участия в образовании Б-ДНКЖ. Остальная часть железа оставалась связанной с цитратом и тем самым не участвовала в реализации гипотензивного действия препарата «Оксаком» на животных и человека.

Точно такая же ситуация реализуется, если при синтезе ДНКЖ с глутатионом на основе GS-NO использовать соотношение количества глутатиона : Fe²⁺ : нитрит существенно большее, чем 2 : 1 : 1, например 20 : 1 : 1. Избыток глутатиона в этом случае будет препятствовать последующему осаждению железа в форме гидроокисных комплексов, поскольку глутатион, подобно цитрату, будет как хелатор железа конкурировать за него с ионами гидроксила. В результате в полученном растворе будет представлена смесь растворенных в воде ДНКЖ с глутатионом и комплексов железа с глутатионом.

М- И Б-ДНКЖ С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ КАК РЕГУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

Включение NO в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами примерно на три порядка (как это показано для белок-связанных ДНКЖ) снижает константу скорости реакции NO с анионами супероксида [59], обеспечивая тем самым сохранение NO в живых системах и его перенос на значительные расстояния как между клетками в одной ткани, так и между разными тканями. Сами по себе эти комплексы характеризуются высокой стабильностью, зависящей от природы тиолсодержащего лиганда. Все это приводит к тому, что при перемещении этих комплексов (речь идет об их низкомолекулярной форме) в клетках и тканях, они самопроизвольно «не теряют» NO, а передают его (а также ионы нитрозония) в соответствии с характерным для М-ДНКЖ химическим равновесием, приведенным на схеме 4, на соединения, характеризующиеся более высоким сродством к NO или NO⁺: на соответствующие мишени биологического действия последних – гем-содержащие или тиолсодержащие белки. Это и лежит в основе функционирования эндогенных и экзогенных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами как доноров NO и NO⁺.

Как следует из предыдущего параграфа, эти комплексы достаточно просто синтезируются химическим путем, их можно получать в значительном количестве в лабораторных условиях, сохраняя либо в замороженном состоянии, либо в форме лиофильно высушенных препаратов, и далее использовать в экспериментах на животных для оценки биологического действия этих комплексов.

В настоящее время накоплен значительный материал, приведенный в табл. 1, свидетельствующий о способности ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами оказывать разнообразное биологическое действие регуляторного характера не только на животных, но и на растения.

В настоящем обзоре я остановлюсь только на двух проявлениях биологической активности ДНКЖ, конкретно Б-ДНКЖ с глутатионом – его гипотензивной активности и способности ускорять заживление кожных ран.

Гипотензивная активность ДНКЖ. Гипотензивная активность ДНКЖ определяется его высокоэффективным вазодилаторным действием на кровеносные сосуды. В качестве иллюстрации на рис. 8 и 9 приведено вазодилатирующее действие ДНКЖ с цистеином и глутатионом *in vitro* на предварительно сокращенные норад-

Таблица 1. Регуляторное действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на различные биологические процессы

№	Название процесса	Ссылки
1	Мощное вазодилаторное и гипотензивное действие	[58,60–68]
2	Подавление агрегации тромбоцитов	[69–71]
3	Противогипоксическое действие на миокард	[72]
4	Повышение эластичности эритроцитов	[73]
5	Ускорение заживления кожных ран	[74,75]
6	Повышение выживаемости животных при геморрагии	[67]
7	Пенил-эректильное действие	[76]
8	Снижение размеров некротической зоны при экспериментальном инфаркте миокарда	[77]
9	Антиапоптотическое действие на культуру нормальных клеток животных и человека	[78,79]
10	Активация/подавление активности некоторых генов	[80–89]
11	Повышение усвоения железа растениями, пораженными ржой	[90]

реналином кольцевые сегменты абдоминальной аорты крыс с сохраненным эндотелием [64].

ДНКЖ с цистеином были синтезированы с использованием газообразного NO при исходных соотношениях $\text{Fe}^{2+} : \text{Cys}$, равных 1 : 2 или 1 : 20. Быстрое восстановление тонуса сосудов при вазодилаторном действии на них ДНКЖ–Cys (1 : 2) было обусловлено быстрым распадом этих комплексов с последующим быстрым окислением высвобождающегося из них NO. Что

касается медленного восстановления тонуса сосудов при действии на них ДНКЖ–Cys (1 : 20), то, как показали последующие исследования [91], это было обусловлено превращением М- и Б-формы ДНКЖ с цистеином в тетрамерную форму этих комплексов, представляющих собой тиозиферы цистеина и черной (четырёхядерной) формы комплексов Руссена. Высокая стабильность этих комплексов обеспечивала их длительное вазодилаторное действие.

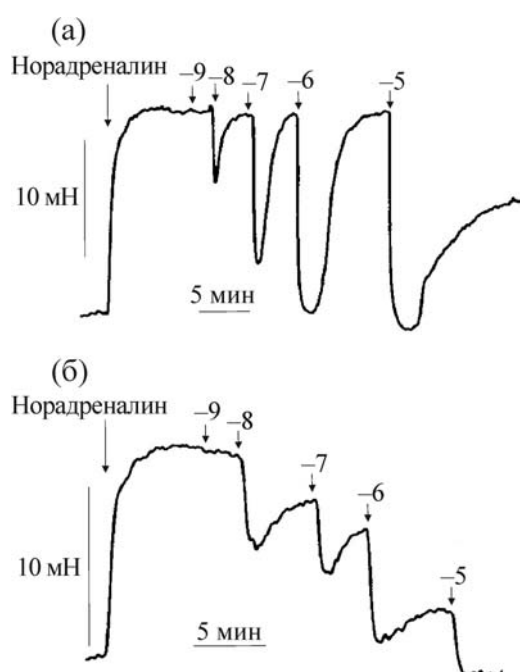


Рис. 8. Вазорелаксирующее действие ДНКЖ с цистеином в соотношении 1 : 2 (а) и 1 : 20) (б) в дозах от 1 нМ до 10 мкМ на кольцевые сегменты абдоминальной аорты крыс с сохраненным эндотелием, предварительно сокращенных норадреналином (10^{-7} М) [64].

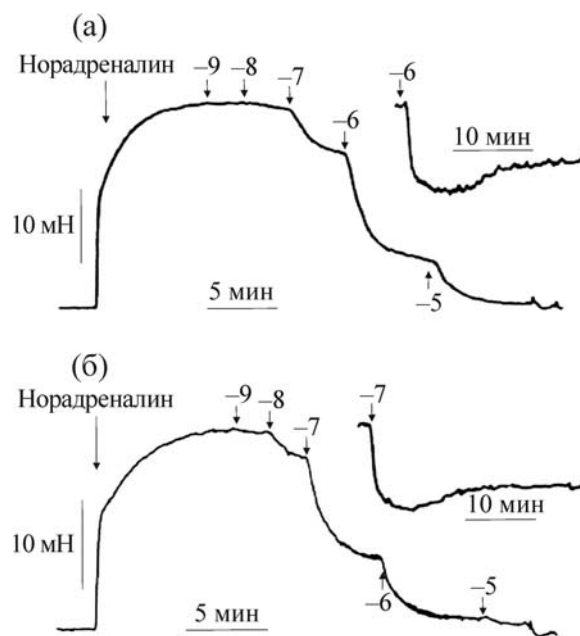


Рис. 9. Вазорелаксирующее действие ДНКЖ с глутатионом в соотношении 1 : 2 (а) или нитропруссидом натрия (б) в дозах от 1 нМ до 10 мкМ на кольцевые сегменты абдоминальной аорты крыс с сохраненным эндотелием, предварительно сокращенные норадреналином (10^{-7} М). На врезках показана длительная вазодилатация, индуцированная ДНКЖ (1 мкМ) или нитропруссидом натрия (0,1 мкМ) [64].

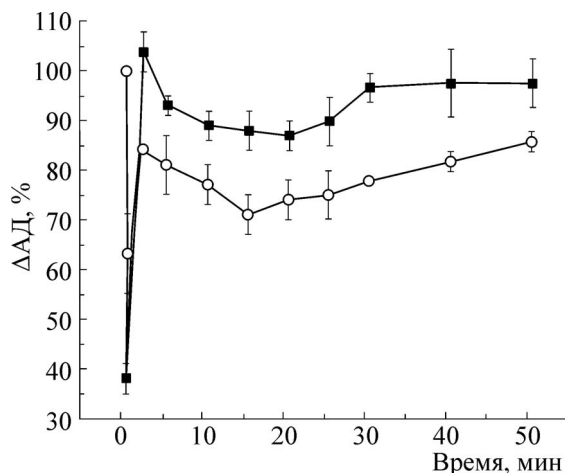


Рис. 10. Гипотензивное действие ДНКЖ с цистеином в соотношении 1 : 2 при его однократном внутривенном введении в дозе 2,74 мкмоль/кг наркотизированным (квадраты) или бодрствующим (кружки) крысам SHR. По оси ординат – изменение среднего артериального давления в процентах к исходной величине [66].

Аналогичным образом высокая стабильность Б-ДНКЖ с глутатином приводила к длительному сохранению сосудов в состоянии расслабления (рис. 9), как это имело место и при действии на сосуды известного донора NO – нитропрусида натрия, представляющего собой МНКЖ с цианидом. Эффективность последнего в концентрационном отношении была на порядок выше, но, несмотря на это, предпочтение следует отдать ДНКЖ с глутатином как практически нетоксичному агенту по сравнению с нитропрусидом натрия, распадающимся с высвобождением высокотоксичных ионов цианида.

Гипотензивное действие ДНКЖ с различными тиолсодержащими лигандами на животных, находившихся как в наркотизированном, так и в бодрствующем состоянии, было продемонстрировано нами еще в 80-е годы прошлого века [60–62]. Продолжение этих исследований в 2000-е годы подтвердило эти результаты [66,67]. У всех животных при внутривенном введении им ДНКЖ наблюдалась двухфазная кинетика снижения артериального давления (АД) – быстрая, заканчивающаяся в течение нескольких минут, и длительная, когда исходное АД восстанавливалось через час и более после болюсного (однократного) введения животным водного раствора ДНКЖ (рис. 10).

Быстрая фаза гипотензии была обусловлена высвобождением NO из распадающихся в организме животных низкомолекулярных ДНКЖ (ДНКЖ с цистеином или глутатином), тогда

как появление медленной фазы гипотензии была обусловлено образованием в крови и, очевидно, в тканях сосудов белок-связанных ДНКЖ. Они возникали в результате переноса железо-динитрозильных $Fe(NO)_2$ -фрагментов из вводимых животным низкомолекулярных ДНКЖ на тиоловые группы белков. Более высокая стабильность белковых ДНКЖ, проявляющаяся в медленном высвобождении из них NO, и приводила к резкому замедлению восстановления исходного АД.

При этом следует отметить, что сами по себе белковые ДНКЖ не могут выступать в качестве эффективных переносчиков NO к мишеням его биологического действия. Основное предназначение белковых ДНКЖ – выступать в качестве депо $Fe(NO)_2$ -групп. Непосредственный перенос этих групп с последующим поступлением NO на биологические мишени его действия осуществляется низкомолекулярными формами М- и Б-ДНКЖ, образующимися в результате обратного перехода $Fe(NO)_2$ -групп с белковых тиолов на низкомолекулярные аналоги последних – цистеин или глутатион в клетках и тканях животных.

В связи с этим есть основание полагать, что в отсутствие низкомолекулярных тиолов белок-связанные ДНКЖ, возникшие в тканях сосудов или непосредственно в крови, могут не влиять на уровень АД. Такого рода явление могло иметь место в наших опытах при различных способах введения крысам ДНКЖ с глутатином (в составе «Оксакома» [58]) – внутримышечном, подкожном или внутрибрюшинном [92]. Как показано на рис. 11, независимо от способа введения ДНКЖ наблюдался гипотензивный эффект, хотя и более слабый, чем при внутривенном введении этих комплексов.

В отличие от внутривенного введения Б-ДНКЖ, которое приводило к кратковременному снижению АД, при внутримышечной, подкожной и внутрибрюшинной инъекции этих комплексов эта фаза не обнаруживалась. АД снижалось до минимальной величины примерно за 20–30 мин, после чего начиналось его восстановление до исходного уровня. Амплитуда максимального снижения АД составляла 30–60% от величины, полученной при внутривенной инъекции препарата. Кинетика этого снижения коррелировала с кинетикой накопления в крови альбумин-связанных М-ДНКЖ, показанной на рис. 12. Как следует из рисунка, максимальное накопление этих комплексов в крови при внутримышечном или при подкожном введении ДНКЖ с глутатином, обнару-

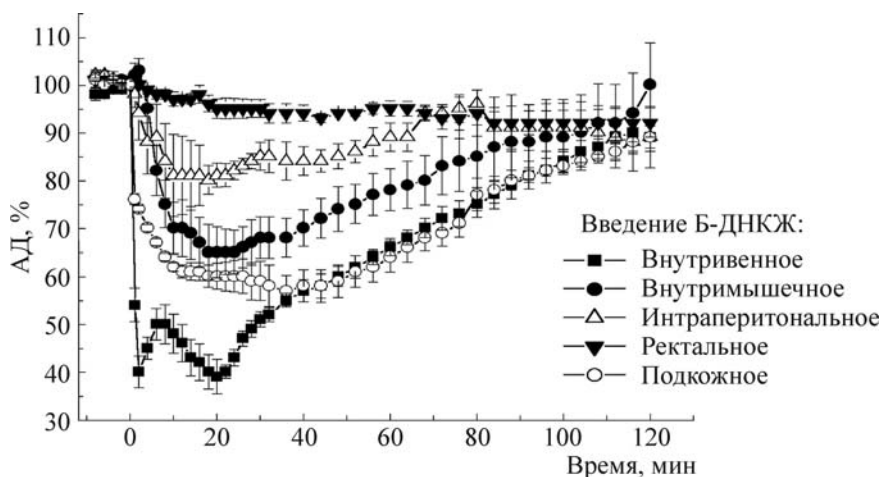


Рис. 11. Изменение среднего артериального давления (в % к исходному) у крыс при болюсном внутривенном (квадраты), внутримышечном (темные кружки), внутрибрюшинном (интраперитонеальном) (треугольники), ректальном (обратные треугольники) и подкожном (светлые кружки) введении крысам Б-ДНКЖ с глутатионом (в составе «Оксакома») в дозе 2 мкмоль/кг [92].

живалось через 30 мин, т.е. ко времени максимального снижения АД.

Кинетика восстановления АД не коррелировала с уровнем белок-связанных М-ДНКЖ в крови животных: при полном восстановлении АД в течение второго часа после внутримышечного или подкожного введения крысам Б-ДНКЖ с глутатионом, уровень белок-связанных М-ДНКЖ в крови практически не изменялся. Не исключено, что восстановление АД за это время было обусловлено тем, что белок-связанные М-ДНКЖ в крови не инициировали более поступление NO в циркулирующую кровь. Иная ситуация наблюдалась при внутривенном введении животным низкомолекулярных Б-ДНКЖ: снижение АД за второй час коррелировало практически с полной убылью в крови белок-связанных М-ДНКЖ.

Это различие становится понятным, если учесть, что препарат «Оксаком», вводимый животным в этих опытах, наряду с Б-ДНКЖ содержит и свободный глутатион, в количестве в пять-шесть раз большем уровня Б-ДНКЖ. При внутривенном введении «Оксакома» свободный глутатион поступал непосредственно в кровь и мог выполнять функции переносчика $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -групп, акцептируя их из белок-связанных М-ДНКЖ и перенося их к мишеням действия NO. При внутримышечном или подкожном введении крысам низкомолекулярных Б-ДНКЖ лишь небольшая часть свободного глутатиона достигала крови (из-за слабого проникновения глутатиона в клетки и ткани) и могла обеспечить разгрузку белок-связанных М-ДНКЖ в крови только в первые 20 мин, после чего из-за снижения уровня глутатиона

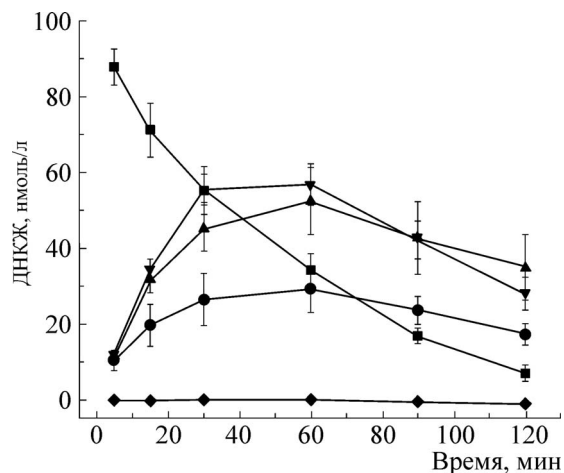


Рис. 12. Изменение во времени концентрации в крови белок-связанных М-ДНКЖ после болюсного внутривенного (квадраты), внутрибрюшинного (интраперитонеального) (кружки), внутримышечного (треугольники), подкожного (обратные треугольники) или ректального (ромбы) введения крысам Б-ДНКЖ с глутатионом (в составе «Оксакома») в дозе 2 мкмоль [92].

NO не переходил из белковых М-ДНКЖ в кровь и АД начинало восстанавливаться из-за отсутствия NO в крови. Другими словами, при подкожном или внутримышечном введении «Оксакома» гипотензия снималась, поскольку исчезали переносчики NO – низкомолекулярные ДНКЖ, тогда как при внутривенном введении «Оксакома» гипотензия снималась, поскольку в крови истощались депо NO – белок(альбумин)-связанные М-ДНКЖ.

В этих экспериментах, описанных в работе [92], учитывалось только образование в кро-

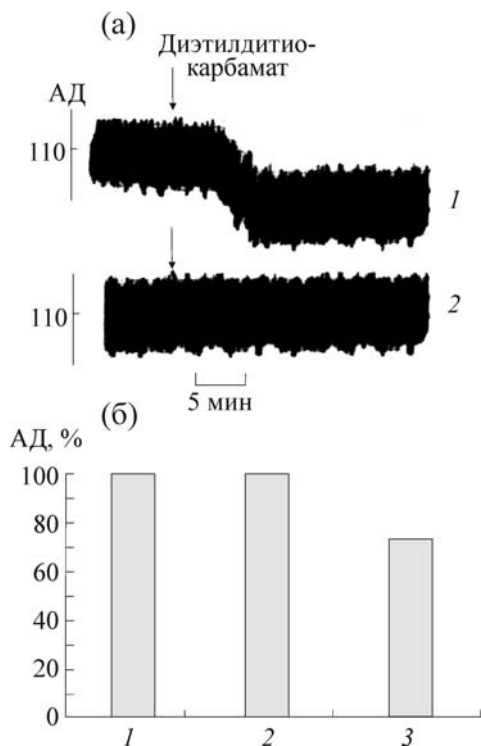


Рис. 13. (а) – Влияние введения диэтилдитиокарбамата на артериальное давление у крыс через 5 ч после введения им ДНКЖ с цистеином (1) или без такого введения (2 – контрольные животные); (б) – 1 – контроль, 2 – контрольным животным введен диэтилдитиокарбамат, 3 – диэтилдитиокарбамат введен животным через 5 ч после инъекции им ДНКЖ с цистеином (статистически достоверно отличается от вариантов 1 и 2 – $p < 0,05$) [93].

ви ЭПР-активных альбумин-связанных М-ДНКЖ. Между тем в свете наших последних данных в крови могли накапливаться и ЭПР-неактивные альбумин-связанные Б-ДНКЖ. Изучение этих комплексов, которые тем не менее можно обнаруживать методом ЭПР после их превращения в ЭПР-активные МНКЖ с производными дитиокарбамата [43,44], заслуживает самого пристального внимания. Не исключено, что распад именно этих Б-ДНКЖ под действием ДЭТК, вводимого крысам в кровь через 5 ч после введения им М- и Б-ДНКЖ с цистеином, приводил в соответствии со схемой 11 к образованию прочного МНКЖ – ДЭТК-комплекса (не высвобождающего NO) и S-нитрозированного тиола (RS^-), последующий распад которого с высвобождением из него NO вызывал снижение АД, обнаруживаемое в эксперименте (рис. 13 и 14г) [93,62].

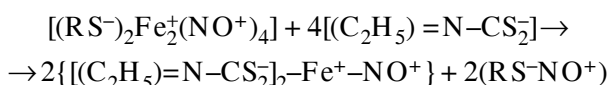


Схема 11.

Появление МНКЖ–ДЭТК было обнаружено методом ЭПР по характерному для этого комплекса триплетному сигналу ЭПР, регистрируемому в ткани сердца и почек. До введения животным ДЭТК в этих тканях сигнал 2,03 не обнаруживался, что свидетельствует о том, что образование МНКЖ–ДЭТК было обусловлено взаимодействием ДЭТК с диамагнитными Б-ДНКЖ.

Оценка различных гемодинамических показателей у крыс, проведенная проф. М.И. Ремизовой с сотр. в НИИ гематологии и трансфузиологии в Санкт-Петербурге [67], показала, что понижение артериального давления у этих животных, вызванное внутривенным введением ДНКЖ с глутатионом, коррелировало с почти 30%-м снижением по сравнению с контролем общего периферического сопротивления, которое сохранялось в ходе гипотензии, индуцированной ДНКЖ с глутатионом (в течение 1 ч). Как реакция на выраженную гипотензию, повышались величина ударного объема сердца и минутный объем кровообращения. Повышение последнего происходило только вследствие повышения ударного объема, но не за счет учащения частоты сердечных сокращений. Продолжающееся увеличение ударного объема сердца и минутного объема кровообращения даже при ослаблении гипотензии дает основание полагать, что ДНКЖ мог оказывать положительное действие на сократительную активность миокарда. Что касалось напряжения кислорода и углекислого газа в крови, а также ее кислотно-основного показателя, в условиях гипотензии, вызванной ДНКЖ, эти показатели не изменялись. Не ухудшались и показатели микроциркуляции. Таким образом, эти исследования показали, что ДНКЖ как гипотензивный агент не способен оказывать неблагоприятное действие на различные сердечно-сосудистые показатели и вполне может быть использован для создания нового типа лекарств сердечно-сосудистого действия.

Что касается эффективности гипотензивного действия ДНКЖ как донора NO сравнительно с аналогичным действием других доноров этого агента – S-нитрозотиолов или неорганического нитрита, то, как следует из данных, приведенных на рис. 15, главным достоинством ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами является длительный характер его гипотензивного действия, обусловленный, как уже указывалось, превращением низкомолекулярной формы этих комплексов в их белок-связанный аналог.

В настоящее время упоминавшийся выше «Оксаком» удачно прошел фармакологические испытания как гипотензивное средство. Его

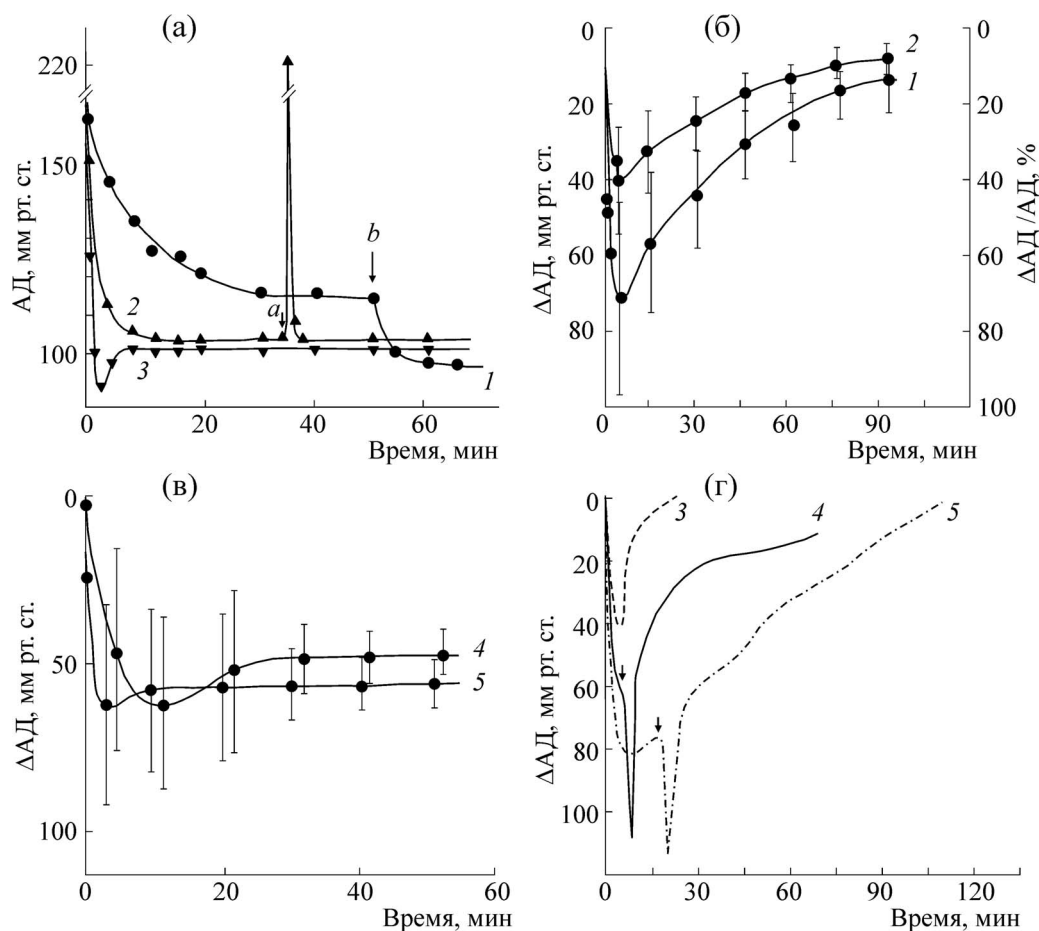


Рис. 14. Изменение артериального давления (АД или Δ АД) у наркотизированных собак (а) и крыс (в) и бодрствующих крыс (б,г). (а) – Собакам внутривенно вводили их плазму крови, содержащую белок-связанные ДНКЖ (кривая 1) или ДНКЖ с тиосульфатом (кривые 2,3). Стрелка на кривой 2 – внутривенное введение адреналина, стрелка на кривой 1 – введение ДНКЖ с тиосульфатом. (в) – Усредненные кривые ($n = 5$) снижения артериального давления (Δ АД) у наркотизированных крыс при внутривенном введении им плазмы крови, содержащей белок-связанные ДНКЖ (кривая 4) или раствора ДНКЖ с тиосульфатом (кривая 5) [61]. (б) – Усредненные кривые ($n = 6$) изменения артериального давления Δ АД (кривая 1) и Δ АД/АД (кривая 2) у крыс после внутривенного введения им ДНКЖ с глутатионом. (г) – Кривая 3 – через 1 мин после введения ДЭТК (30 мг/кг) крысы ввели ДНКЖ с тиогликолевой кислотой (10 микромолей/кг); кривые 4,5 – ДЭТК вводили животным после ДНКЖ в моменты, указанные стрелками [62].

действие было проверено на здоровых добровольцах, начаты испытания в клинике на больных с гипертоническим кризом. Результаты этих испытаний изложены в недавно опубликованной работе медиков-кардиологов в работе [68]. В качестве примера на рис. 16 приведены результаты использования этого препарата при снятии гипертонического криза у 59-тилетнего больного, госпитализированного в Российском кардиологическом научно-производственном комплексе (Москва). Одноразовое внутривенное введение ему «Оксакома» в дозе, соответствующей 0,3 мкмоль ДНКЖ с глутатионом на кг массы тела, привело за полчаса к снижению систолического и диастолического давления с уровня 240/140 мм рт. ст. до нормы – 120/80 мм

рт. ст., сохранившемся вплоть до выписки больного из Центра.

Способность ДНКЖ ускорять заживление кожных ран. Эксперименты, проведенные нами в кооперации с сотрудниками 1-го Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова проф. А.Б. Шехтером и д-ром Т.Г. Руденко, показали, что ДНКЖ с глутатионом или цистеином способны эффективно ускорять заживление кожных ран у крыс. Так, при двухкратном обкалывании раны водными растворами ДНКЖ с глутатионом в суммарной дозе 5 мкмоль на рану на первый и второй день после нанесения раны объем грануляционной ткани на четвертые сутки возрастал по сравнению с контролем в три-четыре

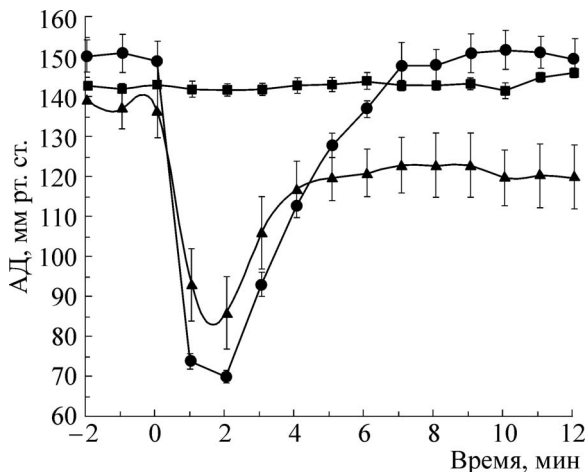


Рис. 15. Влияние на среднее артериальное давление нитрита (квадраты), GS-NO (кружки) и Б-ДНКЖ с глутатионом (в составе «Оксакома») (треугольники) при болюсном внутривенном введении в дозе 0,8 мкмоль/кг. Концентрация Б-ДНКЖ рассчитана в пересчете на один атом железа [58].

раза. В аналогичных опытах с введением в рану другого донора NO – GS-NO в суммарной дозе 10 мкмоль на рану, обеспечивающей поступление в рану того же количества NO, что и при введении ДНКЖ, состояние раны ухудшалось [74].

Приведенные на рис. 17 результаты гистологического анализа ткани ран, взятых на четвертый день после операции, иллюстрируют изложенную выше ситуацию. В тканях животных, обработанных ДНКЖ, наблюдается увеличение объема зрелой грануляционной ткани, тогда как у контрольных животных и животных, обработанных GS-NO, доминировал толстый фибринозно-лейкоцитарный слой с тонким слоем незрелой грануляционной ткани с преобладанием воспалительной инфильтрации.

Таким образом, ДНКЖ оказывал благоприятное действие на рану, выступая в качестве регулятора различных процессов путем постепенного высвобождения необходимого для этих процессов NO. Что касается GS-NO, его быстрый распад в ране приводил к быстрому накоплению в ней значительного количества NO и тем самым значительного количества цитотоксического пероксинитрита. В результате GS-NO оказывал на раны цитотоксическое, а ДНКЖ – регуляторное действие.

В настоящее время нами в сотрудничестве с проф. А.Б. Шехтером, д-ром Т.Г. Руденко, проф. Л.П. Истрановым и др. на основе ДНКЖ с глутатионом как активным началом создан препарат, позволяющий неинъекционным путем вводить указанный комплекс в ткань раны [75].

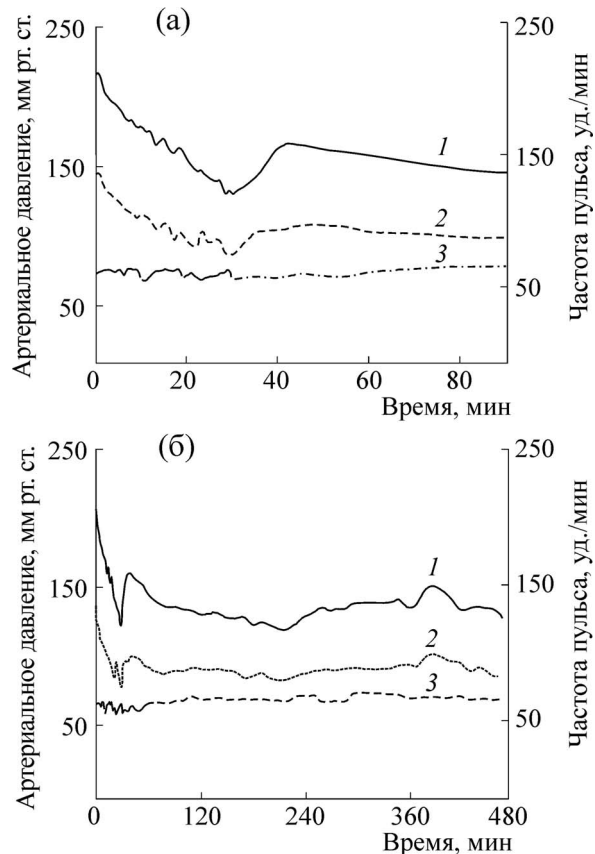


Рис. 16. Изменение систолического (кривые 1) и диастолического (кривые 2) давления у 59-летнего мужчины при гипертоническом кризе (исходные показатели артериального давления 240/140 мм рт. ст.) после однократного внутривенного введения ему «Оксакома» (7,5 мг/кг или 0,3 мкмоль ДНКЖ с глутатионом/кг) в течение 90 мин (а) или 480 мин (б), а также изменение пульса пациента (кривые 3). (Автор выражает благодарность акад. РАН Е.И. Чазову за предоставление данного материала.)

Препарат представляет собой высушенную коллагеновую матрицу с включенным в нее ДНКЖ с глутатионом. Наложение этой матрицы на рану обеспечивает высвобождение из нее этого комплекса в растворе экссудата, выделяющегося из раны. Поскольку коллаген, как и ДНКЖ, характеризуется высоким ранозаживляющим потенциалом, можно было предполагать, что совместное действие коллагена на рану должно усиливаться в присутствии ДНКЖ. Проведенные опыты на крысах показали, что полученный таким образом препарат способен эффективно ускорять заживление кожных ран. Так, на 16–18-е сутки после нанесения раны площадь кожных ран на спине крыс, обработанных коллагеновой матрицей, содержащей ДНКЖ, была в два раза ниже, чем у контрольных животных (рис. 18).

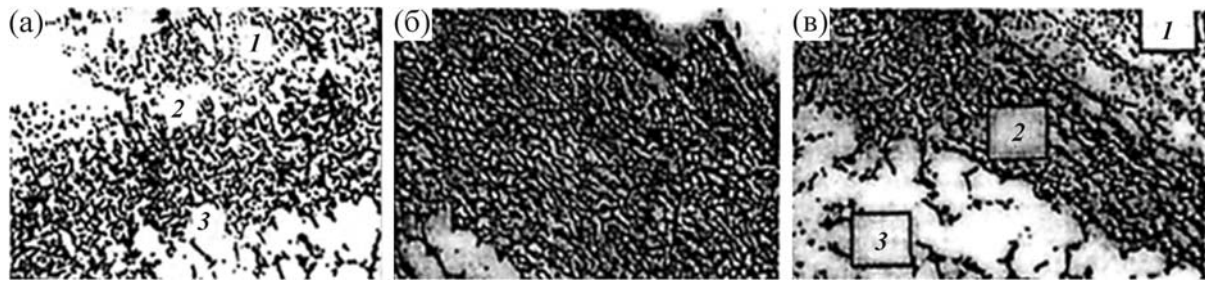


Рис. 17. Влияние ДНКЖ с глутатионом и GS-NO на состояние кожной раны на спине крыс (на четвертый день после нанесения раны). (а) – Контроль. На раневой поверхности наблюдается толстый фибринозно-лейкоцитарный слой (1), внутри – тонкий слой незрелой грануляционной ткани с преобладанием воспалительной инфильтрации (2), жировая клетчатка (3) также с явлениями воспалительной инфильтрации. (б) – На первый и второй день после операции в рану вводили по 5 мкмоль ДНКЖ (суммарно 10 мкмоль). Наблюдается относительно зрелая грануляционная ткань с вертикальными капиллярными петлями и горизонтальной ориентацией фибробластов. (в) – На первый и второй день после операции в рану вводили по 5 мкмоль GS-NO (суммарно 10 мкмоль). Наблюдается толстый фибринозно-лейкоцитарный слой (1), диapedзные кровоизлияния, тонкий слой незрелой грануляционной ткани (2), незамещенная жировая ткань (3) [74].

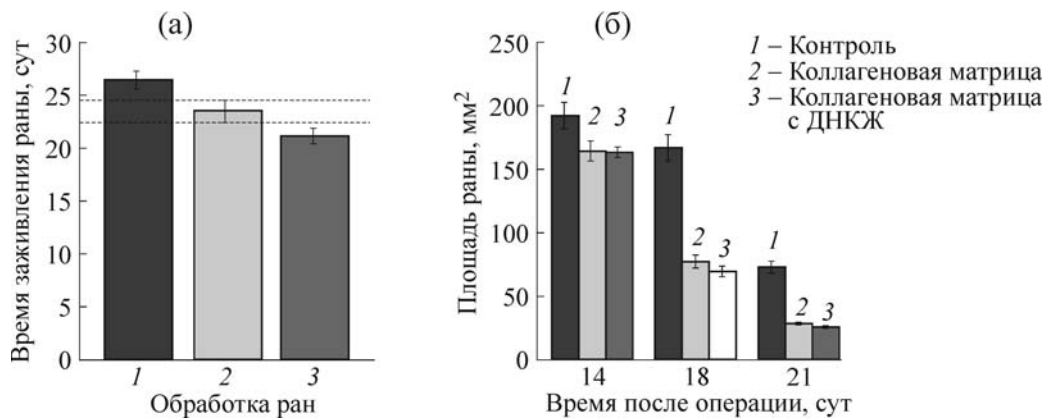


Рис. 18. Динамика заживления кожных ран у крыс: усредненное время заживления ран (а) и усредненная площадь ран (б) на 14–21-е сутки после нанесения ран у контрольных животных и у животных, раны которых были обработаны коллагеновой матрицей или коллагеновой матрицей с включенным в нее Б-ДНКЖ с глутатионом [75].

**ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ
Б-ДНКЖ С ГЛУТАТИОНОМ
НА НЕЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ
И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ
У ЖИВОТНЫХ**

Чем инициируется цитотоксическое действие ДНКЖ? Как указывалось выше, наряду со способностью NO выступать в живых системах в качестве одного из универсальных регуляторов разнообразных метаболических процессов этот агент способен оказывать также и цитотоксическое действие, что определяет функционирование NO как одного из эффекторов системы клеточного иммунитета. Такая активность начинается проявляться при повышении стационарной концентрации NO в клетках и тканях до 100 мкмоль и выше, что примерно на два порядка выше стационарной концентрации это-

го агента, при которой он функционирует в качестве регулятора метаболических процессов.

Повышение стационарной концентрации NO до цитотоксического уровня в организме животных обеспечивается функционированием индуцибельной NOS (iNOS). Что же касается ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, эти комплексы начинают оказывать цитотоксическое действие при их быстром разрушении, приводящем к высвобождению из них значительного количества NO. Такое заключение было сделано исходя из опытов на культуре клеток HeLa, в которых был продемонстрирован переход этих клеток в апоптотическое состояние при воздействии на ДНКЖ хелаторов железа, связывающих ионы железа и тем самым инициирующих высвобождение NO из этих комплексов [94]. Проапоптотическое действие

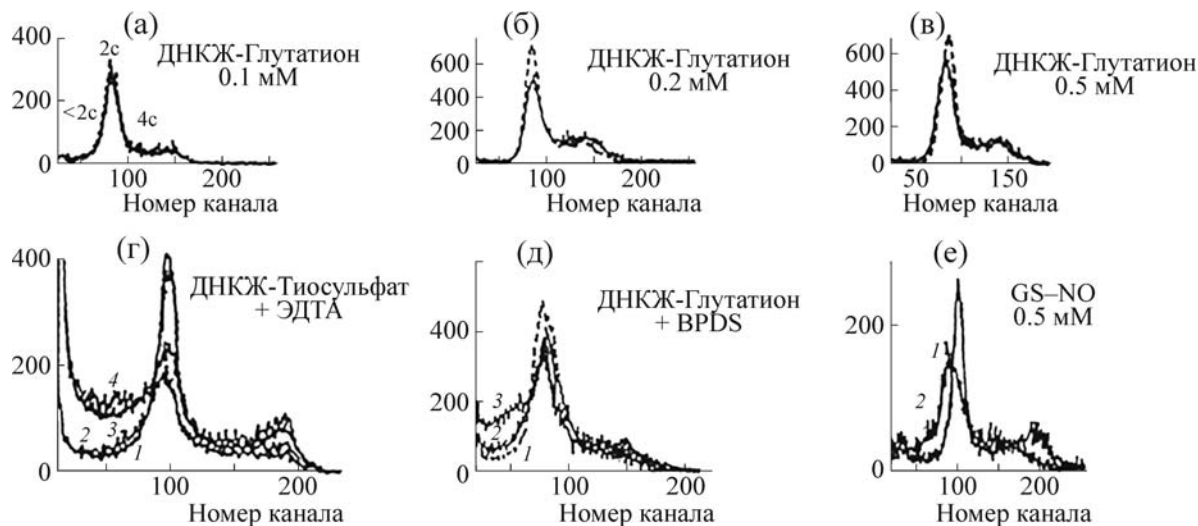


Рис. 19. (а)–(в) – Гистограммы, иллюстрирующие отсутствие проапоптотического действия ДНКЖ с глутатионом при концентрации последнего 0,1, 0,2 и 0,5 мМ соответственно на клетки HeLa. Клетки инкубировали 22 ч в среде Eagle. Сплошные кривые – контроль, штриховые – опыт. (г) – Проапоптотическое действие 0,05, 0,1 и 0,2 мМ ДНКЖ с тиосульфатом (кривые 2–4). Клетки инкубировали 22 ч в 0,5 мМ растворе Версена (ЭДТА). (д) – Действие 0,2 мМ ДНКЖ с глутатионом в присутствии 0,05 мМ батофенантролиндисульфата (BPDS) (кривая 3). (е) – Действие 0,5 мМ GS-NO (кривая 2, инкубация клеток в среде Eagle). На гистограммах (г)–(е) кривая 1 – контроль, на гистограммах (г) и (д) кривые 2 – инкубация клеток с 0,05 мМ ДНКЖ с тиосульфатом в растворе Версена или с 0,2 мМ ДНКЖ с глутатионом в среде Eagle. По осям ординат приведено количество клеток (в отн. ед.) [94].

ДНКЖ на клетки HeLa оценивали по гашению флуоресценции этидиум хлорида, интеркалированного в клеточную ДНК. Степень этого гашения определяли по уровню клеток, флуоресцирующих в каналах, регистрирующих флуоресценцию с меньшей интенсивностью (начиная с канала № 75 и ниже, рис. 19). Оказалось, что ни один из использованных ДНКЖ при концентрациях вплоть до 0,5 мМ не вызывал заметного апоптоза в клетках HeLa. В качестве примера на рис. 19 приведены данные о флуоресценции этидиум хлорида в этих клетках, обработанных ДНКЖ с глутатионом: интенсивность флуоресценции сохранялась на уровне, характерном для диплоидной (2с) структуры ДНК (рис. 19, верхние гистограммы, клетки инкубировали 22 ч в среде Eagle). Если же клетки HeLa инкубировали с ДНКЖ с тиосульфатом в 0,5 мМ растворе Версена, содержащем ЭДТА (соединение, разрушающее ДНКЖ с тиосульфатом), то содержание клеток в состоянии апоптоза по мере повышения концентрации ДНКЖ существенно повышалось (рис. 19г). Аналогичный эффект наблюдался при инкубации клеток с ДНКЖ с глутатионом и батофенантролиндисульфатом, разрушавшим эти комплексы (рис. 19д).

В последующих исследованиях было показано, что разрушение ДНКЖ экзогенными хелаторами железа действительно приводит к вы-

свобождению из ДНКЖ заметного количества NO, которого достаточно, чтобы после превращения в пероксинитрит инициировать гибель клеток HeLa по апоптотическому механизму.

Что касается другого донора NO – GS-NO, он вызывал апоптоз у клеток HeLa и без введения в среду инкубации хелаторов железа (рис. 19е). Очевидно, это было обусловлено быстрым распадом GS-NO, приводившим к высвобождению из него значительного количества NO, способного оказывать на клетки HeLa губительное для них апоптотическое действие.

Из полученных на культуре клеток результатов следует, что ДНКЖ могут оказывать цитотоксическое действие на клетки HeLa при разрушении этих комплексов хелаторами железа. Это послужило основой для нашей гипотезы о том, что цитотоксическая активность ДНКЖ может проявляться при действии на них эндогенных хелаторов железа. Последние могут продуцироваться быстро пролиферирующими клетками и тканями для обеспечения необходимым для их развития железа. В связи с этим мы предположили, что если ДНКЖ инкубировать с такими клетками и тканями, то продуцируемые ими эндогенные хелаторы железа должны разрушать эти комплексы, в результате чего эти биообъекты должны получать из ДНКЖ железо, а вместе с ним значительное количество

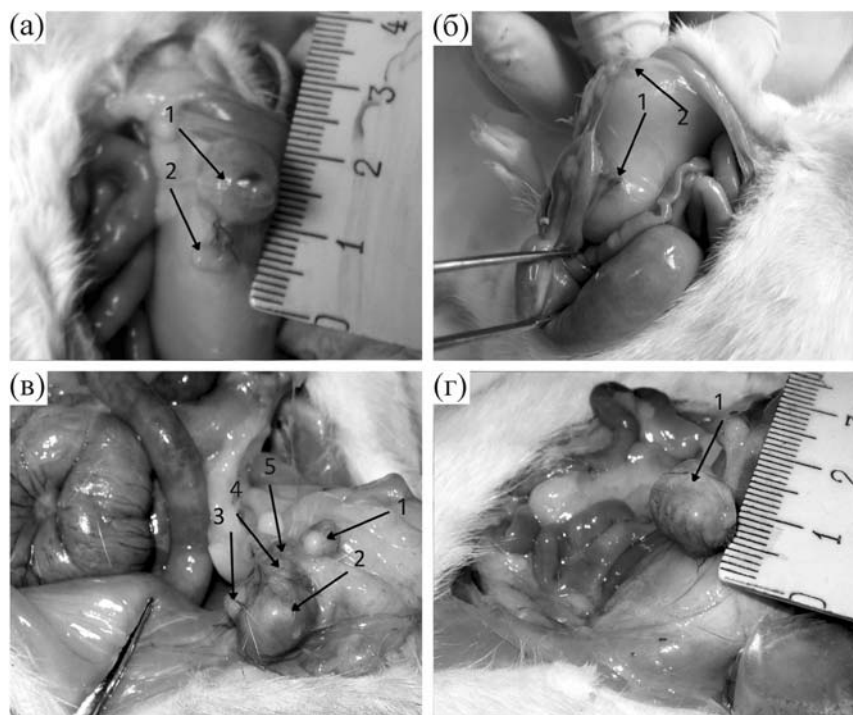


Рис. 20. (а), (в) – Фотографии брюшины контрольных животных 1-й и 2-й групп; (б), (г) – фотографии брюшины животных тех же групп, обработанных ДНКЖ с глутатионом. Опухоли, развившиеся из двух имплантов, указаны стрелками 1 и 2, мелкие вторичные опухоли на рис. (в) указаны стрелками 3–5 [96].

токсического для них NO (точнее, пероксинитрита)!

Блокирующее действие Б-ДНКЖ с глутатионом на пролиферацию незлокачественных опухолей – эндометриом у крыс с экспериментальным эндометриозом. Экспериментальный эндометриоз у крыс инициировали трансплантацией двух небольших (2 мм) фрагментов матки на внутреннюю поверхность стенки брюшины [95–97]. Через месяц–полтора после операции эти импланты разрастались в крупные (размером до 1 см) эндометриоидные опухоли овальной формы (рис. 20а,в), пролиферация которых постепенно заканчивалась через два месяца после операции. Если же через четверо суток после операции животным внутрибрюшинно каждый день в течение 10 суток вводили раствор Б-ДНКЖ с глутатионом в дозе

6,25 мкмоль Б-ДНКЖ на кг массы животных (или 12,5 мкмоль в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ) с дальнейшим двухнедельным выдерживанием этих животных на стандартной диете вивария, у большинства животных эндометриоидные опухоли практически не обнаруживались (рис. 20б, табл. 2). У контрольных животных через месяц после операции развивались крупные эндометриоидные опухоли (рис. 20а) со средним объемом до 110 мм³ (табл. 2) [96].

Следует отметить, что в наших опытах на животных с экспериментальным эндометриозом ДНКЖ с глутатионом оказывали губительное действие избирательно только на эндометриоидные импланты, не оказывая заметного негативного действия на соседние ткани и органы – стенку брюшины и кишечник. Этот результат

Таблица 2. Статистические оценки средних объемов эндометриоидных опухолей (в мм³) суммарно по всем животным в каждой группе [96]

		Медиана (min–max)	Среднее ± среднеквадратичное отклонение
Группа 1	Контроль (10 крыс)	36 (2–599)	113 ± 179
	Эксперимент (10 крыс)	0 (0–73)	7 ± 17 (<i>p</i> < 0,001)
Группа 2	Контроль (10 крыс)	30 (2–866)	150 ± 230
	Эксперимент (10 крыс)	7 (0–759)	106 ± 232 (<i>p</i> < 0,008)

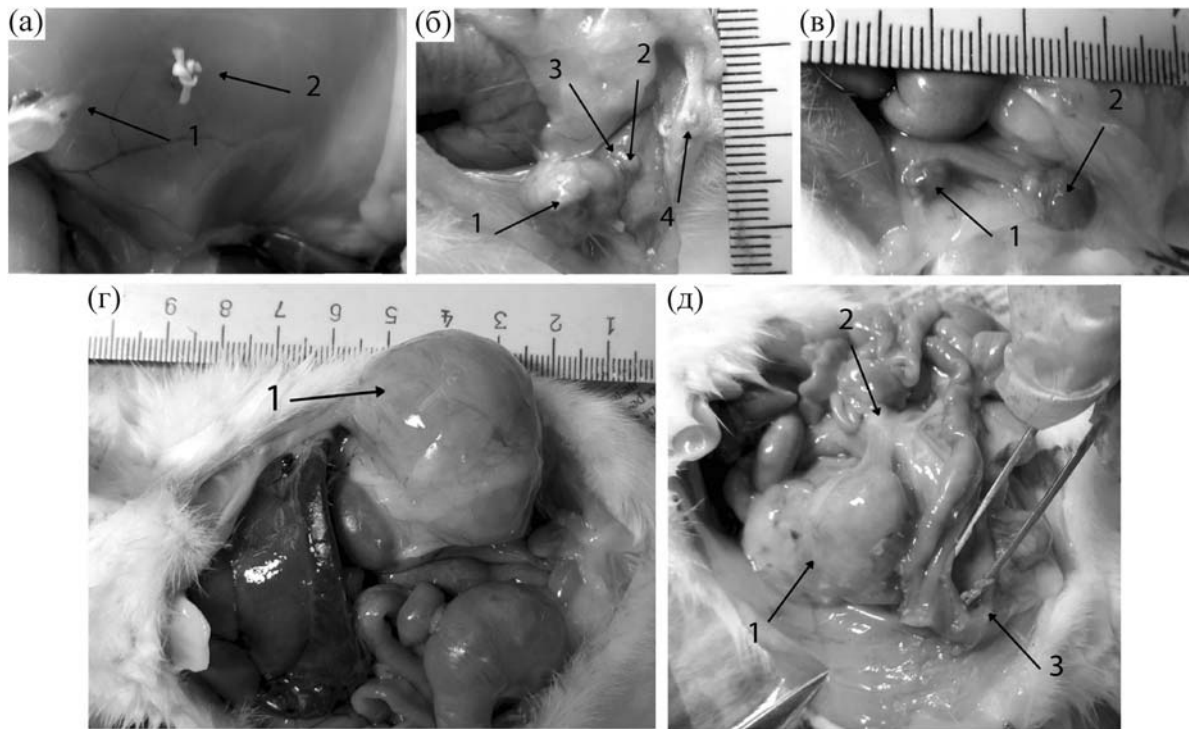


Рис. 21. Фотографии брюшины крыс с экспериментальным эндометриозом, обработанных ДНКЖ с глутатионом (а) или GS-NO (в)–(д), и контрольных животных (б). (г) и (д) – Крысы, обработанные GS-NO, имели anomalно крупные опухоли. Положение опухолей, развившихся из двух имплантов, на рис. (б)–(д) указано стрелками 1 и 2. Мелкие вторичные опухоли на рис. (б) указаны стрелками 3 и 4. На рис. (в) стрелки 1–3 указывают на опухоль, развившуюся из импланта (1), на множественные спайки в кишечнике (2) и на множественное осеменение стенки брюшины вторичными опухолями (3). На рис. (а) вместо имплантов обнаруживаются только хирургические нитки [97].

согласуется с высказанным выше предположением о том, что ДНКЖ должны губительно действовать только на быстро пролиферирующие ткани, продуцирующие хелаторы железа, разрушающие ДНКЖ.

Иное действие на развитие эндометриоза оказывали другие доноры NO – S-нитрозотиолы. Так, в работе мексиканских исследователей было обнаружено, что один из представителей S-нитрозотиолов – S-нитрозопеницилламин – при его длительном (в течение нескольких месяцев) введении мышам с экспериментальным эндометриозом в дозе, существенно меньшей дозы ДНКЖ в наших опытах, не только не подавлял, а наоборот – усиливал рост эндометриоидных опухолей в этих животных [98]. Оценка иммунного статуса (по уровню продуцируемых в их организме соответствующих интерлейкинов и интерферонов) показала резкое ослабление этого статуса у экспериментальных животных, обработанных S-нитрозопеницилламином. Очевидно, что это и приводило к усилению пролиферации эндометриоидных опухолей.

Аналогичные результаты мы получили и в наших опытах на крысах с использованием

GS-NO [97]. Опыты с его воздействием на крыс с экспериментальным эндометриозом проводили по тому же протоколу, что и в предыдущих опытах с использованием ДНКЖ с глутатионом на животных первой группы, т.е. с введением GS-NO через четверо суток ежедневно в дозе 12,5 мкмоль/кг в течение 10 суток. Параллельно по тому же протоколу проводили опыты с использованием ДНКЖ с глутатионом (повторяли вышеописанные опыты на первой группе животных)

Как и в предыдущих исследованиях, ежедневная в течение 10 суток обработка экспериментальных животных Б-ДНКЖ в дозе 12,5 мкмоль/кг (в пересчете на один атом железа в этих комплексах) с дальнейшим двухнедельным выдерживанием этих животных на стандартной диете вивария приводила практически к полному подавлению развития у них эндометриоидных опухолей (рис. 21, табл. 3). У шести из девяти животных опухоли отсутствовали вообще, у трех остальных обнаруживались лишь мелкие опухоли (с объемом менее 5 мм³).

Таблица 3. Статистические оценки средних объемов эндометриоидных опухолей (в мм³) суммарно по всем животным в каждой группе [97]

Животные	Медиана (min–max)	Среднее ± среднеквадратичное отклонение	<i>p</i>
Контрольные (<i>n</i> = 15)	42,4 (0–1838)	210 ± 371	
Крысы, обработанные ДНКЖ (<i>n</i> = 9)	0,0 (0–44)	5 ± 7	0,0001
Крысы, обработанные GS–NO (<i>n</i> = 9) (без учета аномальных опухолей)	12,6 (0–339)	51 ± 76	> 0,1
Крысы, обработанные GS–NO (<i>n</i> = 9) (с учетом аномальных опухолей)	28,8 (0–25282)	1392 ± 4916	> 0,6

Таблица 4. Статистические оценки объема эндометриоидных опухолей (в мм³) в пересчете на одну крысу в каждой группе животных [97]

Животные	Медиана (min–max)	Среднее ± среднеквадратичное отклонение	<i>p</i>
Контрольные (<i>n</i> = 15)	393 (26–2449)	534 ± 620	
Крысы, обработанные ДНКЖ (<i>n</i> = 9)	0 (0–55)	10 ± 19	0,0003
Крысы, обработанные GS–NO (<i>n</i> = 9) (без учета аномальных опухолей)	130 (0–431)	161 ± 150	0,0005
Крысы, обработанные GS–NO (<i>n</i> = 9) (с учетом аномальных опухолей)	207 (0–25348)	4641 ± 8472	> 0,002

У всех 15 контрольных животных наряду с крупными опухолями, развившимися из имплантов, обнаруживались и мелкие вторичные опухоли (рис. 21б). У всех девяти животных, обработанных GS–NO, количество эндометриоидных опухолей, включавшее развившиеся из имплантов и вторичные опухоли, достигало 30. У трех из этих животных на месте имплантов обнаруживались опухоли аномальных размеров (на один–два порядка превышающие размеры опухолей в контроле). Без учета этих опухолей у животных, обработанных GS–NO, средний объем всех опухолей составлял 51 ± 76 мм³ – в четыре раза ниже, чем в контроле (табл. 3). С учетом аномально крупных опухолей их средний объем повышался до 1392 ± 4916 мм³, что превышало в семь раз средний объем опухолей в контроле. Аналогичные соотношения были получены для величин объема опухолей в пересчете на одно животное (табл. 3).

Гистопатологический анализ показал, что, несмотря на явное замедление (по сравнению с контролем) роста эндометриоидных опухолей у большинства животных, обработанных GS–NO, эти опухоли характеризовались наличием значительного количества эндометриальных клеток, ответственных за пролиферацию опухолей, и по своим гистологическим характеристикам были близки к тканям опухолей контрольных животных [97].

Интересные результаты были получены при ЭПР-анализе эндометриоидных опухолей (рис. 22) [97]. В образцах этих тканей, взятых у контрольных животных и животных, обработанных GS–NO, на конечной стадии эксперимента обнаружены сигналы ЭПР активной формы рибонуклеотидредуктазы (дублетный сигнал с центром при $g = 2,01$) и сигнал 2,03 (рис. 22а,б). Первый сигнал, обычно обнаруживаемый в быстро пролиферирующих тканях, можно рассматривать в качестве показателя интенсивных пролиферативных процессов, протекающих в эндометриоидных опухолях. Что касается сигнала 2,03, его можно рассматривать в качестве показателя усиленной генерации NO в этих тканях. Не исключено, что это усиление было обусловлено «стремлением» иммунной системы подавить пролиферацию этих опухолей путем активации усиленной генерации NO, как цитотоксического агента, иммуннокомпетентными клетками. О таком «стремлении» говорит и факт обнаружения в некоторых образцах эндометриоидных опухолей интенсивного сигнала ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина (рис. 22г,д). Что касается небольших эндометриоидных опухолей, сохранившихся у животных, «вылеченных» с помощью ДНКЖ, в этих образцах не обнаружен ни один из перечисленных выше сигналов ЭПР: наблюдали только

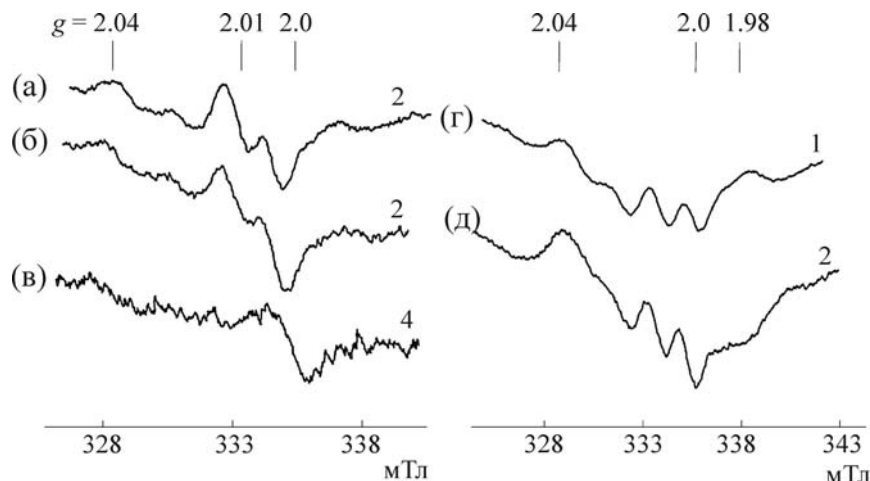


Рис. 22. Спектры ЭПР, зарегистрированные при 77 К в печени контрольных крыс с экспериментальным эндометриозом (а,г) и тех же животных, обработанных GS-NO (б,д) или Б-ДНКЖ с глутатионом (в). Справа указано усиление радиоспектрометра (в отн. ед.) [97].

слабый сигнал эндогенных свободных радикалов при $g = 2,0$ (рис. 22в).

Таким образом, есть основание говорить о возможности использования ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при терапевтическом лечении эндометриоза у женщин. Выше я уже говорил, что уже создано лекарственное средство, содержащее в качестве активного начала ДНКЖ с глутатионом («Оксаком») [58]. Этот препарат успешно прошел фармакологические испытания и используется в качестве гипотензивного средства при купировании гипертонического криза у пациентов-добровольцев [58]. Я уверен, что если не «Оксаком», то другие медицинские препараты, созданные на основе ДНКЖ с различными тиолсодержащими лигандами, найдут применение при терапии эндометриоза у женщин, заменив собой хирургический подход, широко используемый сейчас при лечении эндометриоза, частота которого в женской популяции в последние годы неуклонно растет.

Замедление роста перевивной карциномы легких Льюис у мышей под действием Б-ДНКЖ с глутатионом. После обнаружения избирательного цитотоксического действия на доброкачественные эндометриоидные опухоли представлялось заманчивым проверить, не оказывают ли Б-ДНКЖ с глутатионом аналогичного действия на быстро пролиферирующие злокачественные опухоли. Такие исследования были начаты в 2014 г. [99] и сейчас продолжаются в кооперации с сотрудниками Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН проф. Л.А. Островской и Д.Б. Корманом, д-рами В.А. Рыковой, Н.В. Блюхтеровой и

М.М. Фоминой [100–102]. Первые результаты показали, что Б-ДНКЖ с глутатионом при их внутрибрюшинном введении мышам действительно способны дозозависимо замедлять пролиферацию перевивной подкожной солидной карциномы Льюис, но лишь на ее начальной стадии, с последующим ростом опухоли иногда даже с более высокой скоростью по сравнению с контролем (рис. 23) [99–101]. Ростингибирующий эффект этого препарата повышался с увеличением дозы Б-ДНКЖ и был наиболее выраженным (80%) при дозе 200 мкмоль на кг (в пересчете на один $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -фрагмент в этом комплексе).

Аналогичные результаты были получены в опытах на мышах на модели солидного лейкоза P-388 и карциномы Ca-755 [100,101].

Было предположено, что пролиферация опухолевых клеток после замедления роста опухоли на начальной стадии могла быть обусловлена формированием в опухолевых клетках системы антинитрозативной защиты, аналогичной возникающей в патогенных бактериях в ответ на воздействие на них монооксида азота. Таким образом, надежда на губительное воздействие ДНКЖ с глутатионом не перевивные злокачественные опухоли, обнаруженное для эндометриоза, оказалось напрасной.

Ситуация изменилась после того, как в конце 2016 г. группа китайских исследователей с Тайваня, возглавляемая проф. Ляо (W-F. Liaw), сообщила о способности М-ДНКЖ, включающего в себя два тиолсодержащих лиганда – $(\text{S}(\text{CH})_2\text{OH})$ и $(\text{S}(\text{CH})_2\text{NH}_3)$, практически полностью подавлять развитие перевивной опухоли рака простаты человека у мышей при однора-

зовом внутривенном введении (в хвостовую вену) в дозе 0,8 мкмоль на кг массы животного через каждые трое суток в течение 21 суток. При таком семикратном введении М-ДНКЖ торможение роста опухоли по сравнению с контролем на 7-е и 21-е сутки составило 60 и 95%. Было показано, что это торможение обусловлено апоптотической гибелью опухолевых клеток, инициированной высвобождением из М-ДНКЖ монооксида азота [103].

Естественно, что под влиянием результатов китайских исследователей мы в своих опытах перешли, во-первых, к внутривенному введению мышам Б-ДНКЖ с глутатионом (в хвостовую вену) и, во-вторых, проверили, действительно ли при таком введении противоопухолевый эффект этих комплексов реализуется не при высокой, а при низкой дозе (порядка 1 мкмоль на кг массы животного) [102]. Результаты этих экспериментов, приведенные на рис. 24, показали, что при внутривенном введении противоопухолевый эффект Б-ДНКЖ на модели карциномы легких Льюис действительно повышался при понижении дозы этих комплексов до наименьшей использованной – 2 мкмоль на кг массы животного. Однако и в этом случае, как и в опытах с внутривенным введением мышам Б-ДНКЖ с глутатионом (рис. 23), практически полная блокада роста опухоли в течение первых двух недель сменялась пролиферацией карциномы Льюис (рис. 24).

Таким образом, были получены те же результаты, что и в опытах с внутривенным введением мышам Б-ДНКЖ. Единственное, что оказалось неожиданным, – при внутривенном введении эффективность торможения роста опухоли возрастала с понижением уровня дозы Б-ДНКЖ. Тем самым впервые был получен результат, противоположный современной парадигме, утверждающей, что при малых дозах монооксида азота (т.е. ДНКЖ) этот агент способствует развитию опухоли, и только при высоких дозах может вызывать ее гибель. Именно такая закономерность обнаруживается в опытах по воздействию различных доноров, в том числе ДНКЖ с различными тиолсодержащими лигандами, на различные культуры опухолевых клеток [103]. Предполагалось, что такая же закономерность должна быть характерной и для злокачественных опухолей, развивающихся в организме животных. Она и наблюдалась нами в опытах с внутривенным введением Б-ДНКЖ: эффект торможения роста опухолей в первые 10 суток после перевивки опухолей и начала введения Б-ДНКЖ усиливался при увеличении дозы этих комплексов. Почему же то-

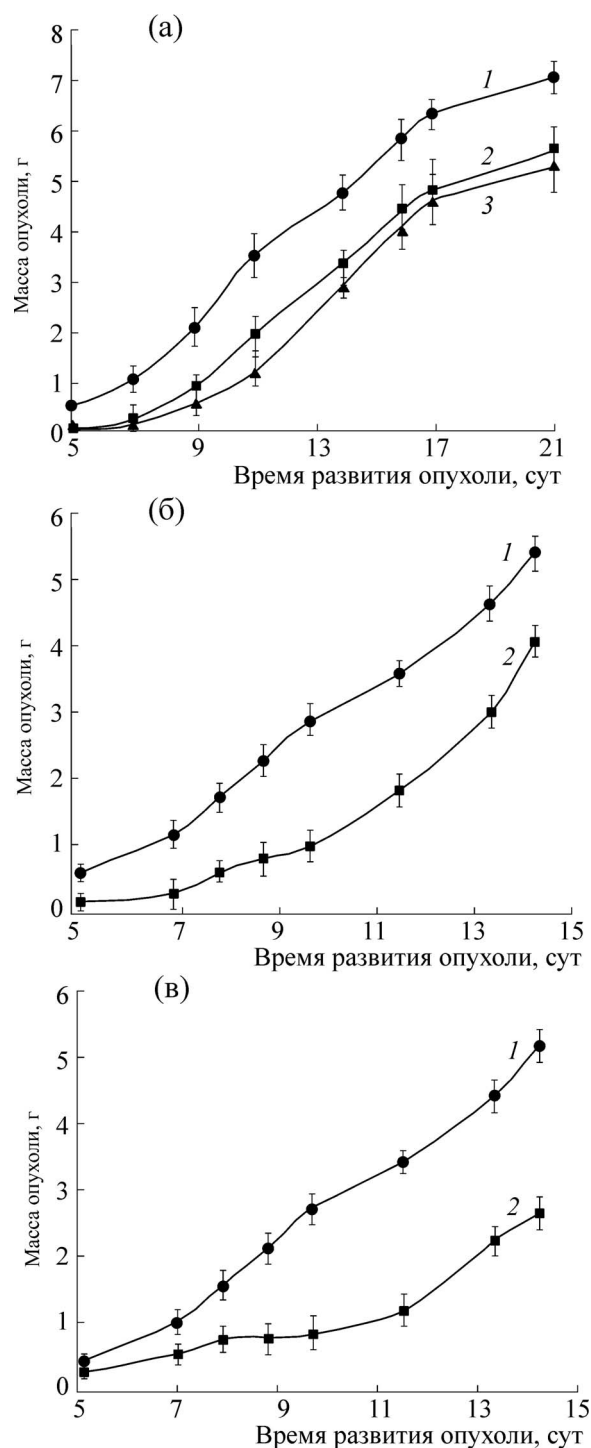


Рис. 23. Противоопухолевый эффект Б-ДНКЖ с глутатионом при его ежедневном внутривенном введении на 4–11-е сутки в различных дозах мышам на модели перевивной карциномы легких Льюис: (а) – в дозах 25 и 50 мкмоль на кг (кривые 2 и 3 соответственно); (б) – в дозе 100 мкмоль на кг (кривая 2); (в) – в дозе 200 мкмоль на кг, дробно два раза в сутки по 100 мкмоль на кг массы животных. Кривые 1 – контроль (без введения ДНКЖ).

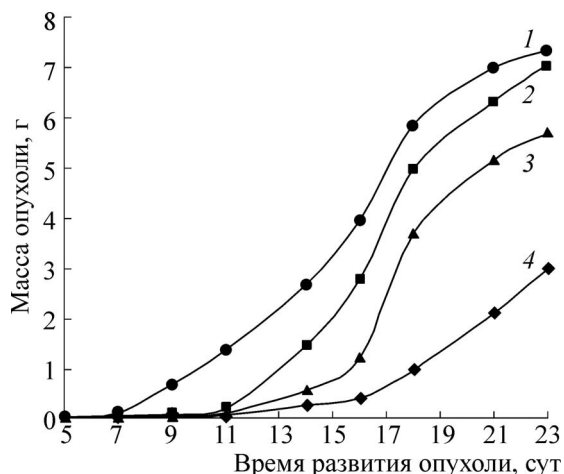


Рис. 24. Противоопухолевый эффект Б-ДНКЖ с глутатионом при его внутривенном введении мышам в хвостовую вену в суточных дозах 20, 10 и 2 мкмоль/кг (кривые 2–4 соответственно) после перевивки животным карциномы легких Льюис [102]. Кривая 1 – контроль (без введения ДНКЖ).

гда при внутривенном введении Б-ДНКЖ наблюдалась обратная закономерность?

Во-первых, следует с осторожностью подходить к результатам, полученных в опытах с внутрибрюшинным введением Б-ДНКЖ мышам-опухоленосителям. Переход этих комплексов из брюшины в кровь, обеспечивающий воздействие Б-ДНКЖ с глутатионом на опухоли, – сложный процесс и в первую очередь это касается прохождения в кровь молекул глутатиона, входящих в состав препарата. Об этом уже было сказано выше при обсуждении гипотензивного эффекта Б-ДНКЖ с глутатионом при его внутрибрюшинном введении животным (рис. 11 и 12). Из-за слабого проникновения этого трипептида в клетки и ткани может оказаться, что Б-ДНКЖ, дошедший до циркулирующей крови, мог уже не содержать в своем окружении свободный глутатион. В результате $Fe(NO)_2$ -группы из этих комплексов могли в основном образовывать белок-связанные ДНКЖ и лишь в небольшом количестве – низкомолекулярные ДНКЖ, включающие в себя низкомолекулярные тиолы, в том числе глутатион. Поскольку только низкомолекулярные ДНКЖ могли, легко перемещаясь в крови, воздействовать на опухолевые клетки, эффективность этого воздействия могла быть незначительной из-за низкого содержания в крови низкомолекулярных форм ДНКЖ.

Таким образом, только при внутривенном введении Б-ДНКЖ с глутатионом, при котором в кровь поступали и сами комплексы, и свободный глутатион, эффективность их воздейст-

вия на опухоли могла быть достаточно высокой, что и наблюдалось в опытах. Почему же это воздействие (длительная задержка роста опухоли) наиболее четко проявлялось при низких дозах Б-ДНКЖ?

Предположительно, это может быть обусловлено следующими причинами. Опухолевые клетки, перевиваемые животным, могли быть представлены двумя клонами, устойчивым и чувствительным к действию Б-ДНКЖ. Последний клон клеток в силу своей многочисленности и более высокой пролиферативной активности препятствовал на первых порах развитию устойчивого клона, так что этот клон начинал усиленно пролиферировать только после гибели клеток, чувствительных к действию Б-ДНКЖ. Очевидно, что эта гибель должна была ускоряться при повышении дозы Б-ДНКЖ с последующей пролиферацией клона устойчивых клеток. Именно это и наблюдалось в наших опытах.

Согласно данным группы австралийских ученых, руководимых проф. Д. Ричардсоном [104], устойчивость опухолевых клеток может определяться наличием у них значительного количества целого семейства важнейших для них ферментов – глутатион-S-трансфераз. Эти ферменты, присоединяя глутатион к различным водонерастворимым ароматическим соединениям, в том числе к лекарству, направленным против опухолевых клеток, делают их водорастворимыми и поэтому удаляемыми из опухолевых клеток. Это и обеспечивает устойчивость опухолевых клеток к действиям соответствующих лекарств. Некоторые представители семейства глутатион-S-трансфераз способны прочно связывать $Fe(NO)_2$ -группы из поступающих в клетки Б-ДНКЖ с глутатионом [105–108] и тем самым снимать их токсическое действие на опухоль [104]. В связи с этим можно предполагать, что губительного действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на злокачественные клетки можно добиться, каким-то образом уменьшив в них количество глутатион-S-трансфераз, например, инициировав супрессию генов, ответственных за синтез этих ферментов.

Не исключено, что имеются и другие, пока не изученные возможности преодоления устойчивости злокачественных клеток к действию ДНКЖ и других доноров NO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие в организме человека и животных системы эндогенно продуцируемого NO как одного из универсальных регуляторов разнообразных метаболических процессов фактиче-

ски является открытием существования в организме своеобразной природной медицины и ветеринарии, обеспечивающих корректировку нашего здоровья и здоровья животных. Природа дает нам шанс использовать ее «достижения» в этой области, приобретенные в ходе длительной биологической эволюции.

Изложенные выше результаты наших многолетних исследований позволяют утверждать, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут функционировать в организме человека и животных в качестве «рабочей формы» NO. Включение NO в эти комплексы обеспечивает его стабилизацию и перенос как внутри, так и вне клеток и тканей к мишеням биологического действия NO и его окисленной формы – ионов нитрозония – к гемсодержащим белкам, железо-серным и тиолсодержащим белкам. В результате ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами как по разнообразию мишеней их действия, так и в дозовом отношении полностью имитируют биологическое действие системы эндогенного NO. В связи с этим есть основание рассматривать растворы этих комплексов в качестве скажочной «живой воды», использование которой в медицине может резко поднять ее эффективность.

Следует также отметить, что множественность и разнообразие биологических мишеней NO означает, что этот агент, как и его «рабочая форма» – ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами – могут одновременно оказывать регуляторное действие на множество метаболических процессов, не вызывая тем самым дисбаланса сложной сетки этих процессов, негативно сказывающегося на общем состоянии организма животных и человека. Очевидно, что такой дисбаланс могут вызывать биологически активные соединения, регулирующие только небольшое количество биохимических и физиологических процессов.

В качестве интегрального показателя благоприятного действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами как универсального лекарственного средства можно привести недавно опубликованные результаты исследований группы акад. РАН С.М. Алдошина, показавшей, что эти комплексы резко (на 30%) повышают длительность жизни животных и их выживание после облучения сублетальными дозами проникающей радиации [109].

Что касается широкого в свете удивительных результатов этой группы использования ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, можно предложить в качестве источников этих комплексов свежесорванные яблоки. Как показывают наши последние исследования, концентра-

ция ДНКЖ в них может достигать нескольких мкмоль на кг влажной ткани [110].

Следует отметить, что до сих пор не изучалось взаимодействие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами с патогенными бактериями и микобактериями. Известно, что в последних в ответ на воздействие на них NO и его производных вырабатывается система антинитрозащитной защиты [111], обеспечивающей инфекционно-воспалительное поражение организма человека и животных. Эта защита, предотвращающая цитотоксическое действие NO на бактерии/микобактерии, инициируется экспрессией генов, ответственных за синтез ряда гемсодержащих белков, способных окислять NO до двуокиси азота или восстанавливать его до закиси азота и тем самым удалять NO из патогенных микроорганизмов. Работает ли этот механизм при контакте последних с ДНКЖ, или бактерии и микобактерии вырабатывают в ответ на эти комплексы другой способ защиты – ответ на этот вопрос требует специальных исследований. Важность этих исследований определяется тем, что современная медицина столкнулась с серьезной проблемой – развившейся резистентностью бактерий к антибиотикам. В связи с этим необходимы новые подходы в лечении инфекционных заболеваний. Не исключено, что использование способов подавления пролиферации патогенных бактерий, реализующихся в организме человека и животных на основе системы NO, в частности ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, может оказаться полезным при решении этой проблемы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-00708а) и Российского научного фонда (грант № 16-13-10295).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. J. Ignarro, *Nitric Oxide Biology and Pharmacology* (Academic Press, Zurich, Switzerland, 2000).
2. P. Domingos, A. M. Prado, A. Wong, et al., *Mol. Plant* **8**, 506 (2015).
3. A. M. Stern and J. Zhu, *Adv. Appl. Microbiol.* **87**, 187 (2014).
4. R. G. Knowles and S. Moncada, *Biochem. J.* **298**, 249 (1994).
5. A. R. Butler and P. Rhodes, *Anal. Biochem.* **249**, 1 (1997).
6. J. S. Beckman and W. H. Koppenol, *Am. J. Physiol.* **271**, c1424 (1996).
7. S. Czabo, H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Nat. Rev.* **6**, 662 (2007).
8. A. F. Vanin and A. L. Kleschyov, in *Nitric Oxide in Transplant Rejection and Anti-Tumor Defence*, Ed.

- by S. Lukiewicz and J. L. Zweier (Kluwer Academic Publishers, 1997), pp. 49–82.
9. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1 (2009).
 10. A. F. Vanin, *Open Conf. Proc. J.* **4**, 31 (2013)
 11. A. F. Vanin, in *Biorganometallic Chemistry Applications to Drug Discovery, Biocatalysis and Imaging*, Ed. by G. Jaouen and M. Salmain, (Wiley-VCH, 2015), pp. 203–238.
 12. А. Ф. Ванин, *Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами, физико-химия, биология, медицина* (АНО «Ижевский институт компьютерных исследований», Ижевск. 2015).
 13. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **54**, 15 (2016).
 14. Р. М. Налбандян, А. Ф. Ванин и Л. А. Блюменфельд, в сб. *Тезисы докл. конф. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах»* (Москва, 1964), с.18.
 15. А. Ф. Ванин и Р. М. Налбандян, *Биофизика* **10**, 167 (1965).
 16. А. Ф. Ванин, Л. А. Блюменфельд и А. Г. Четвериков, *Биофизика* **12**, 829 (1967).
 17. А. Ф. Ванин и Р. М. Налбандян, *Биофизика* **11**, 178 (1966).
 18. J. R. Mallard and M. Kent, *Nature* **204**, 1192 (1964).
 19. A. J. Vithaythil, J. L. Ternberg, and B. Commoner, *Nature* **207**, 1246 (1965).
 20. J. R. Lancaster and J. H. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1223 (1990)
 21. C. Pellat, Y. Henry, and J.-C. Drapier, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **166**, 119 (1990).
 22. J.-C. Drapier, C. Pellat, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.* **266**, 10162 (1991).
 23. M. Lepoivre, J.-M. Flavan, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.* **267**, 22294 (1992).
 24. J. A. Corbett, M. A. Sweetland, J. L. Wang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1731 (1993).
 25. A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, S. Hauschildt, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1177**, 37 (1993).
 26. J. Stadler, H. A. Bergonia, M. DiSilvio, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **302**, 4 (1993).
 27. A. K. Nussler, D. A. Geller, M. A. Sweetland, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **194**, 826 (1993).
 28. A. Mülsch, P. I. Mordvintcev, A. F. Vanin, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **196**, 1303 (1993).
 29. Y.-L. Geng, A.-D. Petersson, A. Wennmalm, et al., *Exp. Cell Res.* **214**, 418 (1994).
 30. N. R. Bastian, C.-T. Yim, and J. B. Hibbs, *J. Biol. Chem.* **269**, 5127 (1994).
 31. J. R. Lancaster, G. Werner-Felmeyer, and H. Watcher, *Free Rad. Biol. Med.* **16**, 869 (1994).
 32. D. Muller, A. Kleschyov, and J.-C. Stoclet, *Brit. J. Pharmacol.* **119**, 1281 (1996).
 33. K. Odoi, T. Akaike, H. Horie, et al., *Cancer* **77**, 1598 (1996).
 34. А. Ф. Ванин, *Биохимия* **32**, 226 (1967).
 35. C. C. McDonald, W. D. Philips, and H. F. Mower, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3319 (1965).
 36. А. Г. Четвериков, Э. К. Рууге, Д. Ш. Бурбаев и др. *Биофизика* **14**, 932 (1969).
 37. А. Ф. Ванин, Дис. ... докт. биол. наук, Институт хим. физики, М., 1980.
 38. R. N. Watts, C. Hawkins, P. Ponka, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 7670 (2006).
 39. J. Toledo, C. A. Bosworth, S. W. Hennon, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 28926 (2008).
 40. C. A. Bosworth, J. Toledo, J. W. Zmijewski, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **45**, S110 (2008).
 41. J. R. Hickok, S. Sahni, H. Shen, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **51**, 1558 (2011).
 42. H. C. Lock, S. Sahni, V. Richardson, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **75**, 14 (2014).
 43. А. Ф. Ванин, В. Д. Микоян, Л. Н. Кубрина и др. *Биофизика* **60**, 735 (2015).
 44. A. F. Vanin, E. N. Burgova, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **62**, 1 (2017).
 45. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 1236 (2010).
 46. A. F. Vanin, *Methods Enzymol.* **301**, 269 (1999).
 47. A. F. Vanin and D. S. Burbaev, *Biophys. J.* **14** (2011) 878236.
 48. M. W. Foster, L. Liu, M. Zeng, et al., *Biochemistry* **48**, 792 (2009).
 49. A. Kezler, A. R. Diers, Z. Ding, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **62**, 1 (2017).
 50. A. F. Vanin, R.R.Borodulin, V.D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **66**, 1 (2017).
 51. J. H. Enemark and R. D. Feltham, *Coord. Chem. Rev.* **13**, 339 (1974).
 52. T. T. Lu, S. Z. Lai, and Y. W. Li, *Inorg. Chem.* **50**, 5396 (2011).
 53. A. F. Shestakov, Yu. M. Shul'ga, N. S. Emel'yanova, et al., *Rus.Chem. Bull.* **56**, 1289 (2007).
 54. M. C. Tsai, F. T. Tsai, and T. T. Lu, *Inorg. Chem.* **48**, 9579 (2009).
 55. J. C. Melo Pereira, A. V. Iretskii, R.-M. Han, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 328 (2015)
 56. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **29**, 4 (2013).
 57. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvidkiy, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **29**, 110 (2013).
 58. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **26**, 148 (2012).
 59. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhnikov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **18**, 37 (2012).
 60. А. Л. Клещев, П. И. Мордвинцев и А. Ф. Ванин, *Stud. Biophys.* **105**, 93 (1985).
 61. П. И. Мордвинцев, М. Д. Путинцев, М. Е. Галаган и др., *Бюл. Всесоюз. кардиол. центра АМН СССР*, № 1, 46 (1988).
 62. М. Е. Галаган, Е. В. Орановская, П. И. Мордвинцев и др., *Бюл. Всесоюз. кардиол. центра АМН СССР*, № 2, 75 (1988).
 63. Y. P. Vedernikov, P. I. Mordvintcev, I. V. Malenkova, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **211**, 313 (1992).

64. A. F. Vanin, V. P. Mokh, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **16**, 322 (2007).
65. F. W. Flitney, L. I. Megson, D. E. Flitney, et al., *Brit. J. Pharmacol.* **107**, 842 (1992).
66. V. L. Lakomkin, A. F. Vanin, A. A. Timoshin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **16**, 413 (2007).
67. M. I. Remizova, N. I. Kochetygov, K. A. Kerbout, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **662**, 40 (2011).
68. А. Ю. Гостеев, А. В. Зорин, О.В. Родненков и др., *Терапевт. архив* **9**, 49 (2014).
69. П. И. Мордвинцев, В. Г. Руднева, А. Ф. Ванин и др., *Биохимия* **51**, 1851 (1986).
70. В. А. Кузнецов, П. И. Мордвинцев, Е. К. Данк и др., *Вопр. мед. химии* **5**, 43 (1988).
71. М. М. Архипова, В. Д. Микоян и А. Ф. Ванин, *Биофизика* **53**, 315 (2008).
72. В. П. Ширинский, В. И. Капелько и А. Ф. Ванин, Патент на изобретение № 252953 от 14 июня 2013 г.
73. Е. Б. Шамова, О. Д. Бичан, Е. С. Дрозд и др., *Биофизика* **56**, 265 (2011).
74. А. Б. Шехтер, Т. Г. Руденко, В. А. Сереженков и др., *Биофизика* **52**, 5434 (2007).
75. A. V. Shekhter, T. G. Rudenko, L. P. Istranov, et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* **78**, 8 (2015).
76. A. A. Andreyev-Andriyevsky, V. D. Mikoyan, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **24**, 217 (2011).
77. О. И. Писаренко, Л. И. Серебрякова, О. В. Цки-тишвили и др., *Изв. РАН. Сер. биол.* **1**, 110 (2008).
78. H. Ferry-Dumazet, H.C. Ferry-Dumazet, M. Dupouy, et al., *Leukemia* **16**, 708 (2002).
79. В. А. Сереженков, Е. В. Калинина, В. А. Глазунова и др., *Биофизика* **52**, 869 (2007).
80. M. W. Foster and J. A. Cowan, *J. Amer. Chem. Soc.* **121**, 4093 (1999).
81. H. Ding and B. Demple, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5146 (2000).
82. H. Cruz-Ramos, J. Crack, G. Wu, et al., *EMBO J.* **21**, 3235 (2002).
83. F. C. Lo, C. L. Chen, C. M. Lee, et al., *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 961 (2008).
84. B. D. Autreaux, D. Touati, D. Beresh, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16619 (2002).
85. N. P. Tucker, M. G. Hicks, T. A. Clarke, et al., *PloS One* **11**, e3623 (2008).
86. X. Duan, J. Yang, B. Ren, et al., *Biochem. J.* **417**, 783 (2009).
87. J. C. Crack, L. J. Smith, M. R. Stapleton, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 1112 (2011).
88. F. C. Lo, J. F. Lee, W. F. Liaw, et al., *Chem. Eur.* **18**, 2565 (2012).
89. С. В. Васильева, М. В. Ступакова, И. И. Лобышева и др., *Биохимия* **66**, 1209 (2001).
90. M. Graziano and L. Lamattina, *Trends Plant Sci.* **10**, 4 (2005).
91. V. P. Mokh, A. P. Poltorakov, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **22**, 266 (2010).
92. А. А. Timoshin, V. L. Lakomkin, А. А. Abramov, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **765**, 525 (2015).
93. С. Ю. Машина, А. Ф. Ванин, В. А. Сереженков и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **136**, 26 (2003).
94. N. Y. Giliano, L. V. Konevega, L. A. Noskin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **24**, 151 (2011).
95. Е. Н. Бургова, Н. А. Ткачев и А. Ф. Ванин, *Биофизика* **57**, 105 (2012).
96. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, L. V. Adamyan, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **727**, 140 (2014).
97. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, O. V. Paklina, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **741**, 37 (2014).
98. J. Mier-Cabrera, S. Conzalez-Gallardo, and G. Hernandez-Guerrero, *Reprod. Sci.* **20**, 1332 (2013).
99. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **59**, 508 (2014).
100. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **60**, 152 (2015).
101. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **60**, 1157 (2015).
102. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **62**, 591 (2017).
103. S.-H. Wu, C.-Y. Lu, Y.-L. Chen, et al., *Inorg. Chem.* **55**, 9384 (2016).
104. Y. Suryo Rahmanto, D. S. Kalinowski, D. J. Lane, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, 6950 (2012).
105. F. De Maria, J. Z. Pedersen, A. M. Caccuri, et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 42283 (2003).
106. P. Turella, J. Z. Pedersen, A. M. Caccuri, et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 42294 (2003).
107. E. Cesareo, L. J. Parker, J. Z. Pedersen, et al., *J. Biol. Chem.* **280**, 42172 (2005).
108. J. Z. Pedersen, F. De Maria, P. Turella, et al., *J. Biol. Chem.* **282**, 6364 (2007).
109. S. M. Aldoshin, V. V. Bezrukov, E. N. Gorban, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **100**, S83 (2016).
110. В. Д. Микоян, Л. С. Ванина и А. Ф. Ванин, *Биофизика* **62**, 551 (2017).
111. J. Green, M. D. Rolfe, and L. J. Smith, *Virulence* **5**, 1 (2013).

**Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands
as a Base for Developing Drugs with Diverse Therapeutic Activities:
Physico-Chemical and Biological Characteristics
of the Complexes Underlying This Field**

A.F. Vanin* **

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

***Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University,
ul. Trubetskaya 8, Moscow, 119991 Russia*

Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in animal tissues in paramagnetic (EPR-active) mononuclear and diamagnetic (EPR-silent) binuclear forms in the presence of nitric oxide in animal organisms provide nitric oxide stabilization and storing (in protein-bound dinitrosyl iron complexes) as well as its transfer (in low-molecular dinitrosyl complexes) to biological targets acting not only as the nitric oxide donors but also as nitrosonium ion (NO^+) donors. The latter determines the ability of dinitrosyl iron complexes to S-nitrosate diverse thiol-containing proteins, that results in participation of these complexes in a wide array of physiological and biochemical processes. With regard to diverse high biological activity and dose dependence dinitrosyl iron complexes simulates the system of endogenous nitric oxide. This fact as well as wide representation of the complexes (predominantly in binuclear form) in animal tissues make it reasonable to consider these complexes as a “working form” of nitric oxide. It is supposed that the drugs developed with the use of DNICs can sharply enhance the efficiency of modern medical practice.

Keywords: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes