

КАТИОН НИТРОЗОНИЯ КАК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ КОМПОНЕНТ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ

© 2024 г. А.Ф. Ванин^{*,#}, Л.А. Островская^{**,##}, Д.Б. Корман^{**}, В.А. Рыкова^{**},
Н.В. Блюхтерова^{**}, М.М. Фомина^{**}, В.Д. Микоян^{*}, Н.А. Ткачев^{*}

^{*}Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

[#]E-mail: vanin.dnic@gmail.com

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

^{##}E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

После доработки 23.04.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Сочетанное применение двух соединений — биядерной формы динитрозильных комплексов железа с глутатионом (100 мкМ/кг, подкожно) и диэтилдитиокарбамата натрия (500 мкМ/кг, внутривенно), вводившихся восьмикратно, вызывает полное ингибирование развития солидной опухоли мышей на протяжении двух недель после перевивки (карцинома легких Льюис). Однако при оценке противоопухолевого эффекта на 20-е сутки после окончания введения препаратов максимальная активность — торможение роста опухоли на 60% — наблюдается при введении препаратов в последовательности «диэтилдитиокарбамат, а затем через час биядерные динитрозильные комплексы железа», тогда как при применении препаратов в обратной последовательности ингибирование роста опухоли не превышает 30%. На основе анализа данных ЭПР-измерений тканей опухоли (15-е сутки развития опухоли) сделан вывод о том, что торможение роста опухолей было вызвано катионами нитрозония, высвобождающимися из биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом в ходе распада этих комплексов под действием диэтилдитиокарбамата натрия.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, дитиокарбамат, катионы нитрозония, карцинома легких Льюис.

DOI: 10.31857/S0006302924060231, EDN: NJJOIL

Ранее мы показали, что распад динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами при их контакте с производными дитиокарбамата приводит, как это схематически показано на рис. 1, к образованию мононитрозильного комплекса железа с производными дитиокарбамата (МНКЖ-ДЭТК) в результате перехода железо-мононитрозильной группы из железо-динитрозильного фрагмента моно- и биядерной формы ДНКЖ на дитиокарбаматные лиганды и высвобождению из ДНКЖ катиона нитрозония (NO^+) [1, 2].

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, МНКЖ-ДЭТК — мононитрозильные комплексы железа с производными дитиокарбамата, Б-ДНКЖ-Г — биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат натрия, п/к — подкожно, в/б — внутривенно, ТРО — коэффициент торможения роста опухоли.

Появляющиеся в ходе этого распада мононитрозильные комплексы железа с производными дитиокарбамата достаточно устойчивы и не выступают в отличие от ДНКЖ качестве эффективных доноров нейтральных молекул NO , о чем свидетельствует факт отсутствия какого-либо заметного снижения артериального давления у животных при введении в их организм мононитрозильных комплексов с производными дитиокарбамата [3].

Что касается NO^+ , высвобождающихся из ДНКЖ, эти катионы, связываясь с различными тиолсодержащими белками, критически важными для жизнедеятельности клеток и тканей, как правило, инициируют их гибель.

Такого рода исход процедуры обработки культуры опухолевых клеток, бактерий и короновируса SARS-CoV-2 в организме сирийских хомячков сначала биядерными динитрозильными ком-

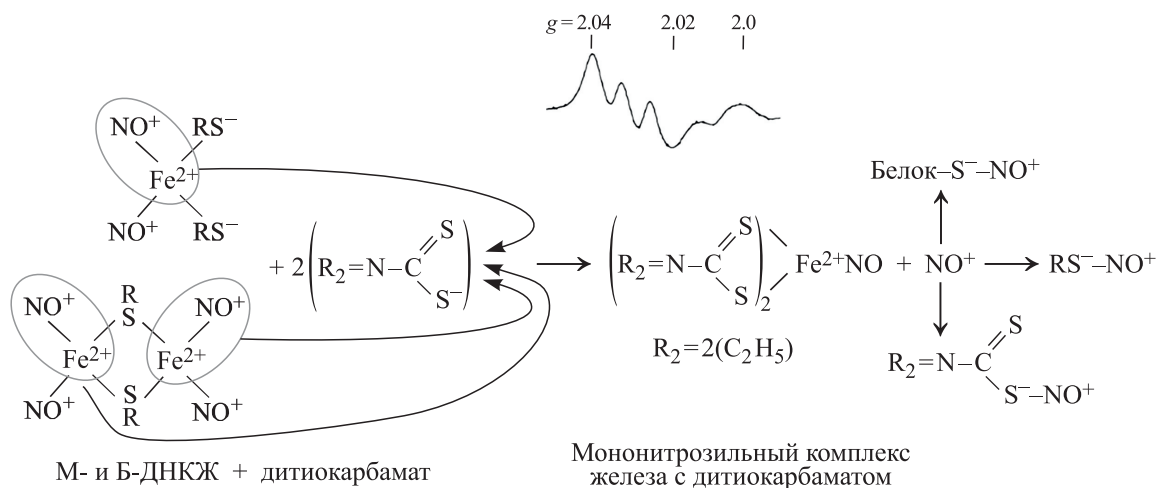


Рис. 1. Превращение моно- и биядерных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ-дителиокарбамат, сопровождаемое высвобождением в среду катиона нитрозония. В центре приведен триплетный сигнал ЭПР МНКЖ-дителиокарбамата, зарегистрированный при 77 К.

плексами железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-Г), а затем производными дителиокарбамата (N-метил-D, L-глуканин-дителиокарбаматом или диэтилдителиокарбаматом) мы продемонстрировали в наших предыдущих исследованиях [2, 4, 5].

Была предпринята попытка проверить эффект такой же процедуры — последовательного действия Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК — на развитие ряда перевиваемых опухолей мышей [6]. Заметного влияния на этот процесс в такого рода опытах мы не обнаружили. Не исключено, что эта неудача была обусловлена использованием низких доз Б-ДНКЖ-Г (2 мкМ/кг) против 250 мг/кг ДЭТК. В этих условиях высвобождавшиеся из Б-ДНКЖ-Г катионы нитрозония могли связываться преимущественно с тиоловой группой самого ДЭТК и не влиять на функционирование внутриклеточных тиолсодержащих белков. Поэтому в настоящей работе мы резко подняли дозу Б-ДНКЖ-Г (до 100 мкМ/кг) против 500 мкМ/кг ДЭТК. Это повышение, как будет показано ниже, существенно усилило противоопухолевое действие Б-ДНКЖ-Г+ДЭТК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. В экспериментах использовали сульфат железа (FeSO₄·7H₂O, Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, диэтилдителиокарбамат натрия (ДЭТК) и нитрит натрия (Sigma, США).

Биядерная форма ДНКЖ с глутатионом. Комплекс синтезировали по методу, описанному в работе [7]. В соответствии с этим методом синтез 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-Г проводили следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на

воздухе добавляли 124 мг глутатиона (40 мМ), приводившего к снижению pH раствора до 4.0, с последующим введением в него 56 г сульфата железа (20 мМ), приводившего к дальнейшему снижению pH раствора до 3.8. После этого в раствор добавляли 14 мг нитрита натрия (20 мМ), что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленному образованием S-нитрозоглутатиона. Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерн После этого, добавляя каплями крепкий раствор щелочи (NaOH), pH раствора повышали до 7.2–7.4, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся синтезом Б-ДНКЖ-Г при участии S-нитрозоглутатиона, Fe²⁺ и глутатиона. Для полного превращения S-нитрозоглутатиона в Б-ДНКЖ-Г требовалось не менее 4–5 ч. Полученный раствор после удаления путем фильтрации через бумагу образовавшегося за это время осадка гидроокиси железа замораживали в жидком азоте и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Концентрацию полученного Б-ДНКЖ-Г (с молекулярной массой 846 Да) оценивали оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции, равными соответственно 4600 и 3700 М⁻¹см⁻¹ в пересчете на один железо-динитрозильный фрагмент комплекса [8]. Согласно этой оценке концентрация синтезированного Б-ДНКЖ-Г в растворе составляла 10 мМ.

Диэтилтиокарбамат натрия. Применяли конвенциональный препарат диэтилдителиокарбамата натрия [C₂H₅]₂=N-CS₂ (Sigma, США).

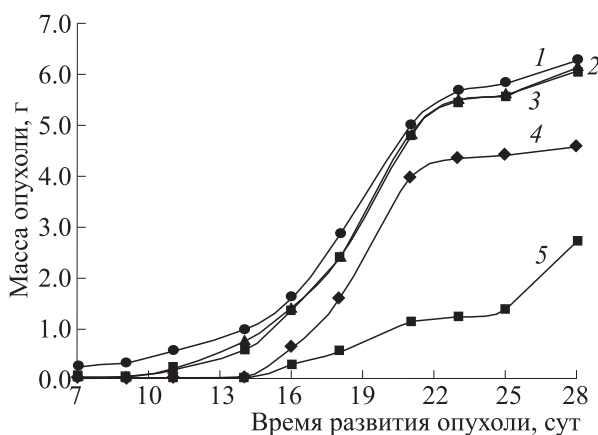


Рис. 2. Влияние Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг, п/к) и ДЭТК (500 мкМ/кг, в/б) на кинетику развития карциномы легких Льюис: 1 — контроль, 2 — Б-ДНКЖ-Г, 3 — ДЭТК, 4 — Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК с интервалом 1 ч, 5 — ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г с интервалом 1 ч. Препараты вводили с 1 по 8 сутки после перевивки опухоли.

Противоопухолевая активность *in vivo*. Эксперименты проведены на 80 инбредных мышках линии BDF₁ — гибридах первого поколения f₁(C₅₇Bl/6[DBA₂]) с массой тела 18–20 г разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России». В качестве тест-системы служила солидная опухоль мышей — карцинома легких Льюис, перевиваемая подкожно (п/к) в соответствии со стандартной методикой [9].

Препараты вводили в водных растворах с 1 по 8 сутки после перевивки опухоли: Б-ДНКЖ-Г в суточной дозе 100 мкМ/кг, п/к, а ДЭТК — в суточной дозе 500 мкМ/кг внутрибрюшинно (в/б). При сочетанном применении препаратов была изучена их эффективность при альтернативной последовательности введения соединений с интервалом в 1 ч.

Оценка противоопухолевой активности препаратов проведена путем сопоставления кинетики роста опухоли в группах контрольных и леченых животных. В качестве показателя ростингибирующего эффекта препаратов служил коэффициент торможения роста опухоли ТРО (%), который определяли из соотношения $TPO = (P_C - P_T) / P_C (\%)$, где P_C и P_T — объем (или масса) опухоли в группах контрольных и леченых животных соответственно. С этой целью проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как $V = ab^2/2$, где a — длина, b — высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли объем перемножали на плотность опухолевой ткани, равную 1 г/см³ [9].

ЭПР-измерения биоматериала. ЭПР-измерения проводили в тканях опухоли и печени, полученных от мышей-опухоленосителей (по две мы-

ши в группе) на 15-е сутки после перевивки опухоли. Образцы биологического материала отбирали через 1 ч после введения препаратов в следующих группах:

- Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг, п/к);
- ДЭТК (100 мг/кг, в/б);
- Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг, п/к) + ДЭТК (100 мг/кг, в/б) с интервалом 1 ч;
- ДЭТК (100 мг/кг, в/б) + Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг, п/к) с интервалом 1 ч.

Биоматериал помещали в цилиндрические ампулы диаметром 4 мм и замораживали в жидком азоте. Масса извлеченных затем из этих ампул, замороженных образцов составляла не менее 0.5 г при длине образца 3 см. При такой длине образец полностью заполнял рабочий объем резонатора радиоспектрометра. Измерения спектров ЭПР проводили на модифицированном радиоспектрометре «Радиопан» (Польша) при температуре жидкого азота.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка оценок массы опухолей проведена с использованием пакета компьютерных программ «Statistica 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК на развитие карциномы Льюис при их индивидуальном и сочетанном (в альтернативной последовательности) применении характеризуют данные, представленные на рис. 2 и в табл. 1.

Как видно из представленных данных, индивидуальное применение Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) практически не влияет на развитие опухоли, о чем свидетельствует совпадение соответствующих кривых 2 и 3 с контрольной кривой 1 на рис. 2.

Таблица 1. Влияние Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК при индивидуальном и сочетанном применении на развитие карциномы легких Льюис

| Препарат | Суточная доза и способ введения | Средняя масса опухоли, г | ТРО, % |
|-----------------|-----------------------------------|--------------------------|--------|
| Б-ДНКЖ-Г | 100 мкМ/кг, п/к | 6.11 ± 0.4 | 0 |
| ДЭТК | 500 мкМ/кг, в/б | 6.10 ± 0.4 | 0 |
| Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК | 100 мкМ/кг, п/к + 500 мкМ/кг, в/б | 4.55 ± 0.3 | 30 |
| ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г | 500 мкМ/кг, в/б + 100 мкМ/кг, п/к | 2.71 ± 0.3 | 60 |
| Контроль | — | 6.26 ± 0.4 | — |

Примечание. Введение препаратов Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) с 1 по 8 сутки после перевивки опухоли. Оценка эффекта проведена на 28-е сутки развития опухоли.

Сочетанное применение препаратов в любой последовательности приводит к полному ингибированию роста опухоли на протяжении 14 суток ее развития, то есть в течение всего периода введения препаратов на протяжении 8 суток и еще в течение 6 суток после окончания воздействия (рис. 2, кривые 4 и 5).

В дальнейшем, начиная с 15 суток, развитие опухолей у мышей, получавших комбинацию препаратов, возобновляется, однако наблюдаются весьма существенные различия в кинетике их развития в зависимости от последовательности введения препаратов.

Так, при оценке противоопухолевого эффекта комбинации препаратов на 28-е сутки развития опухоли (20-е сутки после окончания введения препаратов) показано, что торможение роста опухоли у мышей, получавших ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-Г, составляет 60%, в то время как введение этих соединений в альтернативной последовательности приводит к ингибированию роста опухоли лишь на 30% по сравнению с контролем (рис. 2, кривые 4 и 5; табл. 1).

Результаты ЭПР-измерений образцов тканей опухолей и печени, взятых через 1 ч после индивидуального и сочетанного (в альтернативной последовательности) воздействия препаратов Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б), а также у контрольных животных (15-е сутки развития опухоли) представлены на рис. 3.

В опухолевом образце, как и ожидалось, был зарегистрирован триплетный ЭПР-сигнал нитрозильного комплекса гем-содержащего белка, очевидно, гемоглобина (рис. 3а, спектр 1).

Такого рода сигнал был впервые обнаружен еще в 1960-х годах группой А. Саприна при ЭПР-измерениях ими тканей злокачественных опухолей [10]. Естественно, в то время невозможно было предположить, какие процессы, развивающиеся в организме животных и человека, ответственны за появление этих комплексов и чем

конкретно обусловлено появление в опухоли оксида азота, связывающегося с гем-содержащими белками с образованием ЭПР-активных нитрозильных гем-содержащих комплексов. Только сейчас, когда оксид азота признан в качестве одного из фундаментальных регуляторов метаболических процессов, можно предполагать, что этот агент может вырабатываться иммунокомпетентными клетками с защитной целью в ответ на злокачественное перерождение тканей организма. Исходя из этого, можно предположить, что источником оксида азота, ответственного за образование гем-нитрозильного комплекса в опухоли, могли быть активированные макрофаги, в которых индуцибельная NO-синтаза начинала синтезировать NO [11].

Характерно, что триплетный сигнал ЭПР гем-нитрозильных комплексов, зарегистрированный нами в опухоли, не обнаруживался в печени мышей-опухоленосителей (рис. 3б, спектр 1') и тем самым в крови, поскольку в образце печени сохранялось достаточно большое количество крови. В спектре ЭПР этой ткани регистрировались сигналы ЭПР свободных радикалов при $g = 2.0$, сигнал комплексов молибдена при $g = 1.97$ и сигнал восстановленных железо-серных белков при $g = 1.94$, характерные для печени интактных животных [12].

После введения мышам-опухоленосителям Б-ДНКЖ-Г в опухоли регистрировался интенсивный сигнал ЭПР с $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$ (рис. 3а, спектр 2), называемый в соответствии со средним значением g -фактора, равным 2.03 — сигналом 2.03 [13]. Сохранение анизотропной формы этого сигнала при повышении температуры его регистрации от 77 К до комнатной температуры позволяет, в соответствии с работой [14], отнести его к моноядерным ДНКЖ, связанным с тиоловыми группами белков. Появление этих комплексов, очевидно, было обусловлено переносом железо-динитрозильных фрагментов из

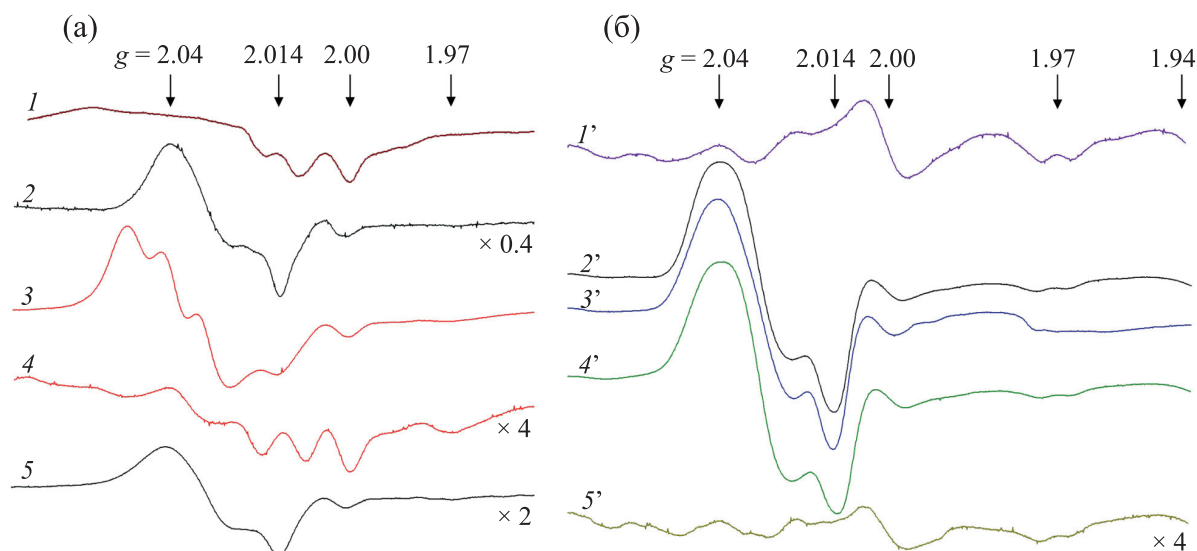


Рис. 3. Спектры ЭПР опухоли (а) и печени (б) мышей-опухоленосителей (карцинома легких Льюис, 15-е сутки после перевивки): 1 – контроль, 2 – Б-ДНКЖ-Г, 3 – Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК, 4 – ДЭТК, 5 – ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г; 1' – контроль, 2' – Б-ДНКЖ-Г, 3' – Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК, 4' – ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г, 5' – ДЭТК. Спектры зарегистрированы при 77 К, большинство при одном усилении спектрометра. Усиление спектрометра для спектров 2, 4, 5 и 5' отличается на величину, указанную с правой стороны.

ЭПР-неактивных диамагнитных Б-ДНКЖ-Г на тиоловые группы белков ткани опухоли.

При последовательном введении мышам Б-ДНКЖ-Г, а затем ДЭТК вместо сигнала 2.03 в опухоли наблюдался триплетный сигнал ЭПР, характерный для МНКЖ-ДЭТК (рис. 3а, спектр 3), появление которого было, очевидно, обусловлено процессом, показанным на рис. 1. Это означает, что ткань опухоли должна была подвергнуться атаке катионов нитрозония, что и могло привести к подавлению роста опухоли в первые две недели после ее перевивки, как это показано на рис. 2.

Как было показано, рост опухоли в течение первых двух недель после ее перевивки полностью блокировался и в условиях альтернативной последовательности введения препаратов: ДЭТК, а затем ДНКЖ-Г (рис. 2). ЭПР-измерения показали, что в этом случае наблюдался сигнал 2.03 без заметной его трансформации в триплетный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК (рис. 3а, спектр 5).

Что касается сигнала ЭПР в опухоли после введения животным только одного ДЭТК, он был идентичен сигналу ЭПР гем-нитрозильных комплексов, зарегистрированному в контрольной опухоли (рис. 3а, спектр 4).

В печени животных-опухоленосителей как после введения им Б-ДНКЖ-Г, так и после сочетанного введения им последовательно Б-ДНКЖ-

Г+ДЭТК регистрировался только сигнал 2.03 (рис. 3б, спектры 2' и 3' соответственно).

Таким образом в отличие от опухоли, в которой ДЭТК реагировал с ДНКЖ с образованием МНКЖ-ДЭТК, этот процесс не имел места в печени животного-опухоленосителя.

При введении этим животным только ДЭТК в печени регистрировался спектр ЭПР (рис. 3б, спектр 5'), идентичный спектру 1', приведенному на рис. 3б. После дополнительного введения ДНКЖ в спектре ЭПР печени регистрировался интенсивный сигнал 2.03 (рис. 3б, спектр 4').

ОБСУЖДЕНИЕ

Среди изложенных выше результатов нашей работы наиболее интересными, требующими обсуждения представляются следующие факты.

Во-первых, это факт резкой активации роста опухолей при сочетанной обработке мышей Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК после двух недель полного подавления развития опухолей. Данный факт, часто наблюдаемый при различных видах химиотерапии злокачественных опухолей, объясняется обычно наличием в опухолях двух клонов злокачественных клеток, характеризующихся слабой и высокой устойчивостью к химиотерапевтическим агентам. При этом первый клон составляет основную массу опухоли, препятствуя конкурентным путем росту более злокачественного

клона. После гибели менее злокачественных клеток их более злокачественные аналоги начинают быстро пролиферировать, обгоняя иногда контрольные опухоли, не подвергавшиеся химиотерапии.

В наших опытах обращает на себя внимание различие в скорости роста более злокачественного клона в карциноме Льюиса у мышей при сочетанной их обработке сначала Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг), а затем ДЭТК (500 мкМ/кг), с одной стороны, или же, наоборот, сначала ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-Г — с другой стороны. Не исключено, что в первом случае значительная часть катионов нитрозония, высвобождавшихся из Б-ДНКЖ-Г, могла связываться с тиоловой группой в ДЭТК и не оказывать тем самым значительного токсического действия на тиолсодержащие белки, критически важные для клеточного и тканевого метаболизма мышей. При обратной последовательности введения препаратов — за 1 ч до контакта ДЭТК с Б-ДНКЖ-Г значительная часть ДЭТК, как низкомолекулярного соединения, могла быть удалена из организма, так что оставшаяся его часть не могла конкурировать с эндогенными тиолсодержащими соединениями за NO^+ , что и приводило к более выраженному токсическому эффекту последовательности введения ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г в отношении опухолей у животных. Другими словами, в этом варианте концентрация высвободившихся из Б-ДНКЖ-Г катионов нитрозония, способных атаковать тиолсодержащие белки печени, была существенно выше, чем при введении ДЭТК после Б-ДНКЖ-Г.

Эти предположения пока слабо согласуются с результатами эксперимента. Так, например, в опухоли после введения мышам сначала Б-ДНКЖ-Г, а затем ДЭТК регистрировался интенсивный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК, свидетельствующий о полном превращении в этот комплекс Б-ДНКЖ-Г (рис. 3а, спектр 3). Такое превращение в опухоли не наблюдалось при введении мышам сначала ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-Г (рис. 3а, спектр 5). В этом случае в опухоли регистрировался только сигнал 2.03. Если сигнал МНКЖ-ДЭТК в спектре ЭПР этой ткани и присутствовал, он мог маскироваться сигналом 2.03, а это означает, что его интенсивность была незначительной, следовательно, незначительной была и концентрация высвободившихся из Б-ДНКЖ-Г катионов нитрозония. Тем не менее, ее было достаточно, чтобы оказывать на опухолевые клетки мощное токсическое действие, причем не только на слабо- но и на высокоустойчивые к

NO^+ злокачественные клетки. Действительно ли это так, могут решить результаты наших дальнейших исследований, в которых при последовательности введения сначала Б-ДНКЖ-Г, а затем ДЭТК молярное соотношение между ними будет повышено с 1 : 5 (в настоящих опытах) до 1 : 2. В этом случае, в соответствии со схемой на рис. 1, весь ДЭТК должен будет включаться в МНКЖ-ДЭТК, так что вероятность связывания NO^+ с ДЭТК должна будет существенно снизиться.

Второй загадочный результат работы состоит в следующем.

При введении животным-опухоленосителям сначала Б-ДНКЖ-Г, а затем ДЭТК в опухоли методом ЭПР, как мы и ожидали, было продемонстрировано полное превращение Б-ДНКЖ-Г в МНКЖ-ДЭТК — вместо сигнала 2.03 в опухоли был зарегистрирован триплетный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК (рис. 3а, спектр 3), тогда как в печени тех же животных такое превращение не имело места (рис. 3б, спектр 3')?!

Не исключено, что это различие могло быть обусловлено различием в механизмах доставки Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК в опухоль и в печень. В опухоли данные реагенты могли доставляться при посредстве макрофагов, атакующих опухоль. При этом макрофаги могли включать в себя как Б-ДНКЖ-Г, так и ДЭТК, что и обеспечивало превращение в опухоли Б-ДНКЖ-Г в МНКЖ-ДЭТК. Печень захватывала только Б-ДНКЖ-Г, при этом железо-динитрозильные фрагменты из этих комплексов переходили на тиоловые группы белков печени с образованием в этом органе устойчивых белковых ДНКЖ. Что касается ДЭТК, они поступали в основном в почки, с последующей их фильтрацией в мочу. Естественно, это предположение, как и вышесказанное, требует экспериментального доказательства.

В заключение следует отметить, что, несмотря на загадочность полученных в работе результатов, которые остаются трудно объяснимыми, все же есть основания предполагать, что катионы нитрозония могут оказаться теми химическими агентами, которые могут существенно сдвинуть решение проблемы химиотерапии злокачественных заболеваний. Полученные нами результаты позволяют предположить, что эти катионы способны оказывать цитотоксическое действие *in vivo* не только на высокочувствительные к химическим агентам опухолевые клетки, но и на их аналоги, резистентные к большинству этих соединений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00009)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ ПРИ РАБОТЕ С ЖИВОТНЫМИ.

Экспериментальные работы, проводимые с привлечением лабораторных животных, выполнялись в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, которые регламентированы специальными правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей («European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS, 123)», Strasbourg, 1986), а также биоэтическими нормативами, приводимыми в руководствах «Guide for care and use of laboratory animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press)», «Anticancer Drug Development Guide. Pre-clinical screening, clinical trials, and approval», Second ed. (Edt. by B.A.Teicher and P.A.Andrews) // Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004, p.450, и согласованными с Этическим комитетом при ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (правила №51СП 2.2.1.3218-14 от 29.08.2014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Borodulin R. R., Kubrina L. N., Mikoyan V. D., Poltorakov A. P., Shvydkiy V. O., Burbaev D. Sh., Serezhnikov V. A., Yakhontova E. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO⁺ donors. *Nitric Oxide*, 29, 4–16 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2012.11.001
- Vanin A. F., Tronov V. A., and Borodulin R. R. Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF-7 human breast cancer cell culture). *Cell Biochem. Biophys.*, 79 (1), 93–102 (2021). DOI: 10.1007/s12013-020-00962-x
- Галаган М. Е., Орановская Е. В., Мордвинцев П. И., Медведев О. С. и Ванин А. Ф. Гипотенизивный эффект динитрозильных комплексов железа на бодрствующих животных. *Бюл. Всесоюз. кардиол. центра*, 2, 75–79 (1988).
- Ванин А.Ф., Телегина Д.И., Микоян В.Д., Ткачев Н.А., Васильева С.В. Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионом нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов. *Биофизика*, 67, 938–946 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050106
- Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Пьянков О. В., Багрянская Е. Г., Микоян В. Д. и Попкова В. Я. Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка. *Биофизика*, 67 (5), 969–981 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050167
- Ванин А. Ф., Островская Л. А., Корман Д. Б., Блюхтерова Н. В., Рыкова В. А. и Фомина М. М. Роль катиона нитрозония в механизме противоопухолевого эффекта препаратов динитрозильных комплексов железа. *Биофизика*, 67 (5), 982–990 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050179
- Borodulin R. R., Kubrina L. N., Shvydkiy V. O., Lakomkin V. L., and Vanin A. F. A simple protocol for the synthesis of dinitrosyl iron complexes with glutathione: EPR, optical, chromatographic and biological characterization of reaction products. *Nitric Oxide*, 35, 110–115 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2013.08.007
- Vanin A. F., Poltorakov A. P., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., and Burbaev D. S. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide*, 23, 136–149 (2010). DOI: 10.1016/j.niox.2010.05.285
- Трещалина Е. М., Жукова О. С., и Герасимова Г. К. В кн. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А. Н. Миронова (Изд-во «Грин и К», 2012), ч. 1, сс. 642–657.
- Emanuel N. M., Saprin A. N., Shabalkin V. A., Kozlova L. E., and Kruglyakova K. E. Detection and investigation of a new type of ESR signal characteristic of some tumour tissues. *Nature*, 222 (5189), 165–167 (1969). DOI: 10.1038/222165a0
- Ignarro L. J. *Nitric Oxide: Biology and Pharmacology* (Acad. Press, San Diego, USA, 2000).
- Ванин А. Ф., Блюменфельд Л. А. и Четвериков А. Г. Исследование комплексов негемового железа в клетках и тканях методом ЭПР. *Биофизика*, 12, 829–841 (1967).
- Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами. *Физико-химия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, Москва-Ижевск, 2015).
- Vanin A. F., Serezhnikov V. A., Mikoyan V. D., and Genkin M. V. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*, 2, 224–234 (1998). DOI: 10.1006/niox.1998.0180

Nitrosonium Cation as an Antitumor Component of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands

A.F. Vanin*, L.A. Ostrovskaya**, D.B. Korman**, V.A. Rykova**, N.V. Bluhterova**,
M.M. Fomina**, V.D. Mikoyan*, and N.A. Tkachev*

*N.N. Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

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

The combination of two compounds such as the binuclear form of dinitrosyl iron complexes with glutathione (B-DNIC-G, 100 $\mu\text{M/kg}$, s/c) and sodium diethyldithiocarbamate (DETK, 500 $\mu\text{M/kg}$, i/p), administered eight times, causes two week-lasting complete inhibition of solid tumor development in mice after tumor transplantation (Lewis lung carcinoma). However, when the antitumor effect was evaluated on the 20th day after the end of drug administration, the maximum activity - inhibition of tumor growth by 60% – was observed when drugs were administered in the order DETK, and then after an hour B-DNIC-G, while when drugs were used in reverse order, tumor growth inhibition was not greater than 30%. Based on the analysis of EPR measurements of tumor tissues (day 15 of tumor development), it was concluded that the inhibition of tumor growth was caused by nitrosonium cations released from B-DNIC-G during the breakdown of these complexes under the action of DETC.

Keywords: binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione, diethyldithiocarbamate, nitrosonium cations, Lewis lung carcinoma