

МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА КАК «РАБОЧЕЙ ФОРМЫ» ОКСИДА АЗОТА

© 2024 г. А.Ф. Ванин*,#

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

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

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

После доработки 02.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Выдвинут тезис, что только включение эндогенного оксида азота (NO) в живых организмах в динитрозильные комплексы железа или в S-нитрозотиолы может обеспечить его стабилизацию, необходимую для функционирования NO в качестве как ауто-, так и паракринного регулятора метаболических процессов. Без такого включения подавляющая часть эндогенного NO исчезает из-за агрессивного действия на него внутри- и внеклеточной среды организма и тем самым исключается из процессов жизнедеятельности. Введение в организм животных и человека экзогенного NO (возможное только путем ингаляции его газообразной формы) не приводит к образованию в крови и других тканях ни динитрозильных комплексов железа, ни S-нитрозотиолов. Подавляющая часть экзогенного NO в этом случае превращается в крови в катионы нитрозония (NO^+), о появлении которых свидетельствует их превращение в S-нитрозотиолы при одновременном с ингаляцией экзогенного NO введении в кровь животных различных тиолов. В свою очередь, появление S-нитрозотиолов у этих животных обнаруживается по их гипотензивному действию на животных. Превращение NO в катионы нитрозония происходит и в процессе синтеза динитрозильных комплексов железа, обусловленного в живых организмах реакцией диспропорционирования эндогенных молекул NO, попарно связывающихся с ионами двухвалентного железа. Последующее связывание возникающих в ходе этой реакции $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -групп с тиолсодержащими лигандами приводит к образованию достаточно стабильных динитрозильных комплексов железа, функционирующих в живых организмах в качестве доноров как нейтральных молекул NO, так и катионов нитрозония (NO^+). Перенос последних на мишени их биологического действия осуществляется в результате непосредственного контакта низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа соответственно с гемовой группой гем-содержащих белков (например, гуанилатциклазы) или с тиоловыми группами низкомолекулярных и белковых тиолсодержащих соединений. Приводятся различные последствия такого переноса NO и NO^+ в живых организмах соответственно как позитивного, регуляторного, так и негативного, токсического характера.

Ключевые слова: оксид азота, катион нитрозония, динитрозильные комплексы железа, S-нитрозотиолы, реакция диспропорционирования.

DOI: 10.31857/S0006302924050131, EDN: MJMKD

Сокращения: RS-NO – S-нитрозотиолы, М-ДНКЖ – моноядерные динитрозильные комплексы железа, Б-ДНКЖ – биядерные динитрозильные комплексы железа, МНКЖ – моонитрозильные моноядерные комплексы железа, МНКЖ-L – моонитрозильные моноядерные комплексы железа с L-лигандами, М-ДНКЖ-RS – моноядерные динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, МНКЖ-RS – моноядерные моонитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, СТС – сверхтонкая структура, САД – системное артериальное давление, ЛПС – липополисахарид, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат натрия, МНКЖ-ДЭТК – моонитрозильные моноядерные комплексы железа с диэтилдитиокарбаматом натрия, МГД – N-метил-D,L-глюкаминдитиокарбамат, Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, Б-ДНКЖ-MSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с меркаптосукцинатом.

Посвящается светлой памяти профессора Анатолия Боруховича Шехтера, внесшего основополагающий вклад в становление и развитие биологии и медицины оксида азота

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА И S-НИТРОЗОТИОЛЫ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

В настоящее время показано, что монооксид азота, или, как сейчас говорят, оксид азота (NO), продуцируемый в организме животных и человека ферментативным путем из L-аргинина, обнаруживается в клетках и тканях не только в свободной, но и в связанной форме — в составе S-нитрозотиолов (RS-NO), а также (причем преимущественно) в составе моно- или биядерных динитрозильных комплексов железа (M- или Б-ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами [1–4]. Включение NO в эти соединения обеспечивает защиту от губительного действия на него анионов супероксида [4, 5] и, тем самым, реализацию паракринного действия NO как одного из универсальных регуляторов разнообразных биологических процессов.

Каким образом RS-NO и указанные ДНКЖ могут возникать в организме животных и человека? Наиболее вероятным механизмом образования RS-NO является связывание аниона RS^- с одноэлектронно окисленной формой молекулы NO — катионом нитрозония (NO^+) [6–8]. В результате одна из наиболее реализуемых резонансных структур RS-NO описывается как RS^--NO^+ . Превращение молекул NO в NO^+ может происходить по двум механизмам. Первый определяется взаимодействием NO с диоксидом азота (NO_2), появляющимся в живых организмах в результате окисления части NO кислородом. Одна из резонансных структур образующегося при этом триоксида азота (N_2O_3) может быть представлена как характеризующаяся наличием в ее составе катиона нитрозония — $NO^+-NO_2^-$, что и определяет S-нитрозирующую активность триоксида азота. Другой механизм превращения NO в NO^+ опре-

деляется способностью молекул NO попарно вступать в реакцию диспропорционирования NO, открытую еще в XVIII веке одним из основоположников современной химии — Дж. Пристли [9]. В ходе этой реакции происходит взаимное одноэлектронное окисление/восстановление молекул NO, приводящее к их превращению в катион нитрозония и анион нитроксила (NO^-) с последующей их трансформацией при участии в качестве катализаторов молекул воды соответственно в диоксид и закись азота (N_2O) по следующей реакции [10–12]:



В газовой фазе реакция диспропорционирования идет лишь при больших давлениях NO — при десятках атмосфер. В воде реакция диспропорционирования молекул NO протекает при давлении в газовой фазе NO над водным раствором меньшим одной атмосферы. Столь резкое повышение эффективности этой реакции достигается включением в водные растворы NO ионов двухвалентного железа, способных попарно связывать молекулы NO [10, 13, 14]. Последнее эквивалентно сближению молекул NO в газовой фазе, при котором начинает протекать реакция диспропорционирования этих молекул. В комплексе Fe^{2+} с NO перенос электрона от одной молекулы NO к другой происходит по молекулярным орбиталиям, включающим в себя d- и π-орбитали соответственно железа и молекул NO. В результате, в соответствии со схемой 1 и реакцией (2), возникает М-ДНКЖ с анионными лигандами L^- (М-ДНКЖ- L^-), характеризующийся резонансной структурой $[(L^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$, эквивалентной структуре $[(L^-)_2Fe^+(NO^+)_2]$ с d^7 -электронной конфигурацией железа [8, 13, 15, 16], или, согласно работе [17], с $[Fe(NO)_2]^7$ -представлением комплекса:

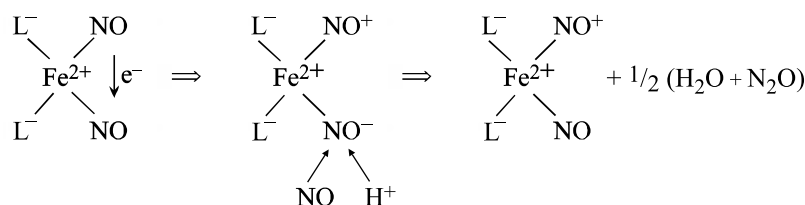


Схема 1. Образование М-ДНКЖ с анионными лигандами.

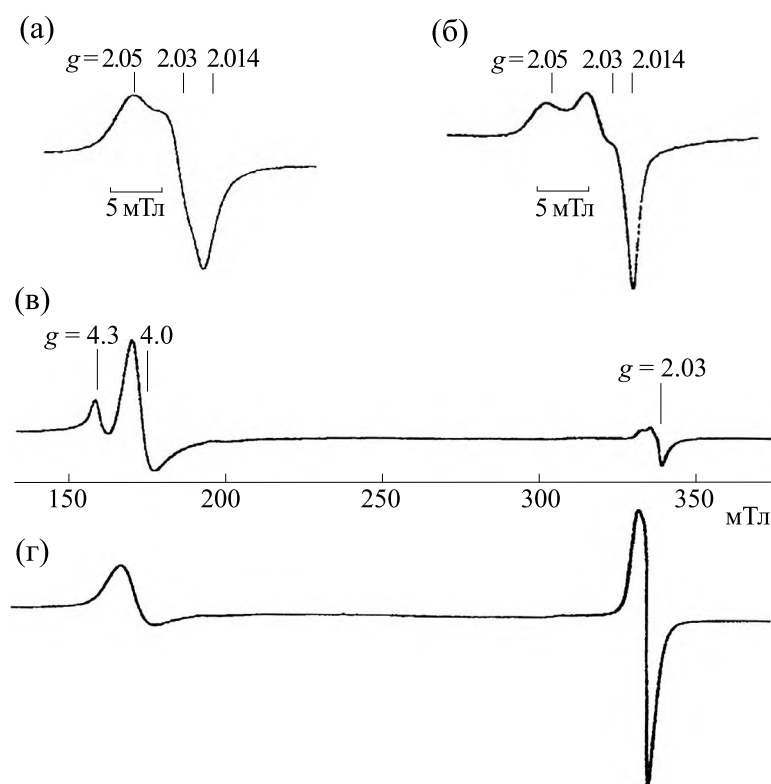
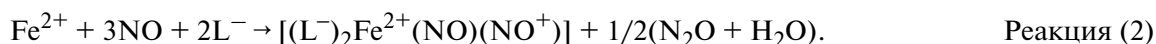
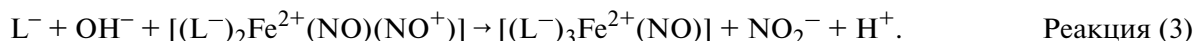


Рис. 1. Сигналы ЭПР низкоспиновых ($S = 1/2$) М-ДНКЖ с цитратом (а) и АТФ (б), зарегистрированные в узком диапазоне магнитного поля, и высокоспиновых ($S = 3/2$) МНКЖ с цитратом (в) и АТФ (г) с основной компонентой при $g = 4.0$. Компонента при $g = 2.0$ маскируется сигналами М-ДНКЖ с цитратом и АТФ. Сигнал при $g = 4.3$ обусловлен высокоспиновым комплексом примесного железа (Fe^{3+}). Сигналы зарегистрированы при 77 К [18].



В ходе этого процесса появляющийся в комплексе анион нитроксила гидролизует, т.е. протонируется с высвобождением из комплекса предшественника закиси азота (N_2O) — молекулы нитроксила (HNO) — с включением в освободившееся лигандное место третьей молекулы NO . Что касается гидролиза катиона нитрозония — его взаимодействия с анионом гидроксидов, то эта реакция происходит только в М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой приро-

ды [16]. Появляющийся вместо этого катиона (при нейтральных значениях pH) анион нитрита также выходит из комплекса, в результате М-ДНКЖ- L^- преобразуется в соответствующий моонитрозильный моноядерный комплекс железа (МНКЖ) с L^- -лигандами (МНКЖ- L^-) в концентрации, существенно превосходящей стационарный уровень М-ДНКЖ- L^- (реакция (3)):



В отличие от низкоспинового М-ДНКЖ- L^- с $S = 1/2$, характеризующегося сравнительно узким сигналом ЭПР с $g_1 = 2.05$, $g_2 = 2.03$, $g_3 = 2.014$ ($g_{\text{ср}} = 2.031$), МНКЖ- L^- находится в высокоспиновом состоянии с $S = 3/2$ и характеризуется широким сигналом ЭПР с $g_{1,2} = 4.0$ и $g_3 = 2.0$ (рис. 1) [18]. Сигнал ЭПР М-ДНКЖ- L^- регистрируется как при низкой, так и при комнатной температу-

ре, т.е. и в размороженном растворе, тогда как сигнал МНКЖ- L^- — только в замороженном растворе при низкой температуре [16, 18, 19].

Оба типа нитрозильных комплексов железа неустойчивы — М-ДНКЖ- L^- распадается самопроизвольно из-за гидролиза катионов нитрозония, МНКЖ- L^- — после откачки NO из раствора. Устойчивость М-ДНКЖ- L^- резко повышается

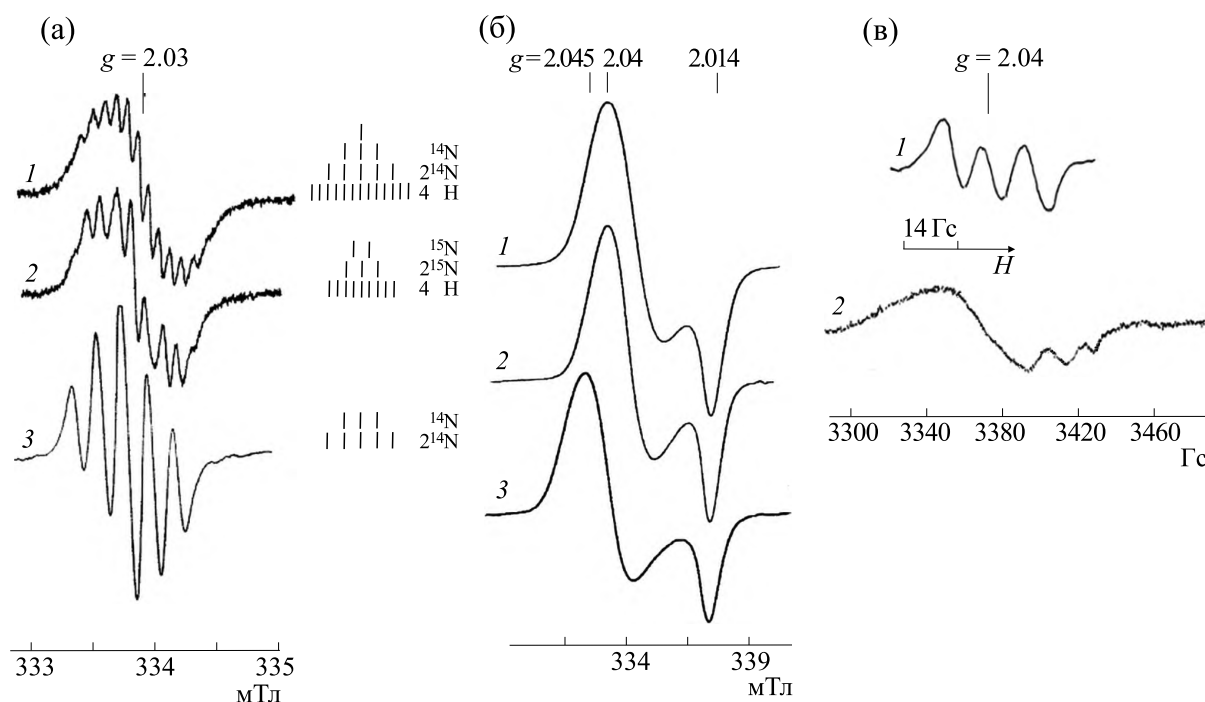


Рис. 2. (а) — Форма сигналов водных растворов ЭПР М-ДНКЖ с цистеином, содержащих ^{14}NO и ^{15}NO (спектры 1 и 2), и М-ДНКЖ с тиосульфатом (спектр 3). Справа приведена расшифровка СТС. (б) — Форма сигналов ЭПР замороженных растворов М-ДНКЖ с цистеином, содержащих ^{14}NO и ^{15}NO (спектры 1 и 2), и М-ДНКЖ с тиосульфатом (спектр 3). Запись при 77 К. (в) — Форма сигналов ЭПР МНКЖ с цистеином. Запись при комнатной температуре (спектр 1) и 77 К (спектр 2) [18, 24].

при замене в них лигандов нетиоловой природы на тиолсодержащие (RS^-) соединения. Тиоловые группы этих соединений характеризуются высокой π -донорной электронной активностью, т.е. способностью передавать электронную плотность на соответствующие электрофилы, в качестве которых в нитрозильных комплексах железа выступают катионы нитрозония. Перенос на них электронной плотности с атомов тиоловой серы приводит к нейтрализации положительного заряда на NO^+ и тем самым к подавлению гидролиза этих катионов и стабилизации М-ДНКЖ [20]. Именно этот механизм стабилизации М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, возникающих, как и М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы, в соответствии со схемой 1, определяет их появление и накопление в живых организмах. Именно это и позволило еще в 60-е годы прошлого века открыть и идентифицировать методом ЭПР М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами сначала в дрожжевых клетках, а затем и в тканях животных [21–23].

Как и М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы, М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (М-ДНКЖ- RS^-) находятся в низкоспиновом состоянии с $S = 1/2$ и характеризуются сигналом ЭПР с двумя главными значениями g -фактора —

$g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$, называемым, в соответствии со средним значением g -фактора, сигналом 2.03 (рис. 2б) [18]. Что касается МНКЖ с тиолсодержащими лигандами (МНКЖ- RS^-), они также могут возникать, но не в результате высвобождения из М-ДНКЖ катионов нитрозония, как это происходит с М-ДНКЖ- L^- , а на первых стадиях образования М-ДНКЖ при связывании с Fe^{2+} первой молекулы NO [24–26]. Образующиеся при этом МНКЖ- RS^- , в отличие от МНКЖ- L^- , дают сигнал ЭПР, регистрируемый при комнатной температуре в виде изотропной триплетной сверхтонкой структуры (СТС) от ядра азота ^{14}NO (спин ядра $I = 1$) с центром при $g = 2.04$ [24–26], превращающийся при низкой температуре регистрации в более широкий синглет с центром при том же значении g -фактора (рис. 2в) [24].

При последующей обработке этого раствора газообразным NO , приводящей в соответствии со схемой 1 к образованию М-ДНКЖ- RS^- , вместо триплетного сигнала ЭПР при комнатной температуре регистрируется синглетный сигнал ЭПР при $g = 2.03$ с дополнительной 5- или 13-компонентной СТС, характерной, например, соответственно для М-ДНКЖ с тиосульфатом или с цистеином. Пятикомпонентная СТС возникает в

результате взаимодействия неспаренного электрона с ядрами ^{14}N двух нитрозильных лигандов, тогда как 13-компонентная СТС определяется дополнительным СТ-взаимодействием неспаренного электрона еще с 4 протонами метиленовых групп двух молекул цистеина в лигандном составе М-ДНКЖ (рис. 2). При замене ^{14}NO (спин ядра азота $I = 1$) на ^{15}NO ($I = 1/2$) 13-компонентная СТС становилась 9-компонентной (рис. 2) [18].

Таким образом, если для М-ДНКЖ с лигандами как тиоловой (RS^-), так и нетиоловой (L^-) природы характерно низкоспиновое состояние с $S = 1/2$, для моонитрозильных аналогов этих комплексов низкоспиновое состояние с $S = 1/2$ характерно только для МНКЖ с тиолсодержащими лигандами (МНКЖ- RS^-), тогда как МНКЖ с разнообразными (L^-) лигандами нетиоловой природы, как указывалось выше, находятся в высокоспиновом состоянии с $S = 3/2$. Очевидно, это различие обусловлено более сильным в МНКЖ- RS^- взаимодействием серных (тиоловых) лигандов с центральным атомом, приводящим к полному снятию вырождения верхних d - и π -орбиталей соответственно железа и нитрозильного лиганда и к парамагнитной $d^7(\text{Fe}^+)$ -конфигурации железа в этих комплексах, или, в соответствии с работой [17], к $[(\text{Fe}(\text{NO})_2)]^7$ -представлению ДНКЖ. Слабые, нетиолсодержащие лиганды в МНКЖ- L^- не способны реализовать аналогичную ситуацию, в результате эти комплексы характеризуются высокоспиновым состоянием с локализацией 3 электронов железа на вырожденных молекулярных орбиталях комплекса с основным вкладом в них t_{2g} -орбиталей (d_{xy} , d_{xz} и d_{yz}) железа. Такая конфигурация может реализоваться для тетраэдрической пространственной структуры МНКЖ- L^- [18]. Что касается МНКЖ- RS^- , низкоспиновая электронная конфигурация для них может реализоваться для квадратно-пирамидальной пространственной структуры комплексов, т.е. при расположении четырех RS^- в плоскости, а NO -лиганда — по вертикальной оси (оси z) [18].

Таким образом, изложенный выше материал показывает, что в рамках предполагаемого нами механизма образования М-ДНКЖ с лигандами как тиоловой (RS^-), так и нетиоловой (L^-) природы, обусловленного диспропорционированием молекул NO , для этих комплексов, как и для их биядерной формы, в соответствии со схемой 1 должна реализоваться резонансная структура, в которой нитрозильные лиганды в железо-динитрозильном фрагменте представлены поровну нейтральной молекулой NO и катионом нитрозония. Другими словами, ДНКЖ с различными анионными лигандами, в том числе тиолсодержа-

щими лигандами, способны выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO , так и катионов нитрозония. Что касается моонитрозильных аналогов этих комплексов, они могут выступать в качестве доноров только нейтральных молекул NO .

Вывод о способности М-ДНКЖ, образующихся в соответствии со схемой 1 в результате диспропорционирования молекул NO , выступать в качестве источников катионов нитрозония резко контрастирует с отсутствием такой способности у ДНКЖ с парамагнитной $d^9(\text{Fe}^-)$ -электронной конфигурацией железа в этих комплексах, или, в соответствии с работой [17], $[(\text{Fe}(\text{NO})_2)]^9$ -представлением М-ДНКЖ. Согласно работе [27], такая конфигурация и соответственно характерная для их железо-динитрозильных фрагментов резонансная структура $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO})]$ реализуются для этих комплексов в результате одноэлектронного восстановления исходного $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO})_2]$ -комплекса. Очевидно, что такие одноэлектронно восстановленные ДНКЖ могут высвобождать только нейтральные молекулы NO и анионы нитроксила (NO^-), но не NO^+ . Таким образом, проверка способности ДНКЖ высвобождать катионы нитрозония является ключевым моментом в выборе реального механизма образования парамагнитных ЭПР-активных ДНКЖ, обусловленного либо диспропорционированием молекул NO и реализацией d^7 -электронной конфигурации железа или восстановлением одной из NO молекул в железо-динитрозильном фрагменте до NO^- и реализацией d^9 -электронной конфигурации железа в этом фрагменте.

Проведенные нами эксперименты показали, что ДНКЖ как с тиолсодержащими лигандами, так и ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы способны высвобождать катионы нитрозония, причем в ряде случаев в том же количестве, что и нейтральных молекул NO [10, 13, 15, 16, 28, 29]. При этом последние обеспечивают позитивное, регуляторное действие ДНКЖ на живые организмы, тогда как катионы нитрозония оказывают на эти организмы негативное, токсическое действие [30, 31]. Соответственно, регуляторная активность молекул NO обеспечивается их воздействием на их биологическую мишень — гуанилатциклазу, тогда как токсическая активность катионов нитрозония определяется их способностью S-нитрозировать критически важные для метаболизма тиолсодержащие белки, подавляя тем самым их биологическую активность.

Как указывалось выше, М- и Б-ДНКЖ представлены в живых организмах в подавляющей своей части М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, как низкомолекулярными, так и входящими в состав белков — белок-связанные М- и

Б-ДНКЖ. Последние выступают в качестве депо, стабилизирующего эти комплексы, тогда как низкомолекулярные ДНКЖ осуществляют перенос входящих в них нейтральных молекул NO и катионов нитрозония на их биологические мишени [32].

Как уже было указано, включение тиолсодержащих лигандов в ДНКЖ обеспечивает стабилизацию этих комплексов в результате переноса электронной плотности с атомов тиоловой серы на катионы нитрозония, что приводит к нейтрализации положительного заряда на этих катионах и тем самым к подавлению их гидролиза и сохра-

нению в составе ДНКЖ, т.е. к стабильности этих комплексов. Существует и второй механизм стабилизации ДНКЖ, обусловленный наличием в их составе тиолсодержащих лигандов. Высвобождающиеся из этих комплексов при их распаде катионы нитрозония могут связываться с этими лигандами с образованием молекул RS-NO, которые, как мы показали в работах [33, 34], сами по себе реагируя с двухвалентным железом и другими тиолами, способны, в соответствии со схемой 2, продуцировать сначала М- и далее Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами:

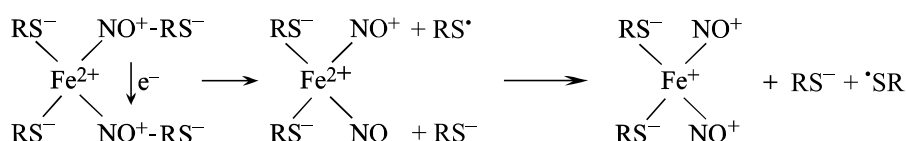


Схема 2. Последовательное образование М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами.

Предполагается, что, попарно связавшись с Fe^{2+} , молекулы RS-NO, как и молекулы NO на схеме 1, вступают в реакцию диспропорционирования с их превращением в неустойчивые аддукты, описываемые резонансными структурами $\text{NO}^+ \text{--RS}^-$ и NO--RS^- . Распад этих аддуктов приводит к образованию М-ДНКЖ с той же резонансной структурой, характерной для М-ДНКЖ, образующихся в реакции газообразного NO с ионами Fe^{2+} и тиолсодержащими соединениями, а именно – $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}^+)]$.

В отличие от молекул NO, высвобождающихся из распадающихся ДНКЖ с последующим улетучиванием из раствора, молекулы RS-NO, образующиеся при связывании катионов нитрозония с тиолами, сохраняются в растворе и могут, в соответствии со схемой 2, генерировать М-, а затем и Б-ДНКЖ, тем самым затормаживая исчезновение этих комплексов в растворе.

Проведенная в работе [35] оценка стационарной концентрации ДНКЖ, RS-NO и различных нитросоединений, образующихся в клеточных культурах при активации в них синтеза эндогенного оксида азота, показала, что содержание ДНКЖ доминирует над остальными производными NO, т. е. есть основание предполагать, что ДНКЖ выступают в качестве наиболее представительной формы эндогенных соединений как стабилизаторов оксида азота.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКЗОГЕННЫХ RS-NO И ДНКЖ, ИМИТИРУЮЩАЯ АНАЛОГИЧНУЮ АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ ЭНДОГЕННОГО NO

Как уже было сказано, включение NO в ДНКЖ или RS-NO обеспечивает защиту этой свободно радикальной молекулы от губительного действия на нее анионов супероксида (а также других агентов), что может существенно повышать время жизни NO в живых организмах. Встает вопрос, не приводит ли такой способ стабилизации NO к тому, что, включившись в указанные NO-содержащие соединения, этот агент «выходит из игры», т.е. образующиеся в живых организмах ДНКЖ и RS-NO оказываются столь стабильными, что оксид азота не высвобождается из них и не оказывает соответствующего действия на живые организмы.

Эксперименты, проведенные на изолированных сосудах *in vitro* и на животных *in vivo* показали, что по крайней мере по своей способности вызывать соответственно вазодилатацию или гипотензию ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и RS-NO характеризуются соответствующей активностью, превосходящей способность свободных молекул NO инициировать вазодилатацию в опытах на изолированных сосудах или гипотензию у животных. В качестве примера можно привести результаты опытов, демонстрирующие способность газообразного NO и ДНКЖ с цистеином инициировать в зависимости от их концентрации в среде инкубации степень расслабления изолированных кольцевых фрагментов аорты крыс (рис. 3) [36].

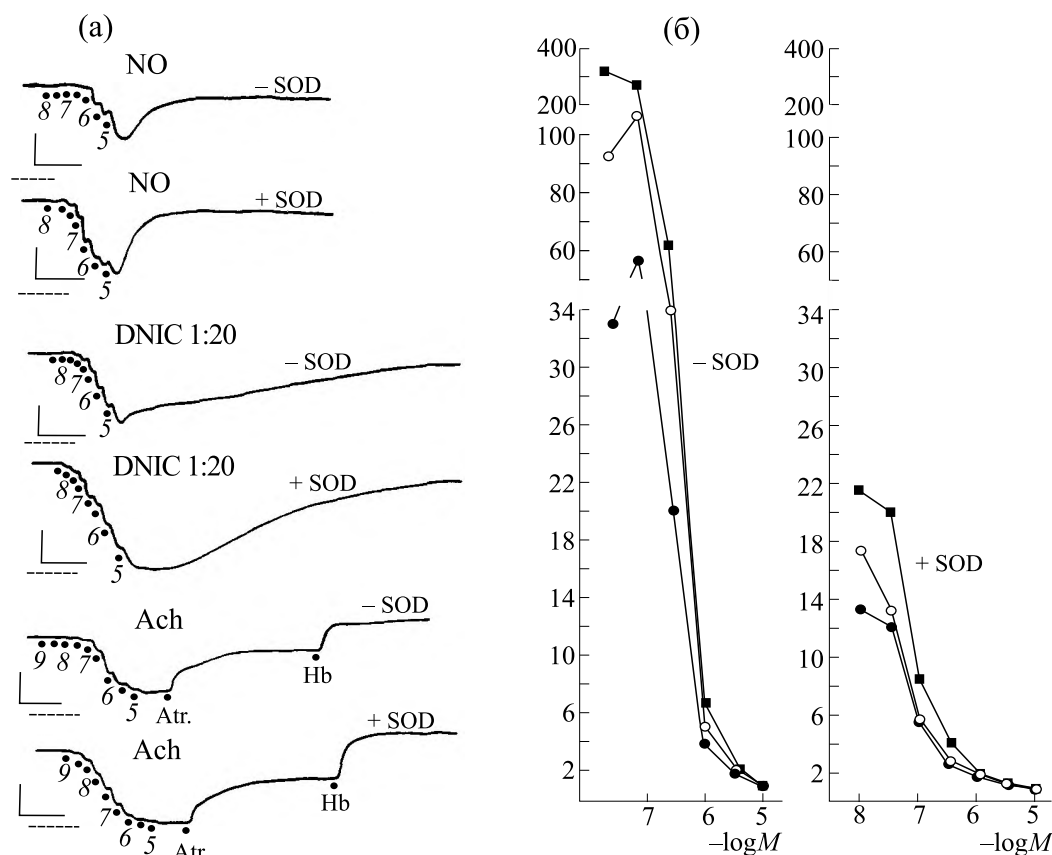


Рис. 3. (а) – Вазодилаторное действие NO, ДНКЖ с цистеином (DNIC 1 : 20) и ацетилхолина (ACh) на кольцевые фрагменты аорты крыс, предварительно сокращенные под влиянием норэпинефрина (10^{-7} М) в отсутствие и в присутствии супероксиддисмутазы (SOD, 30 ед/мл). Точками показано время введения указанных агентов (ДНКЖ, $\log M$), атропина (10^{-5} М) и гемоглобина (Hb, 10^{-5} М). Масштаб по вертикали слева – 1 г, по горизонтали – 3 мин. (б) – Отношение степени релаксации сосудов (в отн. ед.), вызванных ACh (•), DNIC 1 : 2 (○) и DNIC 1 : 20 (■) к релаксации, вызванной NO в отсутствие (слева) и в присутствии (справа) супероксиддисмутазы (SOD). DNIC 1 : 2 и DNIC 1 : 20 синтезированы соответственно при соотношении концентраций Fe^{2+} : цистеин, равном 1 : 2 или 1 : 20 [36].

Как следует из рис. 3, в отсутствие супероксиддисмутазы при малых концентрациях ДНКЖ с цистеином (при соотношении ДНКЖ : цистеин в растворе, равном 1 : 20) эффективность вазодилаторного действия ДНКЖ была на два порядка выше, чем для NO в тех же малых концентрациях. В присутствии супероксиддисмутазы, устранявшей анионы супероксида, это различие ослаблялось, но все равно различалось на порядок. Характерно, что вазодилаторное действие ДНКЖ в дозовом отношении совпадало с действием на сосуды ацетилхолина, инициировавшего генерацию эндогенного NO. Не исключено, что это совпадение могло быть обусловлено включением этого агента в эндогенные ДНКЖ!?

Более резкое различие обнаруживалось для гипотензивного действия газообразного (несвязанного) NO, вводившегося животным (крысам) путем ингаляции, и аналогичного эффекта, вызывавшегося у животных внутривенным введением

им растворов RS-NO или ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [37, 38]. Судя по образованию ЭПР-детектируемых нитрозильных комплексов гемоглобина у животных и человека, оксид азота у дыхательному пути через легкие достигал крови в большом круге кровообращения, однако заметный гипотензивный эффект при этом не обнаруживался (рис. 4) [37].

Системное артериальное давление (САД) начинало снижаться, если одновременно с ингаляцией NO животному внутривенно вводили раствор глутатиона или другого тиола. Если же после введения тиола прекращали ингаляцию, САД сразу же начинало восстанавливаться до исходного уровня (рис. 4) [37]. Этот результат можно было объяснить единственным образом, а именно тем, что NO, попадавший в кровь, превращался в катион нитрозония, в свою очередь быстро превращавшийся в результате гидролиза в анион нитрита, неспособный эффективно инициировать рас-

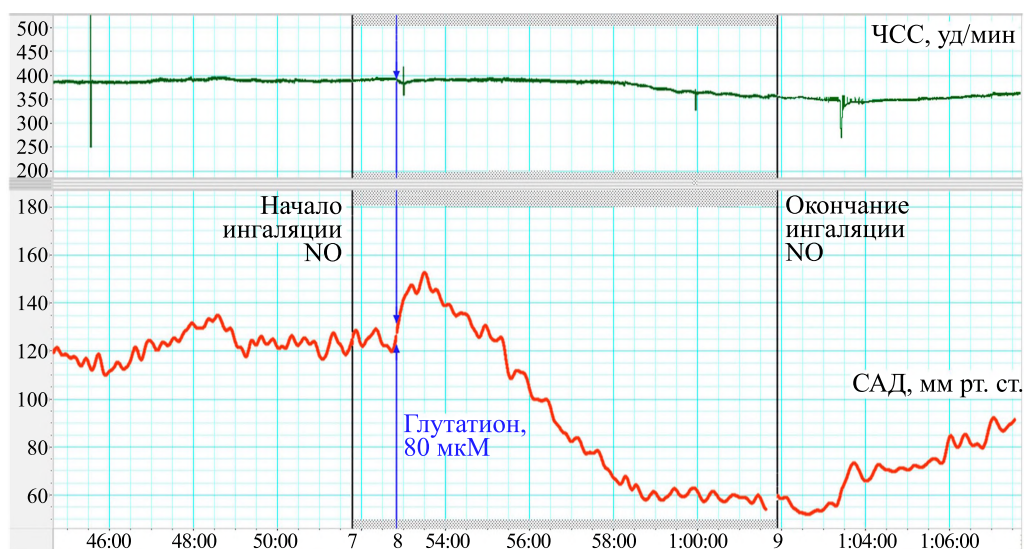


Рис. 4. Сохранение системного артериального давления (САД) в мм рт. ст. у крысы при ингаляции газового потока NO с концентрацией 1000 ppm с последующим снижением САД при одновременном с ингаляцией внутривенным введением крысе 6.4 мкмоль глутатиона на кг массы животного, соответствующем 80 мкМ глутатиона на 1 литр крови. По оси абсцисс — время эксперимента в минутах. Верхний график — число сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), нижний график — САД, мм. рт. ст. [37].

слабление сосудов и тем самым понижать САД. Последнее имело место при введении в кровь тиолов, превращавших катионы нитрозония в S-нитрозотиолы, способные, как и ДНКЖ, вызывать гипотензию [38].

Что касается экзогенных, т.е. синтезированных химическим путем RS-NO и ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, их введение в кровь уже при концентрации в несколько микромолей на кг веса крыс [38] вызывало значительное снижение САД, что не имело места при ингаляции газообразного NO, приводившей к включению в кровь NO в миллимолярной концентрации [39]. При введении животным ДНКЖ с лигандами не-тиоловой природы в организме животных эти лиганды замещались эндогенным тиолами, так что эти ДНКЖ превращались в их аналоги с тиолсодержащими лигандами.

Предполагается, что при поступлении в кровь при ингаляции животным газового потока с высокой концентрацией NO (1000 ppm), наряду с поглощением NO гемоглобином часть его начала окисляться кислородом в диоксид азота (NO_2). В качестве спинового катализатора этого окисления — реакции, запрещенной по спине, — могли выступать имеющиеся в крови комплексы переходных металлов — негемового железа и меди. При высокой концентрации поступавшего в кровь NO и квадратичной зависимости скорости его окисления от концентрации образование NO_2 становилось высокоэффективным, так что оно и

могло обеспечивать превращение значительной части NO в реакции с NO_2 в катионы нитрозония.

Таким образом сопоставление вазодилаторной и гипотензивной активности экзогенного газообразного NO, с одной стороны, и экзогенных RS-NO и ДНКЖ, с другой стороны, показало существенно более высокую в дозовом отношении способность последних вызвать вазодилатацию и, как следствие этого, гипотензию у животных. Столь существенное различие позволяет предположить, что биологическая активность RS-NO и ДНКЖ вряд ли определяется их способностью высвобождать молекулы NO с последующим связыванием этих молекул с главной их биологической мишенью — гуанилатциклазой. Скорее всего, активация этого фермента осуществляется в результате непосредственного контакта его гемовой группы с RS-NO и ДНКЖ в их низкомолекулярной форме с последующим переносом молекулы NO из этих соединений на гемовую группу гуанилатциклазы. Другими словами, оксид азота оказывает соответствующее биологическое действие на живые организмы только в связанной форме — в форме ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами или RS-NO. По-видимому, внутри- и межклеточная среда в живых организмах достаточно агрессивна в отношении NO, что приводит к гибели молекул NO, «не успевших» включиться в соединения, «преодолевающие» эту агрессивность. В связи с этим как ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, так и RS-NO, возникающие в организме животных и человека, можно рассматривать в качестве «рабочей формы» оксида азота.

Провести аналогичное сопоставление биологической активности эндогенного NO и указанных его соединений (RS-NO и ДНКЖ) остается практически невозможным. Тем не менее, есть экспериментальное основание полагать, что NO, продуцируемый в свободной форме в организме животных и человека ферментативным путем в реакции окисления аминокислоты в гуанидиновом остатке L-аргинина, в подавляющей своей части *in vivo* включается в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Это включение, как уже указано выше, обеспечивает стабилизацию NO и тем самым его перенос на значительные расстояния в тканях животных и человека с его доставкой к соответствующим мишеням биологического дей-

ствия. Аналогичным образом стабилизируется и доставляется к биологическим мишеням другой нитрозильный компонент ДНКЖ – катион нитрозония.

Для обнаружения эндогенных ДНКЖ мы использовали способность производных дитиокарбаматов ($R_2=N-CS_2$)[–] перехватывать на себя железо-мононитрозильную группу из железо-динитрозильных фрагментов М- и Б-ДНКЖ с образованием, как это показано на схеме 3, ЭПР-детектируемых мононитрозильных комплексов железа с производными дитиокарбамата и высвобождением из ДНКЖ катионов нитрозония, образующих разнообразные RS-NO [40].

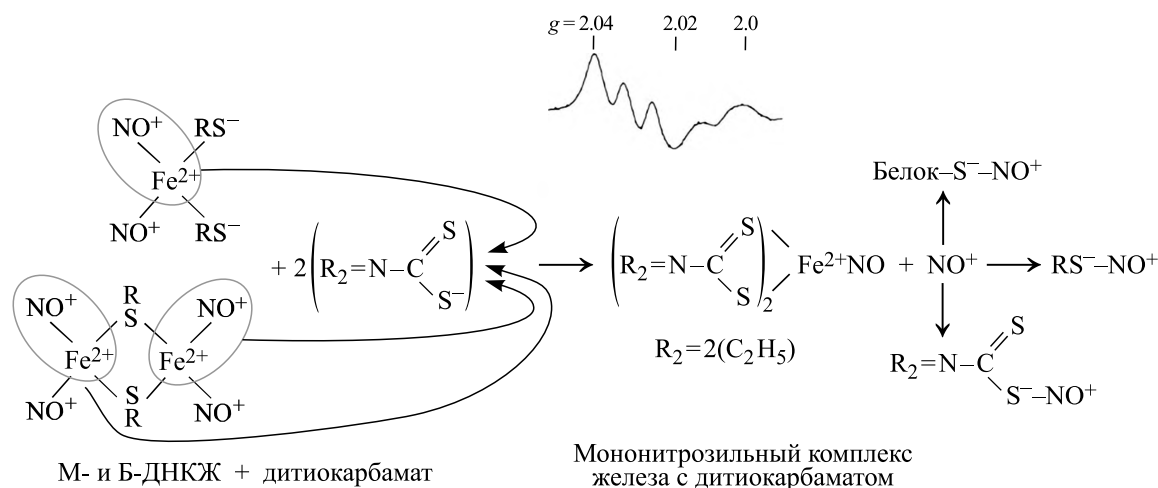


Схема 3. Превращение М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ-ДЭТК, сопровождаемое высвобождением в среду катиона нитрозония. В центре приведен триплетный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК, зарегистрированный при 77 К.

Для образования повышенного количества NO в организме мышей (главным образом в иммунокомпетентных клетках, например в печени) животным на 4 ч вводили бактериальный липополисахарид (ЛПС), индуцирующий синтез индуцибельной NO синтазы (iNOS), а затем этим животным на 30 мин вводили внутримышечно раствор комплекса Fe^{2+} -цитрата и внутрибрюшинно — диэтилдитиокарбамат натрия (ДЭТК). Возникающие в результате в организме мышей комплексы Fe^{2+} -ДЭТК улавливали весь эндогенный оксид азота, продуцируемый iNOS, что оценивалось по интенсивности триплетного сигнала ЭПР МНКЖ-ДЭТК (рис. 5, спектр 1). Другой группе мышей после ЛПС на 30 мин вводили комплекс Fe^{2+} -цитрата с последующим забоем животных и обработкой изолированной печени раствором ДЭТК (рис. 5, спектр 2). Третья группа мышей обрабатывалась как предыдущая, но вме-

сто $^{56}Fe^{2+}$ вводили $^{57}Fe^{2+}$. Четвертой группе мышей комплекс Fe^{2+} -цитрат не вводили [41].

Предполагалось, что во второй группе мышей эндогенный NO должен *in vivo* включиться в ДНКЖ с последующим *in vitro* превращением в МНКЖ-ДЭТК, что позволит, сопоставляя интенсивности сигналов 1 и 2, приведенных на рис. 5, оценить долю NO, включившегося *in vivo* в ДНКЖ.

Учитывая, что для образования одного железо-динитрозильного фрагмента, согласно приведенной выше реакции (1), требуется 3 молекулы NO, а для образования одного МНКЖ-ДЭТК — одна молекула NO, сопоставление интенсивностей спектров 1 и 2 на рис. 5 показало, что в ДНКЖ может включаться не менее 75% от общего количества эндогенного NO. Изменение формы спектра 3, обусловленного МНКЖ-ДЭТК, в результате появления СТС от ядра ^{57}Fe свиде-

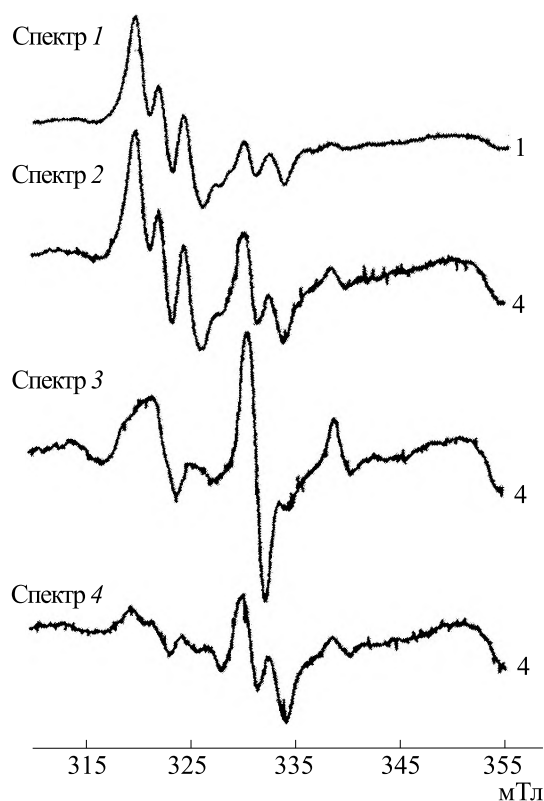
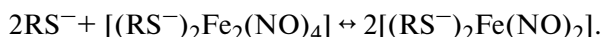


Рис. 5. ЭПР-спектры, зарегистрированные в печени мышей через 4 ч после их обработки бактериальным ЛПС с последующим введением им на 30 мин ДЭТК + Fe^{2+} -цитрата (спектр 1); через 4 ч после обработки мышей ЛПС им ввели на 30 мин Fe^{2+} -цитрат, а затем изолированную печень выдержали в растворе ДЭТК (спектр 2); то же самое, как при (2), но вместо $^{56}\text{Fe}^{2+}$ ввели $^{57}\text{Fe}^{2+}$ (спектр 3); то же самое, как при (2), но без введения Fe^{2+} -цитрата (спектр 4). Спектры зарегистрированы при 77 К. Справа указано усиление радиоспектрметра (в отн. ед.) [41].

тельствует о том, что вводившееся железо участвовало в образовании ДНКЖ при участии эндогенного NO с последующим его превращением в МНКЖ-ДЭТК. Слабая интенсивность спектра 4 на рис. 5 для МНКЖ-ДЭТК, полученных без введения животным железа, подтверждает это заключение.

Поскольку в печени, как и других органах мышей, обработанных ЛПС, не обнаруживался сиг-

нал 2.03, характерный для М-ДНКЖ, есть основание полагать, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в организме этих животных были представлены преимущественно ЭПР-недектируемые Б-ДНКЖ. В соответствии с равновесным соотношением между М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при понижении уровня тиолов в окружающей среде М-ДНКЖ переходят в Б-ДНКЖ (реакция (4)) [32]:



Реакция (4)

Поэтому преобладание последних в организме мышей, обработанных ЛПС, могло быть обусловлено снижением содержания в клеточной среде тиолов, возможно, в результате повышения окислительного потенциала в этой среде.

Итак, если эндогенно продуцируемые ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами действительно представляют собой эндогенную «рабочую форму» NO, обработка животных экзогенными ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами может дать представление о различных проявлениях ре-

гуляторной активности эндогенного NO как на уровне организма, так и на клеточных культурах и на ферментных системах. Перечень таких проявлений, обнаруженных различными исследователями, приводится в табл. 1.

Получить такое перечисление биологической активности эндогенного NO при изменении эффективности его синтеза в живых организмах или в клеточных культурах, по-видимому, не представляется возможным!

Таблица 1. Примеры регуляторного действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на живые организмы

№	Вид регуляторного действия	Источник
1	Мощное вазодилататорное и гипотензивное действие	[32, 42, 43]
2	Эффективное рано-заживляющее действие	[44]
3	Блокирование агрегации тромбоцитов (тромбоза)	[45]
4	Повышение эластичности эритроцитов	[46]
5	Повышение выживаемости животных при значительных кровопотерях	[47]
6	Мощная пенил-эректильная активность	[48]
7	Анти-апоптозное действие на клеточные культуры	[49]
8	Активация/подавление активности ряда генов	[50–53]
9	Защита миелиновой оболочки нейронов при воспалительных процессах в мозгу	[54]
10	Активация синтеза стрессорных белков	[55]
11	Антиоксидантное действие	[5]
12	Разрушительное действие на электрон-транспортные железосерные белки	[56]
13	Регуляция входа и выхода железа из клеток	[57]
14	Инициирование остео- и ангиогенеза	[58]
15	Уменьшение некротической зоны при экспериментальном инфаркте миокарда	[59]
16	Подавление токсического действия амилоидов на нейроны	[60]
17	Блокирование фиброзного перерождения тканей почек	[61]
18	Ингибирование глутатион-S-трансферазы	[62]
19	Усиление когнитивной способности животных	[63]
20	Стимуляция усвоения железа при заболевании пшеницы ржой	[64]

Как указывалось выше, ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами способны оказывать на биосистемы не только позитивное, регуляторное действие, но и в качестве доноров катионов нитрозония проявлять в отношении этих систем негативную, токсическую активность. Впервые эта активность была продемонстрирована английскими исследователями в их экспериментах на культуре фибробластов [65]. В качестве донора NO^+ они использовали нитропруссид натрия — $\text{Na}_2[(\text{CN})_5\text{Fe}^{2+}\text{NO}^+]$. Оказалось, что в дозовом отношении катионы нитрозония, высвобождающиеся из нитропрусида натрия, в 40 раз более цитотоксичны, чем молекулы NO , вводившиеся в культуральную среду либо в форме газообразного NO , либо в составе его доноров — GS-NO или $\text{S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина}$. При концентрации нитропрусида натрия 20 мкМ катионы NO^+ вызывали апоптоз у 50% фибробластов уже через 2 часа после добавления нитропрусида натрия, тогда как аналогичное действие на клетки молекулы NO при концентрации 800 мкМ оказы-

вали лишь через 24 ч после добавления в культуру газообразного NO или GS-NO и $\text{S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина}$ как доноров NO .

Вместе с тем следует отметить, что в этих экспериментах остался без ответа следующий вопрос: не было ли цитотоксическое действие нитропрусида натрия обусловлено высвобождением из него анионов цианида? Более убедительные данные о цитотоксическом действии NO^+ были получены в работе [66] в экспериментах по одновременной обработке опухолевых клеток Jurkat человека М-ДНКЖ с тиосульфатом и производным дитиокарбамата — $\text{N-метил-D,L-глюкамин-дитиокарбаматом}$ (МГД). Оказалось, что при действии этой смеси эффективность цитотоксикоза существенно превышала суммарное действие М-ДНКЖ с тиосульфатом и МГД, рассчитанное при условии, что эти агенты не вступают в реакцию друг с другом. Между тем такая реакция, как показано на схеме 3, должна была иметь место и должна была приводить, с одной стороны, к образованию устойчивых МНКЖ-МГД, «выводящих

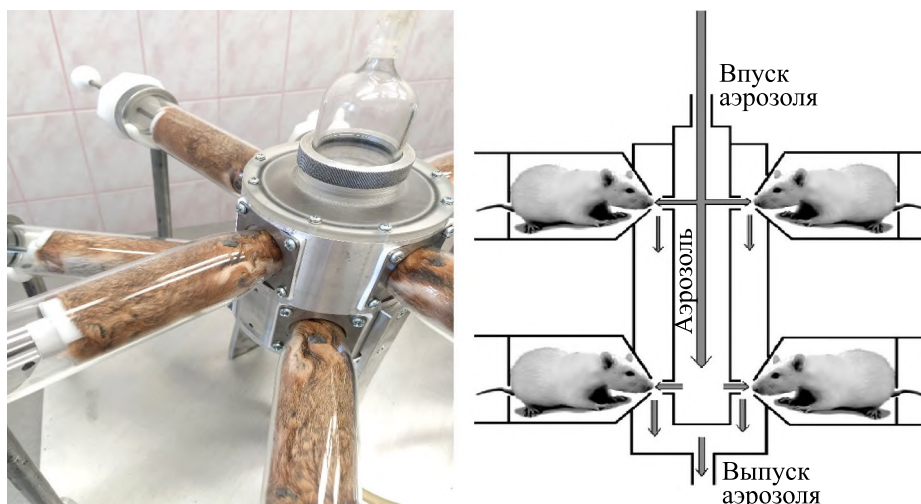


Рис. 6. (а) – Используемая в экспериментах «nose-only» камера для обработки сирийских хомячков распыленными растворами ДНКЖ и ДЭТК, (б) – общая схема этой камеры [69].

из игры» молекулы NO, исходно входившие в состав М-ДНКЖ с тиосульфатом, а с другой стороны – к высвобождению из этих комплексов катионов нитрозония, которые, очевидно, и оказывали, как полагают авторы, эффективное цитотоксическое действие на клетки Jurkat.

При этом следует отметить, что переход NO^+ из связанного в свободное состояние мог приводить перед их связыванием с тиолами к быстрому гидролизу этих катионов с их превращением во внутриклеточной среде в анионы нитрита. Этот процесс мог задерживаться связыванием NO^+ с анионами хлорида с образованием нитрозохлорида с последующим переходом NO^+ из этого соединения на тиолы, характеризующиеся существенно большим сродством с катионами нитрозония по сравнению с анионами гидроксидов или хлорида.

Подход с использованием производного дитиокарбамата для усиления цитотоксического действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами как донорами NO^+ был использован нами при изучении совместного влияния этих агентов на культуру опухолевых клеток MCF-7 человека [5] и бактерий *Escherichia coli* [67]. Обнаруженное в этих работах необычайно резкое, синэргическое усиление цитотоксического действия ДНКЖ на эти биосистемы под влиянием производных дитиокарбамата (МГД и ДЭТК) свидетельствует о том, что именно катионы нитрозония – продукт одноэлектронного окисления оксида азота – могут определять цитотоксическое действие, обнаруживаемое в живых организмах, продуцирующих NO.

В этой связи естественным шагом была наша попытка проверить, не способны ли ДНКЖ с

тиолсодержащими лигандами подавить в присутствии производных дитиокарбамата размножение коронавируса SARS-CoV-2 *in vivo* – в организме животных? Проверить такую возможность в экспериментах на сирийских хомячках, инфицированных этим вирусом, согласились сотрудники Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора РФ (Кольцово, Новосибирская обл.).

Были проведены две серии экспериментов с последовательной аэрозольной обработкой (ингаляцией) сирийских хомячков растворами сначала Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH), а затем через 30 мин – ДЭТК в «nose-only» камере или «whole-body» камере [68, 69]. В первом случае распыленный раствор указанных соединений поступал животным только в нос (рис. 6), тогда как во второй камере все тело животного находилось в контакте с этим раствором. В обоих случаях такая ежедневная обработка в течение 4-х суток приводила к существенному ослаблению коронавирусной инфекции. Аналогичный результат был получен и в опытах с использованием только распыленного раствора Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-MSH), существенно менее стабильных, чем Б-ДНКЖ-GSH, без последующей ингаляции животным в «nose-only» камере ДЭТК [69]. Предполагалось, что из-за невысокой стабильности эти комплексы сами по себе (без ДЭТК) будут распадаться в организме хомячков с выделением катионов нитрозония. Степень коронавирусной инфекции оценивали по вирусной (РНК) нагрузке тканей носовой полости и легких, а также по титру вируса в этих тканях.

Результаты экспериментов на хомячках с использованием «nose-only» камеры представлены на рис. 7 и 8. Согласно этим результатам, показатели вирусной инфекции в носовой ткани и в легких

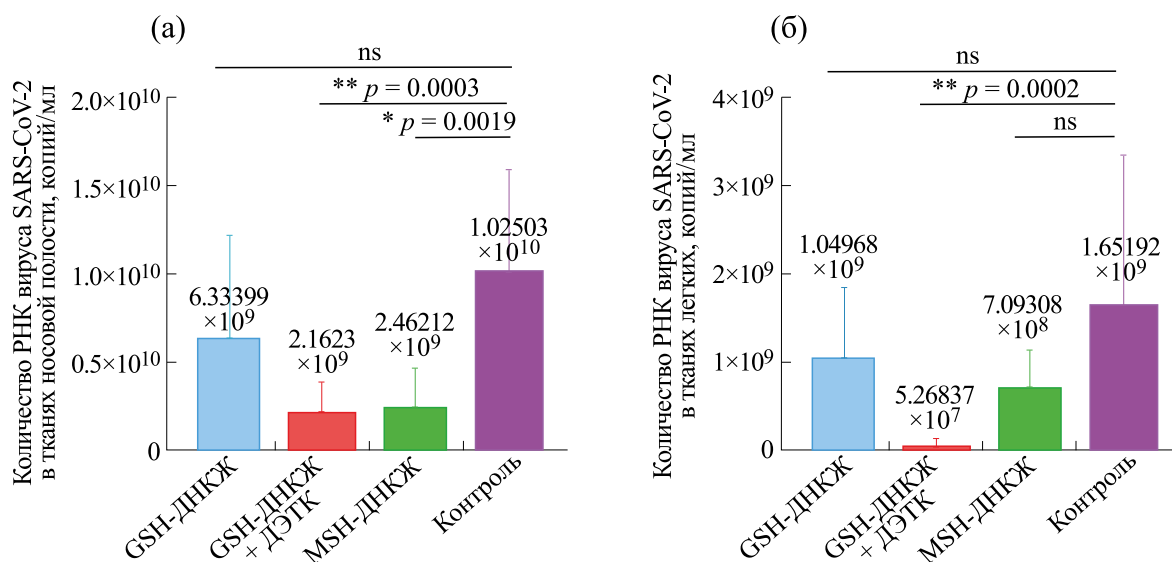


Рис. 7. Вирусная нагрузка в тканях полости носа и легких сирийских хомячков после интраназального заражения SARS-CoV-2. Гистограммы медианных значений пороговых циклов (Ct) в гомогенатах тканей носовой полости (а) и легких (б), в которых вершиной гистограммы представлены медианы, вертикальной линией – 95%-й доверительный интервал. * – Статистически значимое различие при $p < 0.05$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ** – статистически значимо при $p < 0.01$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ns (not significant) – незначимые различия [69].

снижались при обработке животных растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК, тогда как без ДЭТК противовирусный эффект Б-ДНКЖ-GSH был статистически недостоверным.

В отличие от Б-ДНКЖ-GSH, менее стабильный Б-ДНКЖ-MSH сам по себе оказывал проти-

вовирусный эффект только в носовой полости, сопоставимый с действием Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК. В ткани легких этот эффект был менее выраженным. По-видимому, до этой ткани из-за распада Б-ДНКЖ-MSH доходил в меньшем количестве, чем при непосредственном его поступлении в носовую полость.

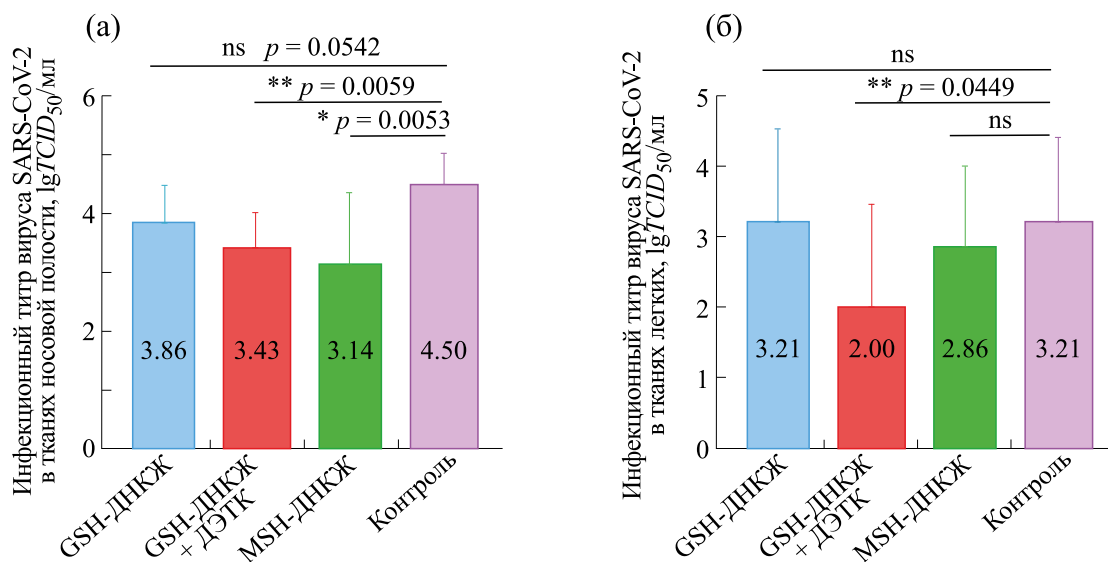


Рис. 8. Инфекционный титр в тканях полости носа и легких сирийских хомячков после интраназального заражения SARS-CoV-2. Гистограммы медианных значений инфекционных титров (lgTCID₅₀/мл) в гомогенатах тканей носовой полости (а) и легких (б), в которых вершиной гистограммы представлены медианы, вертикальной линией – 95%-й доверительный интервал. * – Статистически значимое различие при $p < 0.05$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ** – статистически значимо при $p < 0.01$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ns (not significant) – незначимые различия [69].

Характерно, что, в соответствии с результатами ЭПР-измерений тканей сирийских хомячков, парамагнитные М-ДНКЖ белковой природы обнаруживались при ингаляции животным растворов ДНКЖ только в ткани легких, но не в крови или печени, что свидетельствовало об их локализации только в тканях дыхательных путей. При этом концентрация белковых М-ДНКЖ в легких была на порядок выше при ингаляции хомячкам Б-ДНКЖ-GSH, чем при ингаляции им менее устойчивых Б-ДНКЖ-MSH.

Таким образом данные исследования показали, что, действительно, предложенный нами подход к подавлению коронавирусной инфекции, обусловленный атакой на SARS-CoV-2 катионов нитрозония, может оказаться полезным при создании лекарства против ковида-19. Поскольку главное свойство этих катионов — способность S-нитрозировать тиолы как низкомолекулярной, так и белковой природы, есть основание предполагать, что именно иницируемая этими катионами реакция S-нитрозирования разнообразных тиолсодержащих белков — протеаз, белков оболочки вируса, обратных транскриптаз, факторов транскрипции, а также протеаз хозяина — может обеспечить ослабление вирусной репликации в организме хозяина, защищая тем самым организм животных и человека от вирусной инфекции, вызываемой не только SARS-CoV-2, но и другими респираторными вирусами, например грипповирусом. Ранее, в 90-е годы XX века, мы сделали попытку совместно с сотрудниками Института гриппа (Санкт-Петербург, Россия) проверить действие М-ДНКЖ с цистеином на грипповирус в организме мышей. Использованный штамм такого вируса мог при определенной дозе вызывать 100% гибель животных. Эта гибель полностью снималась при внутривенном введении инфицированным мышам указанного комплекса. К сожалению, данный результат остался неопубликованным.

В настоящее время получены данные, позволяющие предполагать, что репликация коронавируса SARS-CoV-2 в организме животных и человека может подавляться также в результате ингаляции потока газообразного NO с концентрацией 1000 ppm и выше [70–72]. Как указывалось выше, при такой ингаляции нейтральные молекулы NO, попадая через легкие в кровь, в значительной своей части трансформируются в ней в катионы нитрозония [37], которые, очевидно, и обеспечивали подавление ковидной инфекции, обнаруженное в работах [70–72]. Следует отметить также недавно

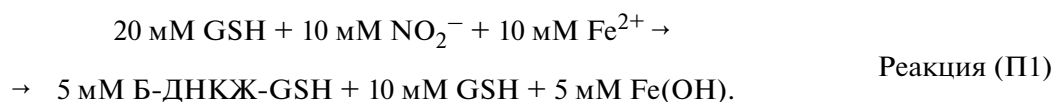
появившуюся публикацию, в которой сообщается о возможном благоприятном влиянии высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота на течение ВИЧ-заболевания у двух ВИЧ-инфицированных пациентов, прошедших сравнительно непродолжительный курс ингаляции NO при его высоком содержании (~1000 ppm) во вдыхаемом воздухе [73], а также благоприятных последствиях такой же терапии больных с пост-ковидным синдромом [74].

Таким образом можно говорить о двух возможных способах генерации катионов нитрозония, способных эффективно подавлять репликацию коронавируса в тканях респираторного тракта. Первый способ — введение в дыхательные пути животных и человека распыленных растворов ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, способными высвобождать катионы нитрозония, в особенности при их распаде под действием производных дитиокарбамата. Второй способ — ингаляция животным и человеку газообразного NO, превращающегося в крови в катионы нитрозония.

ПРИЛОЖЕНИЕ

В заключение демонстрируем два примера синтеза Б-ДНКЖ-GSH по механизму, приведенному на схеме 2, с использованием GS-NO в качестве донора NO. Использование для этой цели самого газообразного NO не рекомендуем. Дело в том, что из-за реализации реакции диспропорционирования молекул этого газа в нем всегда имеется примесь диоксида азота, превращающегося при нейтральных значениях pH в анион нитрита. Неконтролируемое включение этого агента в синтезируемый препарат ДНКЖ может привести к артефактным результатам.

Пример 1. В дистиллированную воду последовательно добавляются глутатион (GSH, 20 mM), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mM) и затем NaNO_2 (10 mM). Первоначальное введение глутатиона приводит к подкислению раствора до pH 1.5–2.0, обеспечивающего полное растворение двухвалентного железа и постепенное образование (в течение 1.0–1.5 ч) GS-NO, иницируемое последующим добавлением нитрита. Раствор при этом приобретает малиновую окраску. После окончания процесса pH раствора добавлением капель крепкой щелочи (NaOH) повышается до величины 7.5–7.8, в результате чего начинается реакция образования Б-ДНКЖ-GSH по следующей суммарной реакции:



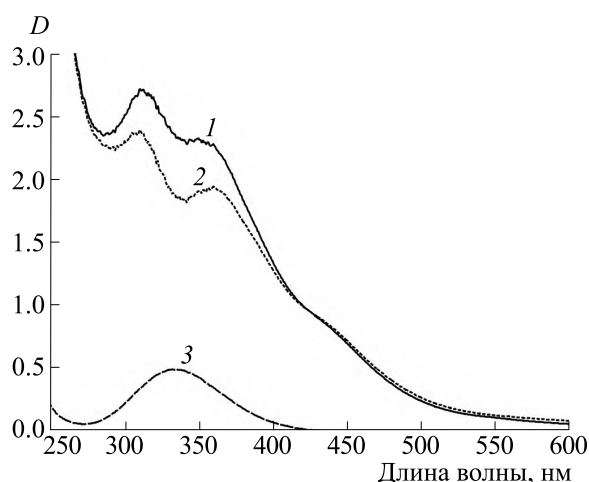


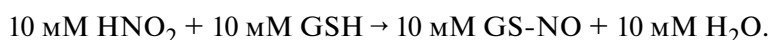
Рис. 9. Спектр 1 – суммарный спектр Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO, синтезированных по примеру 2. Спектр 2 – Спектр поглощения раствора Б-ДНКЖ-GSH, синтезированного по примеру 1. Спектр 3 получен вычитанием из спектра 1 спектра 2. Все растворы перед оптическими измерениями разбавлены в 10 раз.

Для окончания этого процесса требуется не менее 5–6 ч выдерживания раствора на воздухе при комнатной температуре. После этого гидроокисный осадок железа, не вступившего в реакцию, отфильтровывается на бумажном фильтре, а в очищенном от этого осадка растворе Б-ДНКЖ-GSH оптическим методом по интенсивности полосы поглощения на 360 нм ($\epsilon = 3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в оптическом спектре этого комплекса (рис. 9б) оценивается концентрация последнего (в пересчете на одну железо-динитрозильную группу в этом комплексе).

Полученный препарат Б-ДНКЖ-GSH с характерным для него невысоким соотношением кон-

центраций комплекса и свободного GSH (2 : 1) использовался нами в опытах по изучению токсического действия катионов нитрозония, выделявшихся из Б-ДНКЖ-GSH при их разрушении производными дитиокарбамата при двукратном превышении концентрации последних в отношении комплекса.

Максимальный уровень образующихся Б-ДНКЖ-GSH (5 мМ) при указанном соотношении реагентов лимитировался концентрацией нитрита. Весь он при взаимодействии с глутатионом по реакции (П2) в протонированной форме включался в образование GS-NO:

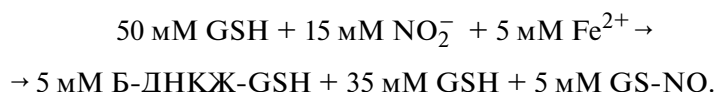


Реакция (П2)

В соответствии со схемой 2 взаимодействие 10 мМ GS-NO с 5 мМ Fe^{2+} должно было приводить к образованию 5 мМ Б-ДНКЖ-GSH (в пересчете на одну железо-динитрозильную группу в этом комплексе).

Пример 2. В дистиллированную воду последовательно добавляются глутатион (50 мМ), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 мМ) и затем NaNO_2 (15 мМ). При таком соотношении концентраций реагентов

концентрация соли железа выступает в качестве лимитирующей образование Б-ДНКЖ-GSH. Далее процедура синтеза этого комплекса проводится так же, как описано выше в первом примере, за исключением того, что образование GS-NO в этом случае требует 15–20 мин и никакой гидроокисный осадок не должен возникать. Суммарная реакция образования 5 мМ Б-ДНКЖ-GSH (реакция П3) описывается как:



Реакция (П3)

Из-за недостатка соли Fe^{2+} как лимитирующего образование Б-ДНКЖ-GSH реагента 5 мМ GS-NO сохраняются в растворе и из-за наложе-

ния их полосы поглощения на 334 нм несколько искажают форму спектра поглощения Б-ДНКЖ-GSH (рис. 9а). При вычитании из этого «иска-

женного» спектра «чистого» спектра 5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH получаем полосу поглощения GS-NO, интенсивность которой при коэффициенте экстинкции $\epsilon = 940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ соответствует 5 мМ GS-NO.

Полученный таким образом препарат Б-ДНКЖ-GSH со сравнительно высоким соотношением концентраций комплекса и свободного GSH (7 : 1) использовался нами в опытах по изучению вазодилаторного и гипотензивного действия этих комплексов на животных и человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с сирийским хомячками и мышами проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18.III.1986). Неукоснительно соблюдались положения Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Washington D.C., 2011) и другие нормы международного права, регулирующие содержание и использование лабораторных животных с точки зрения гуманного обращения с животными и их рационального использования.

Автор подтверждает соблюдение национальных, и международных руководящих принципов по уходу и гуманному использованию животных. Все процедуры экспериментов *in vivo* были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (заявка ГНЦ ВБ «Вектор»/11-10.2023, утверждена протоколом БЭК № 8 от 31.10.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ignarro L., *Nitric oxide biology and pharmacology* (Acad. Press, Zurich, Switzerland, 2000).
- Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы — две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах. *Биохимия*, **63**, 924–938 (1998).
- Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами. *Физикохимия, биология, медицина* (Ижевский институт компьютерных исследований, Ижевск, 2015).
- Vanin A. F. *Dinitrosyl iron complexes as a “working form” of nitric oxide in living organisms* (Cambridge, Cambridge Scholar Publishing, UK, 2019).
- Shumaev K. B., Gubkin A. A., Serezhenkov V. A., Lobysheva I. I., Kosmachevskaya O. V., Topunov A. F., and Vanin A. F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **18**, 37–46 (2008). DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.085
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., and Palmer L.A. Physiological roles of S-nitrosylation. *Mol. Intervention*, **3**, 253–263 (2003). DOI: 10.1124/mi.3.5.253
- Zhang Y. and Hogg N. S-nitrosohemoglobin: a biochemical perspective. *Free Rad. Biol. Med.*, **38**, 947–958 (2005). DOI: 10.1016/J.FreeRadbiomed.2004.12.016
- Seth D., Hess D. T., Hausladen A., Wang L., Wang Y-J., and Stamler J. S. A multiplex enzymatic machinery for cellular protein S-nitrosylation. *Mol. Cell*, **69**, 451–464 (2018). DOI: 10.1016/j.molcel.2017.12.025
- Mingos D. V. P. Historical introduction to nitrosyl complexes. *Structure & Bonding*, **153**, 15–44 (2014). DOI: 10.1007/43_2013_116
- Vanin A. F. Nitrosonium ions as a constituents of dinitrosyl iron complexes with glutathione responsible for their S-nitrosating activity. *Austin J. Anal. Pharm. Chem.*, **5**, 1109–1119 (2018). DOI: 10.26420/austinjnanalpharmchem.2018.1109
- Melia T. P. Decomposition of nitric oxide at elevated pressure. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **27**, 95–98 (1965).
- Agnew S. F., Spansou B. I., and Jones L. H. Disproportionation of nitric oxide at high pressure. *J. Phys. Chem.*, **89**, 1678–1682 (1985).
- Vanin A.F. What is the mechanism of nitric oxide transformation into nitrosonium ions ensuring S-nitrosating processes in living organisms. *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 279–292 (2019). DOI: 10.1007/s12013-019-00886-1
- Liu Q., Yu K., and Yi P. Affinity of Fe^{2+} to nitric oxide in aqueous solutions. *Environ. Sci. Pollution Res.*, **28**, 19540–19550 (2019).
- Vanin A. F. How is nitric oxide (NO) converted into nitrosonium cation (NO^+) in living organisms? (Based on the results of optical and EPR analysis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands). *Appl. Magn. Res.*, **51**, 851–876 (2020). DOI: 10.1007/s00723-020-01270-6
- Vanin A.F. Physico-chemistry of dinitrosyl iron complexes as a determinant of their biological activity. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10536 (2021). DOI: 10.3390/ijms22191035610.1007/s00723-020-01270-6
- Enemark J. H. and Feltham R. D. Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl. *Coord. Chem. Rev.*, **13**, 339–406. (1974). DOI: 10.1016/S0010-845(00)80259-3
- Vanin A. F., Sanina N. A., Serezhenkov V. A., Burbaev D. S., Lozinsky V. I., and Aldoshin S. M. Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands: spatial

- and electronic structures. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 62–73 (2007). DOI: 10.1016/j.niox.2006.07.005
19. Vanin A. F. and Aliev D. I. High spin nitrosyl non-heme iron complexes in animal tissues. *Studia Biofizika*, **93**, 63–68 (1983).
 20. Vanin A. F. and Burbaev D. Sh. Electronic and spatial structures of water-soluble dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands underlying their activity to act as nitric oxide and nitrosonium ion donors. *Biophys. J.*, **14**, 878236 (2011). DOI: 10.1155/2011/878236
 21. Налбандян Р. М., Ванин А. Ф. и Блюменфельд Л. А. В сб. *Тезисы Всесоюз. конф. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах»* (М., 1964), с. 18.
 22. Ванин А. Ф. и Налбандян Р. М. Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках. *Биофизика*, **10**, 167–168 (1965).
 23. Ванин А. Ф., Блюменфельд Л. А. и Четвериков А. Г. Исследование методом ЭПР комплексов негеминного железа в клетках и тканях. *Биофизика*, **12**, 829–858 (1967).
 24. Ванин А. Ф. Идентификация комплексов двухвалентного железа с цистеином в биологических системах. *Биохимия*, **60**, 226–232 (1995).
 25. Vanin A. F., Papina A. A., Serezhnikov V. A., and Koppenol W. The mechanism of S-nitrosothiol decomposition catalyzed by iron. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **10**, 60–73 (2004). DOI: 10.1016/j.niox.2004.02.005
 26. Truzzi D. R., Augusto O., and Ford P. C. Thiyl radicals as co-product of dinitrosyl iron complex (DNIC) formation. *Chem. Comm.*, **55**, 9156–9159 (2019). DOI: 10.1039/c9cc04454j
 27. Truzzi D. R., Medeiros N. M., Augusto O., and Ford P. Dinitrosyl iron complexes (DNICs). From spontaneous assembly to biological roles. *Inorg. Chem.*, **60**, 15835–15845 (2021). DOI: 10.1021/acs.inorgchem.1c00823
 28. Vanin A. F. The free-radical nature of nitric oxide molecules as a determinant of their conversion to nitrosonium cations in living systems. *Biophysics*, **65**, 353–367 (2020). DOI: 10.1134/S0006350920030239
 29. Ванин А. Ф. и Ткачев Н. А. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как источники универсальных цитотоксинов — катионов нитрозония *Биофизика*, **68** (3), 421–434 (2023). DOI: 10.1134/S0006302923030018
 30. Ванин А. Ф. Позитивное (регуляторное) и негативное (цитотоксическое) действие динитрозильных комплексов железа в живых организмах. *Биохимия*, **87**, 1737–1760 (2022). DOI: 10.1134/S0006297922110153
 31. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как функционально активная, «рабочая» форма системы оксида азота в живых организмах (обзор). *Молекуляр. биология*, **57** (6), 925–937 (2023). DOI: 10.31857/S0026898423060204, EDN: QLHGFC
 32. 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: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **23**, 136–147 (2010). DOI: 10.1016/j.niox.2010.05.285
 33. Vanin A. F., Malenkova I. V., and Serezhnikov V. A. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic studies. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 1991–2003 (1997). DOI: 10.1006/niox.1997.0122
 34. Borodulin R. R., Kubrina L. N., Mikoyan V. D., Poltorakov A. P., Shvydkiy V. O., Burbaev D. S., Serezhnikov V. A., Yakhontova E. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO⁺ donors. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **29**, 4–16 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2012.11.001
 35. Hickok J. R., Sahni S., Shen H., Arvindt A., Antoniou C., Fung L. W. M., and Thomas D. D. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: biological parameters of assembly and disappearance *Free Rad. Biol. Med.*, **51**, 1558–1566 (2011). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.030
 36. Vedernikov Y. P., Mordvintsev P. I., Malenkova I. V., and Vanin A. F. Similarity between the vasorelaxing activity of dinitrosyl iron cysteine complexes and endothelium-derived relaxing factor. *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 313–317 (1992). DOI: 10.1016/0014-2999(92)90386-i
 37. Ванин А. Ф., Абрамов А. А., Вагапов А. Б., Тимошин А. А., Пекшев А. В., Лакомкин В. Л. и Рууге Э. К. Почему вдыхание газообразного оксида азота не влияет на системное артериальное давление у человека и животных? *Биофизика*, **68**, 1259–1264 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923060170
 38. Chazov E. I., Rodnenkov O. V., Zorin A. V., Lakomkin V. L., Gramovich V. V., Vyborov O. N., Dragnev A. G., Timoshin A. A., Buryachkovskaya L. I., Abramov A. A., Massenko V. P., Arzamastsev E. V., Kapelko V. I., and Vanin A. F. Hypotensive effect of “Oxacom” containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **26**, 147–157 (2012). DOI: 10.1016/j.niox.2012.01.008
 39. Ванин А. Ф., Пекшев А. В., Вагапов А. Б., Шарапов Н. А., Лакомкин В. Л., Абрамов А. А., Тимошин А. А. и Капелько В. И. Газообразный оксид азота и динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как предполагаемые лекарственные средства, способные купировать Covid-19. *Биофизика*, **66**, 1283–1294 (2021). DOI: 10.1134/S0006350921010218
 40. 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**, 93–102 (2021). DOI: 10.1007/s12013-020-00962-x
 41. Mikoyan V. D., Burgova E. N., Borodulin R. R., and Vanin A. F. The binuclear form of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in animal tissues. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **62**, 1–10 (2017). DOI: 10.1016/j.niox.2016.10.007

42. Галаган М. Е., Орановская Е. В., Мордвинцев П. И., Медведев О. С. и Ванин А. Ф. Гипотензивный эффект динитрозильных комплексов железа в опытах на бодрствующих животных. *Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра*, **2**, 73–79 (1988).
43. Vanin A. F., Mokh V. P., Serezhnikov V. A., and Chazov E. I. Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 322–330 (2007). DOI: 10.1016/j.niox.2006.12.003
44. Shekhter A. B., Rudenko T. G., Istranov L. P., Guller A. E., Borodulin R. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating wound healing. *Eur. J. Pharmacol.*, **78**, 8–18 (2015). DOI: 10.1016/j.ejps.2015.06/002
45. Мордвинцев П. И., Руднева В. Г., Ванин А. Ф., Шимкевич Л. Л. и Ходоров Б. И. Ингибирующее действие динитрозильных комплексов железа с низкомолекулярными лигандами на агрегацию тромбоцитов. *Биохимия*, **51**, 1861–1866 (1986).
46. Шамова Е. Б., Бичан О. Д., Дрозд Е. С., Горудко И. В., Чижик С. А., Шумаев К. Б., Черенкевич С. Н. и Ванин А. Ф. Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами оксида азота. *Биофизика*, **56**, 265–271 (2011). DOI: 10.1134/S0006350911020278
47. Remizova M. I., Kochetygov N. I., Kerbut K. A., Burgova E. N., and Vanin A. F. Effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, **662**, 40–46 (2011). DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.04/046
48. Andreev-Andriyevsky A. A., Mikoyan V. D., Serezhnikov V. A., and Vanin A. F. Penile-erectile activity of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **24**, 217–223 (2011). DOI: 10.1016/j.niox.2011.04.008
49. Kim Y. M., Chung H. T., Symmons R. L., and Billiar T. Cellular nonheme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10954–10961 (2000).
50. Ding H. and Demple B. Direct nitric oxide transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5146–5150 (2000).
51. Васильева С. В., Ступакова М. В., Лобышева И. И. и Ванин А. Ф. Активация SoxRS-регулона в *Escherichia coli* оксидом азота и его физиологическими донорами. *Биохимия*, **66**, 1209–1214 (2001).
52. Crack J. C., Smith J., Stapleton M., Peck J., Watmough N. J., Buttner M., Duxton R. S., and Green J. Mechanistic insight into the nitrosylation of the [4Fe-4S] cluster in WhiB-like proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 1112–1121 (2011). DOI: 10.1021/ja109581t
53. Lo F. C., Lee J. F., Liaw W. F., Hsu T. J., Tsai Y. F., Chan S. I., and Yu S. F. The metal core in the recombinant *Escherichia coli* transcriptional factor SoxR. *Chem. Eur. J.*, **128**, 2565–2577 (2012). DOI: 10.1002/chem.2011.00838
54. Lepka K., Volbracht K., Bill E., Schneider R., Rios N., Hildebrandt T., Ingwersen J., Prozorovski T., Lillig C. H., van Horssen J., Steinman L., Hartung H.-P., Radi R., Holmgren A. S., and Afnas O. Iron-sulfur glutaredoxin 2 protects oligodendrocytes against damage induced by nitric oxide release from activated microglia. *Glia*, **65**, 1521–1534 (2017). DOI: 10.1002/glia.23178
55. Wiegant F. A. C., Malyshev I. Y., Kleschyov A. L., Van Faassen E., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as inductor of heat shock protein synthesis in H35 hepatoma cells. *FEBS Lett.*, **455**, 179–182 (1999).
56. Voevodskaya N. V., Serezhnikov V. A., Cooper C. E., and Vanin A. F. Exogenous ferrous ion is required for the nitric oxide-catalyzed destruction of the iron-sulfur center in adrenodoxin. *Biochem. J.*, **368**, 633–639 (2002). DOI: 10.1042/BJ20020788
57. Richardson D. R. and Lock H. C. The nitric oxide-iron interplay in mammalian cells: transport and storage of dinitrosyl iron complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 638–651 (2008). DOI: 10.1016/bbagen.2007.12.009
58. Chang S.-H., Hsiao Y.-J., Chen Y.-H., Cheng M.-H., Liu J.-W., Huang H.-J., Chou Y.-T., Amer Y. A. M., Vijayarghavan P., Palanisamy S., Wang Y.-M., and Lu T.-T. Conjugation of bone grafts with NO-delivery dinitrosyl iron complexes promotes synergistic osteogenesis and angiogenesis in rat calvaria bone defects. *J. Material Chem.*, **11**, 807–819 (2023). DOI: 10.1039/d3tb00587a
59. Писаренко О., Серебрякова Л. И. и Цкитишвили Ш. В. Кардиозащитное действие динитрозильных комплексов железа с цистеином у крыс. *Изв. РАН. Сер. биол.*, **1**, 110–114 (2008).
60. Chuang W.-H., Chou Y.-T., Chen Y.-T., Kuo T.-H., Liaw W.-F., Lu T.-T., Kao C.-F., and Wang Y.-M. Neuroprotective effect of NO-delivery dinitrosyl iron complexes (DNICs) on pathology in the Alzheimer's disease cell model. *ACS Chem. Neurosci.*, **14**, 2922–2937 (2023). DOI: 10.1021/acscchemneuro.3c00348
61. Lee T. Y., Lu H. H., Cheng H. T., Huang H. C., Tsai Y. J., Chang I. H., Tu C. P., Chung C. W., Lu T. T., and Chen Y. Delivery of nitric oxide with pH-responsive nanocarrier for the treatment of renal fibrosis. *J. Controlled Release*, **354**, 417–429 (2023). DOI: 10.1016/j.jconrel.2922.12.059
62. Keese M. A., Bose M., Muelsch A., Schirmer R. H., and Becker K. Dinitrosyl-dithiol-iron complexes, nitric oxide (NO) carriers *in vivo*, as potent inhibitors of human glutathione reductase and glutathione-S-transferase. *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 1307–1313 (1997). DOI: 10.1016/S0006-2952(97)00348-1
63. Wu C. R., Huang Y. D., Hong Y. H., Liu Y.-H., Narwane M., Chang Y. H., Dinh T. K., Hsieh H. T., Hseuh Y. J., Wu P. C., Pao C. W., Chan T. S., Hsu I. J., Cheng Y., Chen H. C., Chin T. Y., and Lu T. T. Endogenous conjugation of biomimetic dinitrosyl iron complex with protein vehicles for oral delivery of nitric oxide to brain and activation of hippocampal neurogenesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1** (7), 998–1013 (2021). DOI: 10.1021/jacsau.1c00160

64. Graziano M. and Lamattina L. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. *Trends Plant Sci.*, **10**, 4–8 (2005). DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03283x
65. Khan S., Kayahara M., Joashi U., Mazarakis N. D., Saraff S., and Huges M. Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and nitrosonium cation. *J. Cell Sci.*, **110**, 2315–2322 (1997). DOI: 10.1242/jcs.110.18.2315
66. Kleschyov A. L., Strand S., Schmitt S., Gottfried D., Skatchkov M., Daiber A., Umansky V., and Munzel T. Dinitrosyl-iron triggers apoptosis in Jurkat cells despite overexpression of Bcl-2. *Free Rad. Biol. Med.*, **40**, 1340–1348 (2006). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.001
67. Ванин А. Ф., Телегина Д. И., Микоян В. Д., Ткачев Н. А. и Васильева С. В. Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов. *Биофизика*, **67**, 938–946 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922050207
68. Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Пьянков О. В., Багрянская Е. Г. и Попкова В. Я. Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка. *Биофизика*, **67**, 969–981 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050167
69. Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Ткачев Н. А. и др. Противовирусное действие в отношении SARS-CoV-2 растворов динитрозильных комплексов железа при их ингаляции сирийским хомячком в «nose-only» камере. *Биофизика*, **68** (6) (2024) (в печати).
70. Чернеховская Н. Е., Хивренко Л. А., Андреев В. Г., Пекшев А. В., Поваляев А. В. и Степанова В. В. Оксид азота в комплексном лечении и профилактике осложнений при COVID-19. *Госпитальная медицина: Наука и практика*, **5**, 41–45 (2022). DOI: 10.34852/GM3CVKG.2022.15.31.008
71. Печёнкин Е. В., Коврижкин А. В., Пекшев А. В., Вагапов А. Б., Шарапов Н. А. и Ванин А. Ф. Высокодозовая ингаляция газообразного оксида азота в лечении COVID-19. *Биофизика*, **67**, 1251–1261 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922060185
72. Каменщиков Н. О., Кузнецов М. С., Дьякова М. Л., Подоксёнов Ю. К., Калашникова Т. П., Тё М. А., Чурилина Е. А. и Козлов Б. Н. Ингаляционная терапия комбридного пациента с COVID-19 высокими дозами оксида азота: клинический случай. *Клинические случаи*, **37**, 180 (2022). DOI: 10.29001/2073-8552-2022-37-4-180-187
73. Пекшев А. В., Вагапов А. Б., Шарапов Н. А. и Ванин А. Ф. Высокодозовая ингаляция газообразного оксида азота при ВИЧ-инфекции. *Биофизика*, **68** (5), 1074–1080 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923050289
74. Ванин А. Ф., Пекшев А. В., Печёнкин Е. В., Вагапов А. Б. и Шарапов Н. А. Терапевтическое действие высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота на постковидный синдром, диабет и ВИЧ инфекцию. *Биофизика*, **68**, 142–149 (2023). DOI: 10.31857/0006302923010167

Mechanisms of the Formation and Function of Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms

A.F. Vanin*

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

It has been proposed that only the introduction of endogenous nitric oxide (NO) into dinitrosyl iron complexes (DNIC) or S-nitrosothiols (RS-NO) can ensure stabilization of NO that is critical for operating in an auto/paracrine manner as a regulator of biological processes in living organisms. Without this introduction, the majority of endogenous NO disappears due to aggressive intra/intercellular environment thereby eliminating it from metabolic processes. Administration of exogenous NO in human and animal organisms (the only possible route of administration is via inhalation when it is in the gaseous state) does not lead to formation of DNIC or RS-NO in blood or other tissues. Hence, the majority of exogenous NO during its inhalation is converted into nitrosonium cations (NO^+), the emergence of which is evidenced by their conversion into RS-NO when various thiol-containing compounds are administered to animal blood concomitantly. In turn, RS-NO formation in those animals was manifested by hypotensive effect on them. NO molecule transformation into nitrosonium cations may also occur during DNIC formation induced by a disproportionation reaction of endogenous NO molecules binding with Fe^{2+} ions in pairs. Subsequent binding of $\text{Fe}(\text{NO})_2$ groups to thiol-containing ligands that occur during this reaction promotes formation of rather stable DNICs that act as donors of both neutral molecules of NO and nitrosonium cations (NO^+) in living organisms. The transfer of NO and NO^+ to targets for nitrosation reactions occurs by the interaction of low molecular DNICs with heme groups of heme-containing proteins (for example, guanylate cyclase) or thiol groups in low molecular or protein thiol-containing compounds. This paper presents different results of NO and NO^+ transfer in living organisms discussing both positive, regulatory and negative, toxic effects of it.

Keywords: nitric oxide, nitrosonium cation, dinitrosyl iron complex, S-nitrosothiol, disproportionation reaction