

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный
исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской
академии наук

На правах рукописи

Трифорова Наталья Евгеньевна

**КАТИОН НИТРОЗОНИЯ КАК ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ КОМПОНЕНТ
НИТРОПРУССИДА**

1.5.2. Биофизика

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Ванин Анатолий Фёдорович

Москва – 2026

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Оксид азота (NO) как один из универсальных регуляторов биологических процессов.....	16
1.1.1. Двойственная роль NO в биологических системах	16
1.1.2. Биосинтез и физиологическая роль NO в организме	17
1.1.3. Цитотоксические эффекты катионов нитрозония (NO ⁺)	18
1.2. Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами в живых организмах.....	20
1.2.1. Общие характеристики ДНКЖ и механизмы их образования	20
1.2.2. ДНКЖ как доноры катионов нитрозония	25
1.2.3. Цитотоксическое действие катионов нитрозония, донируемых ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами	28
1.2.4. Генотоксическое действие ДНКЖ-MS на клетки MCF-7	30
1.2.5. Устойчивость Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами и их способность высвобождать катионы нитрозония.....	31
1.2.6. Биологическое действие Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами как доноров NO и NO ⁺	32
1.2.7. Образование М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ в живых организмах как защитная реакция от окисления кислородом оксида азота	35
1.3. Нитропруссид натрия (SNP).....	37
1.3.1. SNP как донор NO ⁺	37
1.3.2. История применения препарата SNP	37
1.3.3. Воздействие SNP на организм	38
1.3.4. Одноэлектронное восстановление SNP	39
1.3.5. Цитотоксическая активность SNP как донора NO ⁺	40
1.4. Заключительное замечание по поводу современного состояния проблемы цитотоксической активности катиона нитрозония.....	41

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

43

2.1. Реактивы	43
2.2. Клетки	45
2.3. Животные	45
2.4. Методы	47
2.4.1. МТТ-тест	47
2.4.2. Метод ДНК-комет или кометный анализ (Comet Assay)	48
2.4.3. Двойное окрашивание (Double Staining)	53
2.4.4. Морфологическая оценка	55
2.4.5. ЭПР-спектроскопия	56
2.5. Репрезентация результатов и статистика	57

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

58

3.1. Синтез ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами	58
3.2. Выживаемость клеток по МТТ-тесту после воздействия препаратов SNP, ДНКЖ-MS и MS-NO на клетки MCF-7	59
3.3. Генотоксическое действие SNP: индукция двунитевых разрывов ДНК и морфологические изменения клеток MCF-7	62
3.3.1. Классификация комет и морфологические критерии повреждения клеток	62
3.3.2. Индукция двунитевых разрывов ДНК под действием SNP	65
3.3.3. Репарация повреждений ДНК, индуцированных SNP, ДНКЖ-MS, MS-NO (RS-NO) – нитрозотиольная форма меркаптосукцината.....	68
3.4. Влияние дитионита натрия (SDT) на цито- и генотоксичность SNP: проверка роли NO⁺	68
3.4.1. Влияние SDT на цитотоксичность SNP (МТТ-тест)	69
3.4.2. Оценка целостности мембраны (двойное окрашивание АО/PI)	70
3.4.3. Влияние SDT на генотоксичность SNP (кометный анализ)	72

3.4.4. Причины остаточной цито- и генотоксичности SNP после обработки SDT (ЭПР-спектроскопия)	72
3.5. Исследование генотоксичности SNP и влияния SDT на спленоцитах мыши <i>in vivo</i>	77
3.5.1. Индукция и репарация ОР и ДР ДНК под действием SNP	77
3.5.2. Оценка целостности мембраны спленоцитов	79
3.5.3. Влияние SDT на генотоксичность SNP <i>in vivo</i>	80
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	85
4.1. Цитотоксическое и генотоксическое действие доноров NO и NO ⁺	85
4.2. Механизмы двунитевой деградации ДНК, индуцированной SNP	86
4.3. Вклад NO ⁺ в токсическое действие SNP: данные с использованием SDT.....	88
4.4. Цианид-ионы не являются причиной цитотоксичности SNP	89
4.5. Сопоставление результатов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	91
4.6. Сопоставление с современными представлениями о механизмах повреждения ДНК	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	97
ПРИЛОЖЕНИЕ	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Существует представление о двойственной роли оксида азота (NO), в которой можно выделить позитивную регуляторную и негативную цитотоксическую функции [1]. Данная работа призвана уточнить эти представления, показав, что ключевым агентом цитотоксического действия NO является не пероксинитрит (ONOO^-), образующийся при взаимодействии NO с супероксид-анионом ($\text{O}_2^{\cdot-}$), а катион нитрозония (NO^+). NO^+ может генерироваться различными путями, включая одноэлектронное окисление NO, а также в реакциях с участием ионов металлов и их комплексов, таких как динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ).

Сегодня, когда антибиотики теряют эффективность, актуален поиск новых средств. По данным глобального отчёта ВОЗ (2025), в 2023 году каждая шестая лабораторно подтверждённая бактериальная инфекция оказалась устойчивой к антибиотикам. За период 2018–2023 гг. рост устойчивости продемонстрировали более 40% отслеживаемых комбинаций «патоген–антибиотик», а среднегодовой прирост их доли составлял от 5 до 15% [2].

Препараты на основе NO обладают широким спектром антимикробного действия против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, некоторых вирусов и простейших [3]. Благодаря комплексному механизму (окислительный стресс, повреждение мембран, нарушение работы ферментов) бактериям сложнее выработать устойчивость [4]. Активные формы азота ($\text{NO}\cdot$, NO^+ , ONOO^-) эффективно разрушают бактериальные биоплёнки, инициируют переход патогенов в планктонную форму, повышая чувствительность к антимикробным агентам [5]. Дополнительные преимущества NO – синергия с традиционными антибиотиками [6], иммуномодулирующие свойства [7] и возможность контролируемой локальной доставки (наночастицы, гидрогели) [8].

Дефицит NO в тканях связан с развитием сахарного диабета [9], гипертонической болезни [10], глаукомы [11], эндометриоза [12] и онкологических заболеваний [13]. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* демонстрируют перспективность применения синтетических ДНКЖ для терапии этих патологий [14]. Один из хорошо известных доноров NO – нитропруссид натрия (SNP). Он используется в клинической практике для снижения артериального давления [15], профилактики и терапии острой сердечной недостаточности [16], снижения дисфункции кишечника у крыс [17] и терапии шизофрении [18].

SNP проявляет выраженное цито- и генотоксическое действие. Существует устоявшееся мнение, что это связано с продукцией цианида [19], однако, по нашему мнению, эффект обусловлен прежде всего высвобождением NO^+ [20-23]. Генотоксичность SNP была ранее подтверждена на культуре гепатоцитов (индукция мутаций в гене *GPRT*) [24]. Однако до настоящего времени не было систематического анализа, какой именно активный компонент нитропруссиды – NO^+ или продукты его распада определяет его генотоксическое действие, и каковы механизмы индукции двунитевых разрывов ДНК. Решение этой проблемы важно как для понимания фундаментальных механизмов цитотоксичности, так и для разработки новых безопасных доноров NO.

Степень разработанности темы

Ранние исследования Ш. Хана (Sh. Khan) с соавт. (1997) и А. Л. Клещёва с соавт. (2006) показали, что NO^+ индуцирует апоптоз быстрее и эффективнее NO, причём антиоксиданты не защищают клетки от NO^+ [25, 26]. Цитотоксическое действие ДНКЖ на клетки Jurkat опосредовано именно NO^+ , а не NO [26].

Р. Р. Бородулин с соавт. (2013) установили, что биядерные ДНКЖ с глутатионом (В-ДНКЖ-GSH) способны высвобождать как NO, так и NO^+ в зависимости от условий; тиоловые лиганды необходимы для генерации NO^+ [27]. Т. Т. Лу (T. T. Lu) с соавт. (2018) обобщили, что NO^+ через S-нитрозилирование

тиолов и взаимодействие с железосерными кластерами регулирует клеточную сигнализацию и проявляет антимикробную активность [28].

Группа А. Ф. Ванина на культуре MCF-7 (2021) подтвердила, что NO^+ является основным цитотоксическим компонентом ДНКЖ [29]. На бактериях *E. coli* (2022) было показано, что бактериостатическое действие NO^+ значительно сильнее, чем у NO [30]. Также С. В. Васильева с соавт. (2023) продемонстрировали, что NO^+ ингибирует образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa*, блокируя сигнальные функции NO [31].

А. Ф. Ванин с соавт. на модели SARS-CoV-2 у хомячков и саркомы Льюис у мышей (2024) выявили, что противовирусный эффект Б-ДНКЖ обусловлен прямым высвобождением NO^+ в дыхательных путях, а противоопухолевый связан с опосредованным действием через макрофаги, доставляющие NO^+ в опухоль [32]. А. В. Шиповалов с соавт. (2024) подтвердили, что ингаляционное введение Б-ДНКЖ эффективно подавляет репликацию SARS-CoV-2 за счёт NO^+ [33].

Й. Машек (J. Mašek) с соавт. детально описали pH-зависимую «переключаемость» нитропруссидов, что обеспечило теоретическую базу для его использования как специфического донора NO^+ [34]. Т. М. Рассел (T. M. Russell) и Д. Р. Ричардсон (D. R. Richardson) (2022) показали, что глутатион-S-трансферазы участвуют в образовании и депонировании ДНКЖ, модулируя NO-сигналинг [35].

Все представленные работы сходятся в том, что катион нитрозония (NO^+) является активным цитотоксическим агентом, действующим через S-нитрозилирование белков, и его эффект превосходит эффект NO. Остается неясным, является ли NO^+ основным агентом, ответственным за генотоксическое действие SNP на клетки млекопитающих, и каковы молекулярные механизмы этого воздействия. Настоящая работа направлена на восполнение этого пробела.

Цели и задачи

Основная цель – установить цитотоксический эффект NO и NO^+ по уровню повреждений ДНК препаратами ДНКЖ и SNP и определить различия их воздействия.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ цитотоксического и генотоксического действия SNP и самораспадающегося ДНКЖ с помощью МТТ-теста и метода ДНК-комет.
2. Провести дополнительные эксперименты на MCF-7 и *in vivo* на спленоцитах мышей, дополнив методы морфологическим анализом (двойное окрашивание).
3. Оценить летальные и сублетальные повреждения, индуцированные NO^+ , и вклад репарации ДНК.
4. С помощью дитионита натрия (SDT) определить вклад NO^+ в токсическое действие SNP.
5. Оценить причины остаточной цитотоксичности SNP после обработки SDT методом ЭПР.

Научная новизна

Научная новизна проведённого исследования определяется впервые выполненным комплексным анализом цитотоксичности и генотоксичности нитропрусида натрия (SNP) с детальной оценкой вклада NO^+ как основного цитотоксического компонента SNP. Экспериментальные данные подтверждают, что именно NO^+ играет ключевую роль в реализации цито- и генотоксического действия SNP.

Установлено, что NO^+ инициирует формирование одно- и двунитевых разрывов ДНК, повреждение митохондрий и апоптоз. Впервые сопоставлены данные ДНК-комет с динамикой морфологических изменений клеток при апоптозе,

индуцированном NO^+ из SNP. Выдвинуто предположение о принципиальном различии механизмов повреждающего действия NO^+ и NO на ДНК: NO^+ индуцирует необратимые двунитевые разрывы через 1 час (за счёт совпадения множественных одонитевых разрывов), тогда как NO вызывает менее критические повреждения, восстанавливаемые системами репарации.

Проведённое в 2025 г. исследование под руководством А. Ф. Ванина напрямую демонстрирует, что именно NO^+ в составе SNP определяет его цитотоксичность в отношении MCF-7, причём даже при восстановлении NO^+ до NO цитотоксический эффект не подавляется полностью из-за образования новых комплексов, содержащих NO^+ [20]. Установлено, что NO вызывает менее объёмные двунитевые и одонитевые разрывы, способные к восстановлению, и гибель клеток через 24 часа с участием эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) [36].

Гипотеза исследования: одноэлектронное восстановление SNP дитионитом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) превращает NO^+ в NO, что существенно ослабляет цито- и генотоксическое действие препарата.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование раскрывает механизм снижения цито- и генотоксичности за счёт одноэлектронного восстановления NO^+ до NO, углубляя понимание связи «структура–активность–токсичность» нитрозосоединений. Практически: полученные данные могут быть использованы специалистами, работающими с методами ДНК-комет и двойного окрашивания; описанный механизм может помочь в разработке препаратов на основе доноров NO^+ с пониженной токсичностью для терапии раковых, вирусных и бактериальных заболеваний.

Методология и методы исследования

Методологический подход настоящего исследования базируется на токсикологических исследованиях с использованием сочетания клеточных моделей *in vitro* (линия MCF-7) и *in vivo* (спленоциты мыши) которые также используются для анализа онкологических заболеваний и оценки канцерогенных эффектов. Применяемые методы: физико-химические (ЭПР-спектроскопия и спектрофотометрия), цитологические (МТТ-тест, двойное окрашивание и флуоресцентная микроскопия) и молекулярно-генетические методы (щелочной и нейтральный анализ ДНК методом ДНК комет). Такой комплексный подход позволил одновременно оценить цитотоксичность, генотоксичность и репарационный потенциал клеток, а также идентифицировать активные формы азота (NO и NO^+), ответственные за повреждения ДНК. Подробное описание методов представлено в Главе 2.

Все статистические расчеты были проведены при помощи программного обеспечения Origin Pro 8.1. (Originlab Corporation, США). Подсчет числа клеток и апоптотических фокусов проводили с помощью программы ImageJ 1.48v (Wayne Rasband National Institutes of Health, США). Повреждение ДНК определяли из анализа ДНК-комет с помощью программы CASP 1.2.2. (Wroclaw, Institute of Theoretical Physics, Польша). Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Экспериментальная работа была выполнена на базе лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук и лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук.

Положения, выносимые на защиту

1. Цито- и генотоксическое действие SNP на клетки MCF-7 реализуется через высвобождение NO^+ , а не цианид-ионов или молекул NO. Восстановление NO^+ в SNP до NO дитионитом натрия предотвращает повреждение ДНК и гибель клеток, вызываемых SNP. При этом образование в ходе распада SNP динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), служащих альтернативными донорами NO^+ , приводит к сохранению остаточного токсического эффекта, тогда как при физиологических значениях pH цианид не вносит вклад в цитотоксичность.

2. NO^+ вызывает в клетках MCF-7 двунитевые разрывы ДНК в течение 90 минут; этот процесс не зависит от фазы клеточного цикла, а уровень разрывов прямо коррелирует с последующей гибелью клеток.

3. Доноры нейтральных молекул NO (ДНКЖ-MS и MS-NO) не индуцируют двунитевых разрывов ДНК, а их цитотоксичность опосредована активацией системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), что принципиально отличает механизм их действия от генотоксического эффекта NO^+ .

4. Генотоксическое действие SNP *in vivo* на спленоцитах мышей также обусловлено NO^+ , а не нейтральным NO или пероксинитритом: дитионит натрия, восстанавливающий NO^+ до NO, достоверно снижает уровень двунитевых разрывов ДНК в клетках селезёнки.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, полученных в экспериментальном исследовании и обоснованность выводов обеспечена использованием сертифицированного оборудования, стандартизованных реагентов и применением общепринятых физико-химических и биологических методов исследования, воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой полученных данных с применением стандартных программ, статистической обработки по критерию Стьюдента, а также непараметрического критерия Колмогорова–Смирнова ($p < 0,05$), а также

соотнесением данных, полученных с применением различных методов исследования. Основные положения и результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях:

1. X международная конференция молодых учёных «OpenBio», 26–28 сентября 2023, Новосибирск. Тезисы: Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Тронов В. А. Генотоксическое и цитотоксическое действие доноров оксида азота: ДНКЖ с меркаптосукцинатом, нитрозомеркаптосукцинатом; и донора катионов нитрозония, Na-нитропрусида, на клетки MCF-7. С.415-417. DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-217.

2. XXIX ежегодная конференция отдела динамики химических и биологических процессов ФИЦ ХФ РАН, 20–21 марта 2024, Москва. Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Тронов В. А., Ванин А. Ф. Цитотоксичность и генотоксичность нитропрусида: вклад иона нитрозония. С. 27–36.

3. X Всероссийская научная молодёжная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции», 22–24 апреля 2024, Москва. Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Тронов В. А., Ванин А. Ф. Цитотоксичность и генотоксичность нитропрусида: вклад иона нитрозония.

4. XI международная конференция молодых учёных «OpenBio», 24–27 сентября 2024, Новосибирск. Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Тронов В. А., Ванин А. Ф. Снижение количества молекул NO^+ в системе понижает цито- и генотоксичность Na-нитропрусида при восстановлении дитионитом Na на культуре клеток MCF-7. С. 334-336. DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6.

5. XXI Международная научная конференция «Молодёжь в науке 2024», 29–31 октября 2024, Минск. Трифонова Н. Е., Тронов В. А., Некрасова Е. И., Ванин А. Ф. Катион нитрозония как источник цито- и генотоксичности нитропрусида натрия. С. 442–445.

6. XXX ежегодная конференция ФИЦ ХФ РАН, секция «Динамики химических и биологических процессов», 11 марта 2025, Москва. Трифонова Н. Е., Тронов В. А., Некрасова Е. И., Ванин А. Ф., Микоян В. Д., Ткачёв Н. А. Генотоксичность нитропрусида как донора катиона нитрозония.

7. XXXI ежегодная конференция ФИЦ ХФ РАН, секция «Динамики химических и биологических процессов», 10-11 марта 2026, Москва. Трифонова Н. Е., Тронов В. А., Некрасова Е. И., Ванин А. Ф. Генотоксичность нитропрусида как донора катиона нитрозония, анализ ДНК-комет на спленоцитах мыши *in vivo*.

8. XIII международная конференция молодых ученых биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio», 22 по 25 сентября 2026, Новосибирская область, наукоград Кольцово. Тезисы: Трифонова Н. Е., Тронов В. А., Некрасова Е. И., Ванин А. Ф. Генотоксичность нитропрусида как донора катионов нитрозония, анализ ДНК-комет на спленоцитах мыши *in vivo*.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, а также 3 работы в виде тезисов.

Статьи:

1. Ванин А. Ф., Тронов В. А., Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Микоян В. Д., Ткачев Н. А. Катион нитрозония как компонент нитропрусида, определяющий его цитотоксичность. *Биофизика*. 2025. Т. 70, № 1. С. 122–128.

2. Тронов В. А., Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Ванин А. Ф. Генотоксичность нитропрусида как донора катиона нитрозония. *Биофизика*. 2025. Т. 70, № 4. С. 749–756.

3. Тронов В. А., Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Ванин А. Ф. Генотоксическое действие нитропрусида на спленоциты мышей *in vivo*. Поклеточный ДНК-кометный анализ. *Биофизика*. 2027. Т. 72, № 1.

4. Ванин А. Ф., Трифонова Н. Е., Тронов В. А., Шумаев К. Б., Ткачев Н. А., Микоян В. Д. Цитотоксичность нитропрусида при физиологических значениях pH определяется не анионами цианида, входящими в его состав, а катионом нитрозония (Обзор). *Биофизика*. 2026. Т. 71, № 6.

Тезисы докладов

А) Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Тронов В. А. Генотоксическое и цитотоксическое действие доноров оксида азота: ДНКЖ с меркаптосукцинатом, нитрозомеркаптосукцината; и донора катионов нитрозония, Na-нитропруссид, на клетки MCF-7/Биофизика, С. 415-417, 2023. DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-217

Б) Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Тронов В. А., Ванин А. Ф. Снижение количества молекул NO^+ в системе понижает цито- и генотоксичность Na-нитропруссид при восстановлении дитионитом Na на культуре клеток MCF-7/Биофизика, С. 334-336, 2024. DOI 10.25205/978-5-4437-1691-6 ISBN 978-5-4437-1691-6

В) Трифонова Н. Е., Тронов В. А., Некрасова Е. И., Ванин А. Ф. Генотоксичность нитропруссид как донора катионов нитрозония, анализ ДНК-комет на спленоцитах мыши *in vivo*/Биофизика, 2026.

Личный вклад автора

Результаты диссертационного исследования получены соискателем самостоятельно или при его непосредственном участии. Выбор темы, постановка целей и задач, планирование экспериментов, а также обсуждение полученных данных проводились совместно с научным руководителем, д.б.н., профессором А. Ф. Ваниным, и старшим научным сотрудником, д.б.н. В. А. Троновым.

Автором лично выполнен анализ литературных источников, разработан метод количественной оценки повреждений ДНК в клетках, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, осуществлён весь объём экспериментальных работ (за исключением регистрации спектров ЭПР, проведённой к.б.н. В. Д. Микояном), проведены обработка и интерпретация результатов, сформулированы выводы, подготовлены научные публикации и рукопись диссертации.

Приготовление образцов для ЭПР-спектроскопии, включая растворы исследуемых препаратов в различных буферных системах, контрольные и обработанные клеточные суспензии, а также образцы селезёнки, полученные от экспериментальных животных, производилось автором лично. Регистрация спектров методом ЭПР выполнена ведущим научным сотрудником, канд. хим. наук В. Д. Микояном.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на **94 страницах**, содержит **24 рисунка, 8 таблиц, 3 схемы и приложение**. Список литературы включает **172 источника**. Работа состоит из следующих разделов: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты экспериментов, обсуждение полученных результатов, основные результаты и выводы, заключение, список сокращений, список литературы и приложение.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Оксид азота (NO) как один из универсальных регуляторов биологических процессов

1.1.1. Двойственная роль NO в биологических системах

Оксид азота (NO) представляет собой уникальную молекулу, сочетающую свойства газообразного свободного радикала и универсального регулятора биологических процессов. Благодаря высокой диффузионной способности, сопоставимой с диффузией кислорода [37; 38], NO легко проникает через биологические мембраны и способен оказывать воздействие на клетки-мишени, удалённые от места синтеза.

Длительное время NO рассматривали исключительно как токсичный компонент выхлопных газов. Перелом в понимании его биологической роли наступил во второй половине XX века, когда были открыты эндогенные источники этого радикала. Ключевой вклад внесли исследования Р. Ф. Ферчготта, описавшего эндотелий-зависимое расслабление сосудов [39; 40]; Ф. Мурада, установившего активацию гуанилатциклазы нитропруссидом через высвобождение NO [41]; и Л. Дж. Игнарро, идентифицировавшего EDRF как NO [42; 43]. В 1998 г. эти учёные были удостоены Нобелевской премии [44]. Параллельно А. Ф. Ванин с сотрудниками разработал физико-химические основы биологии NO, впервые зарегистрировав его в живых клетках методом ЭПР и охарактеризовав динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) как форму стабилизации и транспорта NO [45-47].

При физиологических концентрациях NO выступает в наномолярном диапазоне регулятором сосудистого гомеостаза и нейротрансмиссии, а в микромолярном диапазоне модулятором иммунных реакций. Избыточная продукция NO в условиях воспаления или при использовании экзогенных доноров в микромолярном диапазоне приводит к цитотоксическим эффектам. Особое место

среди цитотоксических производных занимает катион нитрозония (NO^+) – электрофильная форма оксида азота, образующаяся при окислении NO или разложении некоторых доноров, в частности нитропруссид натрия. Долгое время цитотоксичность нитропрussa связывали с высвобождением цианид-анионов, однако исследования последних лет показали, что при физиологическом pH именно NO^+ ответствен за повреждение ДНК, индукцию апоптоза и подавление роста микроорганизмов [20; 23; 27; 29; 30]. Это открытие стимулировало поиск новых доноров NO^+ для терапии инфекционных и онкологических заболеваний.

1.1.2. Биосинтез и физиологическая роль NO в организме

Эндогенный синтез NO осуществляется семейством NO-синтаз (NOS), превращающих L-аргинин в L-цитруллин с потреблением НАДФН и O_2 [43; 48; 49]. Выделяют три изоформы. Эндотелиальная (eNOS, NOS3) – кальций-зависимый фермент, постоянно экспрессируемый в эндотелии; генерирует наномолярные концентрации NO, поддерживая базальный сосудистый тонус, подавляя агрегацию тромбоцитов и пролиферацию гладкомышечных клеток [50-52]. Нейрональная (nNOS, NOS1) также кальций-зависима, локализована в нейронах; NO выполняет функцию нейромедиатора и участвует в синаптической пластичности [53; 54]. Индуцибельная (iNOS, NOS2) кальций-независима; её экспрессия резко возрастает в макрофагах, нейтрофилах, гепатоцитах под действием провоспалительных цитокинов и бактериальных липополисахаридов. iNOS генерирует микромолярные концентрации NO, определяя его цитотоксические и защитные эффекты [9; 50; 51; 55].

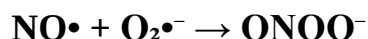
В нормальных физиологических условиях NO – универсальный регулятор. Его вазодилатирующее действие: диффундируя из эндотелия к гладкомышечным клеткам, NO активирует растворимую гуанилатциклазу, повышает уровень цГМФ и вызывает расслабление сосудов [41; 42; 51]. NO также подавляет адгезию и агрегацию тромбоцитов, участвует в моторике ЖКТ и бронхов [51; 56; 57],

модулирует высвобождение нейромедиаторов, процессы обучения и памяти [45; 53; 54], а также обеспечивает эректильную функцию [48; 53].

Баланс NO является довольно хрупким. Дефицит ассоциирован с гипертензией, атеросклерозом, диабетом [9; 10; 56; 58], а избыточная продукция в очагах воспаления превращает NO в цитотоксический фактор. Этот переход реализуется преимущественно через образование катиона нитрозония [1; 20; 23; 29].

1.1.3. Цитотоксические эффекты катионов нитрозония (NO^+)

При активации iNOS концентрация NO может достигать микромолярных уровней, реализуя цитотоксические свойства. Традиционно основным механизмом считали образование пероксинитрита (ONOO^-) в реакции NO с супероксид-анионом ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [59-61]:



Пероксинитрит и продукты его распада ($\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{NO}_2$) способны окислять тиолы, инициировать перекисное окисление липидов и вызывать разрывы ДНК [60; 62; 63]. Обзор, представленный в работе Liu и соавт. [64] обобщает данные о генотоксичности NO. Однако накопленные данные свидетельствуют, что основным цитотоксическим агентом доноров NO является не пероксинитрит и не радикал $\text{NO}^\bullet$, а катион нитрозония (NO^+) [20; 23; 27; 29; 30].

Нитропруссид натрия – классический донор NO, применяемый для управляемой гипотензии и лечения острой сердечной недостаточности [15; 16]. Его цитотоксичность долгое время ошибочно приписывали цианид-ионам. Работами А. Ф. Ванина с соавт. убедительно показано, что при pH 7,4 цитотоксичность нитропрусида обусловлена именно NO^+ , высвобождающегося из этого соединения, а не CN^- [20; 23]. Аналогичный вывод сделан для ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами – природных резервуаров NO: их цитотоксическое и генотоксическое действие на опухолевые клетки (MCF-7, Jurkat) и бактерии *E. coli* опосредовано высвобождением NO^+ , а не нейтрального $\text{NO}^\bullet$ [14; 26; 29; 30; 36].

NO^+ – сильный электрофил, способный нитрозировать нуклеофильные группы биомолекул (тиолы, аминогруппы, гидроксилы) [27; 55]. Это приводит к инактивации ферментов дыхательной цепи и репарации ДНК, образованию S-нитрозотиолов и нитрозаминов, повреждению ДНК (одно- и двунитевые разрывы, регистрируемые методом ДНК-комет) [21; 22; 24; 25] и запуску апоптоза по митохондриальному пути [14; 26; 36].

Антимикробное действие доноров NO реализуется через генерацию NO^+ . Показано подавление роста широкого спектра бактерий, включая метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA), разрушение биоплёнок и ингибирование системы межклеточной коммуникации бактерий (quorum sensing) [3; 5-7; 30]. Для *Pseudomonas aeruginosa* установлено нарушение регуляции формирования биоплёнок [31].

Противовирусная активность NO^+ приобрела особую актуальность в свете пандемии COVID-19. Ингаляции растворов ДНКЖ на сирийских хомячках снижали вирусную нагрузку SARS-CoV-2 в лёгких и уменьшали воспаление [32; 33]. Механизмы включают S-нитрозирование спайкового белка и вирусной протеазы, блокирующее проникновение и репликацию. Аналогичная активность показана для вирусов гриппа, ВИЧ, герпеса и гепатита В [32].

Противоопухолевое действие NO^+ индуцирует апоптоз в клетках аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, лейкозных клетках (Jurkat) и других линиях, преодолевая гиперэкспрессию Bcl-2 [26; 29; 36]. Доноры NO^+ способны нормализовать опухолевую сосудистую сеть и улучшать перфузию, повышая эффективность химио- и радиотерапии [13].

Таким образом, катион нитрозония следует рассматривать как основной эффектор цитотоксичности нитропрусида натрия и эндогенных ДНКЖ, что обосновывает детальное изучение механизмов его образования, стабилизации и взаимодействия с биомолекулами.

1.2. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами в живых организмах

1.2.1. Общие характеристики динитрозильных комплексов железа и механизмы их образования

В настоящее время установлено, что в тканях животных и бактериях, производящих ферментативным путём оксид азота, подавляющая часть последнего включается в динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами (ДНКЖ-RS) в мооядерной (М-ДНКЖ-RS) и биядерной (Б-ДНКЖ-RS) формах, характеризующихся соответственно формулами $[(RS^-)_2Fe(NO)_2]$ и $[(RS^-)_2Fe_2(NO)_4]$. Механизм образования М-ДНКЖ-RS, предложенный А.Ф. Ваниным [65] и приведенный на схеме 1, начинается со связывания молекул NO с ионами двухвалентного слабосвязанного («свободного») железа (попарно с одним ионом), с последующим включением в этот аддукт сначала низкомолекулярных, а затем белковых тиоловых групп. В соответствии со схемой 1, решающей стадией в процессе образования этих комплексов является реакция диспропорционирования молекул NO в железо-динитрозильных фрагментах этих комплексов, приводящая к появлению в них катиона нитрозония и аниона нитроксила (NO^+). Реакция последнего в водной среде с протоном приводит к превращению этого аниона в нейтральную молекулу нитроксила, выходящую из состава ДНКЖ с последующим включением в освободившееся место молекулы NO. Что касается катиона нитрозония его возможное связывание в воде с анионом гидроксила (OH^-) предотвращается поступлением на NO^+ электронной плотности с атомов серы, входящих в состав тиол-содержащих лигандов. В результате положительный заряд на катионном нитрозильном лиганде ДНКЖ нейтрализуется, что и блокирует связывание NO^+ с OH^- , так что в итоге образующийся М-ДНКЖ начинает характеризоваться резонансной структурой $[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$. Таким образом

в процесс образования одного М-ДНКЖ включаются три молекулы NO, из которых только две сохраняются в этом комплексе, причём одна в молекулярной форме, а другая в форме NO⁺ [65].

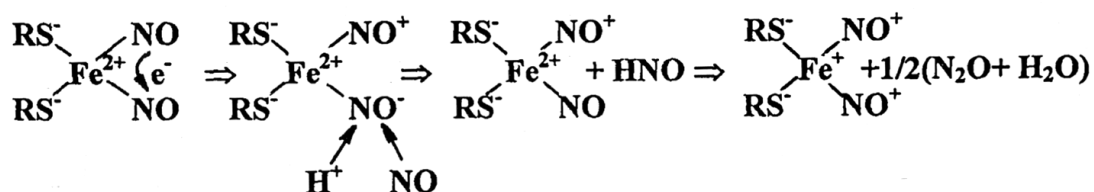


Схема 1 – Механизм образования М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в реакции Fe²⁺, NO и тиол-содержащих соединений [1]

Механизм диспропорционирования NO с образованием NO⁺ в составе ДНКЖ детально рассмотрен в работах [66; 67].

Фактически, в результате реакции диспропорционирования молекул NO в ДНКЖ происходит одноэлектронное самоокисление этого комплекса с переходом из диамагнитного состояния, характеризующегося чётным числом электронов, равным 8, на разрыхляющих молекулярных орбиталях (МО) комплекса, которое можно описать как состояние с d⁸ электронной конфигурацией железа, в состояние с d⁷ электронной конфигурацией железа с нечётным («парамагнитным») числом электронов на верхних МО. В этом состоянии комплекс даёт сигнал ЭПР с g_{ср.}=2,03, регистрация которого в работе [45], и привела к открытию М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами сначала в дрожжах (рисунок 1), а затем и в тканях животных (рисунок 2). В работах [68-71] были детально исследованы парамагнитные свойства нитрозильных комплексов железа и их связь с биологическими эффектами.

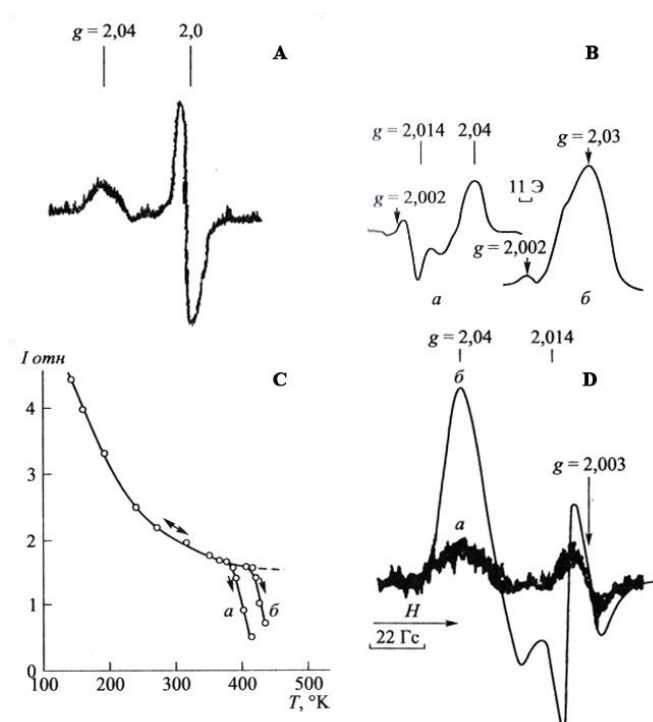


Рисунок 1 – Результаты первых ЭПР-исследований М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, обнаруженных в дрожжевых клетках. А- первая запись сигнала 2,0-3 в дрожжах в виде низкополевой компоненты [65]; В- запись сигнала 2,03 в дрожжах полностью (в виде первой производной ЭПР поглощения и его интегральной формы) [45]; С- температурная зависимость интенсивности сигнала 2,03 в дрожжах (описывается законом Кюри для парамагнетиков; D- запись сигнала 2,03 во влажных (а) и высушенных (б) дрожжах) [45]

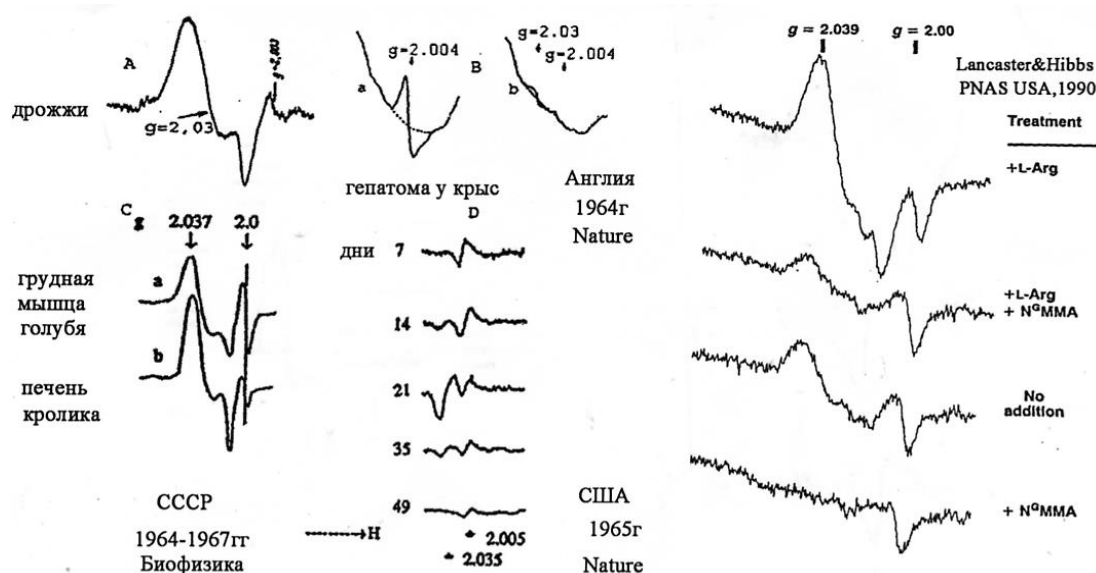


Рисунок 2 – Первая регистрация сигнала 2,03 в замороженных влажных дрожжах (А), тканях голубя и кролика (С), в печени крыс, подвергнутых действию гепатоканцерогенов (В, D) и активированных макрофагах крыс (правая панель. Сигналы 2,03 на рисунке 2 А, В, С и правой панели зарегистрированы при 77К, сигнал на рисунке D – при комнатной температуре [1; 68; 72; 73]

Возможен и второй, приведенный на схеме 2, механизм образования М- и Б-ДНКЖ— при участии вместо молекул NO молекул S-нитрозотиолов ($\text{RS}^- \text{-NO}^+$):

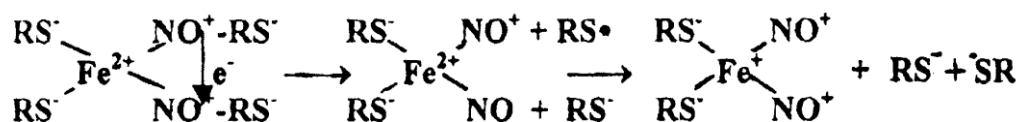


Схема 2 – Механизм образования М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами при участии Fe^{2+} , S-нитрозотиолов и тиол-содержащих соединений [74]

Как и в схеме 1, решающей стадией в образовании М-ДНКЖ является реакция диспропорционирования попарно связывающихся с Fe^{2+} молекул S-нитрозотиолов. В результате этой реакции происходит распад последних с сохранением в составе комплексов NO и NO^+ и выходом тиильного радикала и молекулы тиола в раствор.

Что касается образования биядерной формы этих комплексов (Б-ДНКЖ), она возникает в результате димеризации М-ДНКЖ, инициируемой снижением уровня тиоловых групп и степени ионизации последних. При этом резонансная структура Б-ДНКЖ характеризуется, как и в М-ДНКЖ, наличием в равном соотношении молекулярной и катионной форм NO, т.е. представляется как $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}_2^{2+}(\text{NO})_2(\text{NO}^+)_2]$. При этом несмотря на парамагнетизм железо-динитрозильных фрагментов в Б-ДНКЖ с d^7 электронной конфигурацией железа, в целом эти комплексы диамагнитны (ЭПР-неактивны) из-за спинового спаривания этих фрагментов через посредство атомов серы, выступающих в качестве мостиков, связывающих в Б-ДНКЖ их железо-динитрозильные фрагменты.

Диамагнетизм Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами долгое время не позволял обнаружить их появление в живых организмах, продуцирующих эндогенный NO. Говорить об этом стали лишь после того, как проф. А.Ф. Ваниным было показано, что сигнал 2,03, зарегистрированный им и Р.М. Налбандяном сначала в дрожжах, а затем в тканях животных обусловлен М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами [45; 46; 68; 75; 76]. Этот результат стимулировал интерес

к такого рода комплексам, которые, как оказалось, легко было синтезировать химическим путём и изучать их водные растворы не только используя метод ЭПР, но и оптические методы. Наряду с М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, образующимися в растворах Fe^{2+} и тиолов при их обработке оксидом азота, в этих растворах возникают ещё и их биядерные аналоги, легко идентифицируемые по характерному для них спектру оптического поглощения со сравнительно интенсивными полосами на 310 и 360 нм (рисунок 3) [77; 78]. В растворах при нейтральных значениях рН из-за слабой ионизации тиоловых групп в большинстве тиол-содержащих лигандов в ДНКЖ доминирует биядерная форма этих комплексов. Она обратимо переходит в М-форму только при повышении рН, обеспечивающих ионизацию тиоловых групп, что необходимо для их включения в М-ДНКЖ.

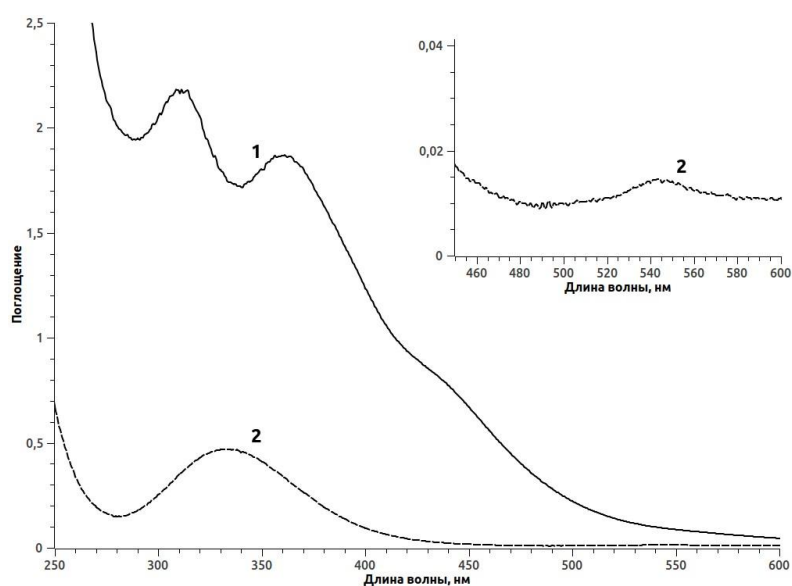


Рисунок 3 – Спектры поглощения Б-ДНКЖ-MS (1) и MS-NO (2). На врезке демонстрируется слабое оптическое поглощение MS-NO в области 540 нм [68]

Доминирование Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами (в основном, белковой природы) над их моноядерными аналогами, характерно и для тканей животных. Этот результат был получен в работе [79] после того, как удалось показать, что при обработке тканей животных *in vivo* и *in vitro* диэтилдитокарбаматом (ДЭТК) Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами распадаются с образованием ЭПР-активных мононитрозильных комплексов железа

(МНКЖ) с ДЭТК. Происходит это в результате перехода железомононитрозильной группы из железо-динитрозильного фрагмента в Б-ДНКЖ на две молекулы ДЭТК (рисунок 4).

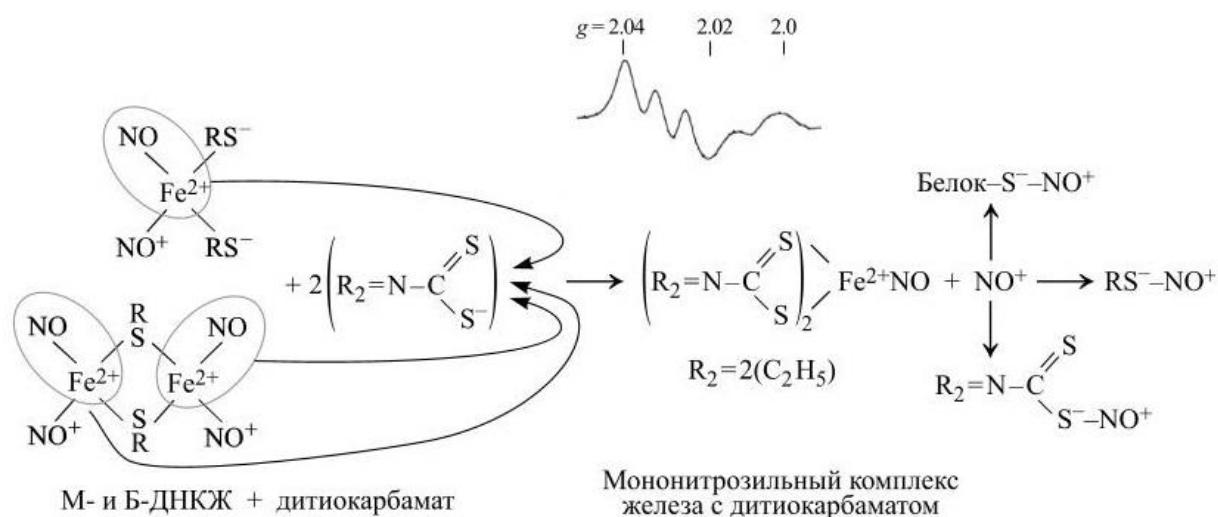


Рисунок 4 – Механизм превращения М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с производными дитиокарбамата. Высвобождающиеся при этом катионы нитрозония могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе дитиокарбамата. Наверху приводится зарегистрированный при 77 К сигнал ЭПР со значениями g-фактора 2.04 и 2.02 и триплетной сверхтонкой структурой, характерный для МНКЖ с дитиокарбаматом [1; 29; 30]

Количественная оценка концентрации возникающих в тканях животных (в основном в печени) МНКЖ-ДЭТК, показала, что в печени, концентрация Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в 4-5 раз превосходит уровень возникающих в печени мооядерных аналогов Б-ДНКЖ [79].

1.2.2. ДНКЖ как доноры катионов нитрозония

Как следует из приведённых выше механизмов образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами реакция диспропорционирования молекул NO и S-нитрозотиолов на первой стадиях этого процесса определяет включение М-ДНКЖ в качестве нитрозильных лигандов как нейтральной молекулы NO, так и катиона нитрозония. Как М-ДНКЖ, так и Б-ДНКЖ могут выступать в качестве доноров как

NO, что является общепризнанным фактом, так и донорами NO⁺, что показано в лаборатории проф. А.Ф. Ванина.

Следующие результаты, полученные в нашей лаборатории, согласуются с этим предположением. Наиболее показательными в этом отношении нам представляются результаты изучения трансформации Б-ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином (Б-ДНКЖ-НАС) в S-нитрозо-НАС, приводимые в [27]. В соответствии с химическим равновесием Б-ДНКЖ-НАС, характеризуемого резонансной структурой [(RS⁻)₂Fe₂²⁺(NO)₂(NO⁺)₂], это равновесие описывается как показано на схеме 3:

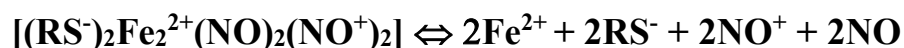


Схема 3 – Химическое равновесие между Б-ДНКЖ-НАС и его составными компонентами

Описанный механизм высвобождения NO⁺ из ДНКЖ предложен в [80]. Очевидно, что при распаде этих комплексов, например, вызванных подкислением их раствора до pH 1-2 и тем самым протонированием тиоловой группы в НАС, с последующим выходом этого лиганда из Б-ДНКЖ- НАС, высвобождающиеся при этом катионы нитрозирования могут связываться с НАС с образованием S-нитрозо-НАС. Такое превращение, как это показано на рисунке 5, действительно было обнаружено по изменению оптического спектра Б-ДНКЖ-НАС: спектр с полосами на 310нм и 360 нм трансформировался в анаэробных условиях при подкислении раствора Б-ДНКЖ- НАС и его прогреве до 80 °С (для ускорения протонирования НАС) в спектр с полосами на 334 и 543 нм, характерный для S-нитрозо-НАС. Такое изменение обнаруживалось лишь при небольших концентрациях свободного НАС (не включённого в Б-ДНКЖ-НАС) по сравнению с концентрацией самого комплекса. При высоких соотношения (более 10) аналогичная процедура приводила к исчезновению Б-ДНКЖ-НАС: без его превращения в S-нитрозо-НАС. Дополнительные измерения показали, что при избытке свободного НАС он начинал восстанавливать NO⁺ до NO [81].

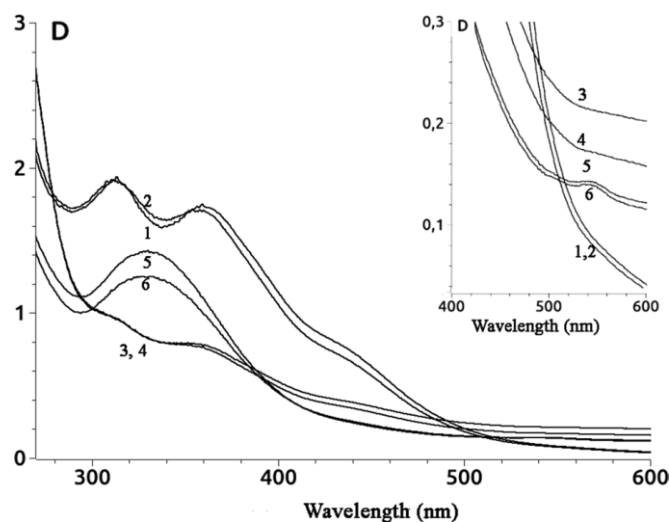


Рисунок 5 – Спектры поглощения 0,5 мМ растворов Б-ДНКЖ-НАС, содержащих 2,0 и 0,5 мМ свободного НАС (кривые 1 и 2). Кривые 3-6 — спектры поглощения 2,0 мМ растворов тех же комплексов, содержащих 8,0 мМ (кривые 3 и 4) или 2,0 мМ свободного НАС, подвергнутых нагреванию при 80 °С при pH 1-2 в анаэробных условиях в течение 7-9 минут (кривые 5 и 6); Эти растворы перед оптическими измерениями разбавлены в 4 раза (до 0,5 мМ исходного Б-ДНКЖ-НАС [77]. Коэффициенты экстинкции Б-ДНКЖ-НАС: и S-нитрозо-НАС для полос соответственно на 360 и 334 нм равны 3700 в пересчёте на один атом железа в S-нитрозо-НАС и $0,94 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [1; 81]

О наличии NO^+ в составе М- и Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами говорит и результат образования МНКЖ-ДЭТК при воздействии на М- и Б-ДНКЖ производных дитиокарбамата, в частности ДЭТК. Дело в том, что как показано на рисунке 4, дитиокарбаматы отбирают на себя из динитрозильного фрагмента железа мононитрозильную группу железа, включающую в себя нейтральную молекулу NO , что и обеспечивает парамагнетизм образующегося МНКЖ с дитиокарбаматом с d^7 электронной конфигурацией железа (сигнал ЭПР этого комплекса приведен на рисунке 4).

Что касается второго нитрозильного лиганда в динитрозильных фрагментах М- и Б-ДНКЖ, представленного катионом нитрозония, он как было показано на рисунке 4, высвобождается из этих комплексов с тем, чтобы связаться с тиоловой группой низко- и высокомолекулярных соединений с образованием, соответствующих S-нитрозотиолов [81]. Это образование и приводит, как полагают мой руководитель с сотрудниками к проявлению цитотоксического действия М- и Б-ДНКЖ как доноров катионов нитрозония. Этот эффект рассматривается в следующем параграфе.

1.2.3. Цитотоксическое действие катионов нитрозония, донируемых ДНКЖ с тиол-содержащими лигандам

Впервые цитотоксическое действие ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами как донорами катионов нитрозония было показано в работе [26] в экспериментах на культуре опухолевых клеток Jurkat. Введение в среду инкубации этих клеток М-ДНКЖ с тиосульфатом, как представителем тиол-содержащих соединений (формула $[-S-SO_3^-]$) приводило к апоптотической гибели клеток, усиливавшейся по мере повышения концентрации М-ДНКЖ. Добавление одного из производных дитиокарбамата — N-метил-D-глюкаминди тиокарбамата (МГД) не влияло на этот процесс. Поскольку методом ЭПР наблюдалось полная трансформация М-ДНКЖ с тиосульфатом в МНКЖ-МГД, был сделан вывод, что клетки погибали из-за токсического действия на них катионов нитрозония, высвобождавшихся из М-ДНКЖ с тиосульфатом в соответствии с превращениями, показанными на рисунке 6, а не нейтральными молекулами NO, которые в присутствии МГД должны были включаться в стойкие МНКЖ-МГД и тем самым «выходить из игры».

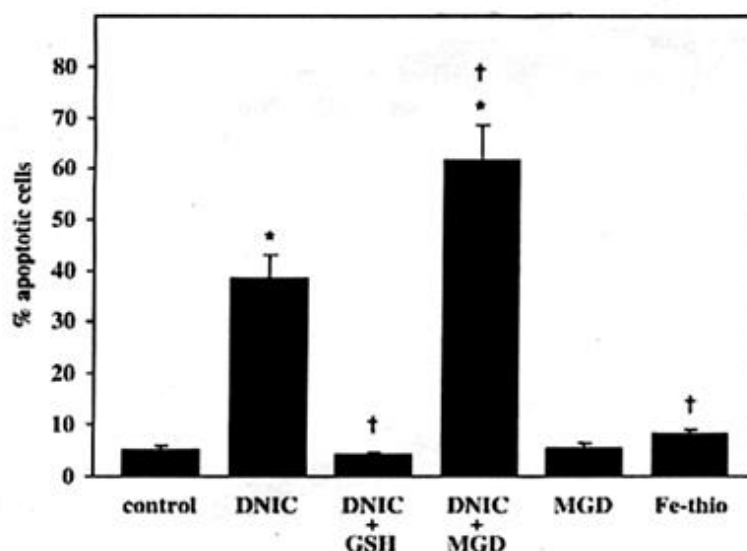


Рисунок 6 – Влияние ДНКЖ с тиосульфатом (100 мкмоль) и МГД (20 мкмоль) на развитие апоптоза в клетках Jurkat [1; 26]

Характерно, что как показано на рисунке 6, обработка клеток М-ДНКЖ + МГД, усиливала цитотоксическое действие М-ДНКЖ, очевидно, из-за полного превращения этого комплекса в МНКЖ-МГД, приводившего к высвобождению из М-ДНКЖ всех входивших в него катионов нитрозония.

Такой же эффект МГД оказывал на культуру опухолевых клеток MCF-7 в присутствии Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (MS) [29], приведенный на рисунке 7.

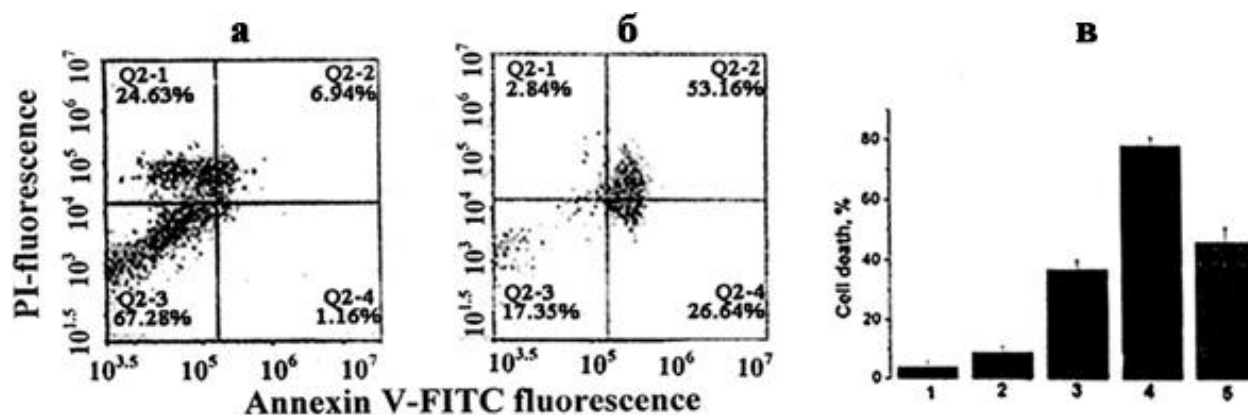


Рисунок 7 – 2D-диаграммы, полученные методом проточной цитофлуорометрии клеточной культуры, характеризующей степень апоптоза клеток (по флуоресценции аннексина V-FITC и степень некроза — по флуоресценции пропидия йодида. Клетки инкубировали или только с Б-ДНКЖ-MS (0,5 мМ) (а) или смесью Б-ДНКЖ-MS+МГД (1,0 мМ) (б). (в) — Гибель клеток в %ном отношении: столбик 1 — контроль; столбик 2 — инкубация с Б-ДНКЖ-MS; столбик 3 — инкубация с МГД; столбик 4 — инкубация с о смесью Б-ДНКЖ-MS + МГД; столбик 5 - сумма эффектов Б-ДНКЖ-MS и МГД (столбики 2 + 3) при отсутствии взаимодействия между ними [1; 29]

Как следует из рисунка 7 (а и б), % клеток, подвергшихся апоптозу, резко повышался при инкубации клеток с Б-ДНКЖ-MS + МГД (квадранты Q2-2 и Q2-4), достигая 80%, как это дополнительно показано на рисунке 7 (в).

Аналогичные результаты были получены в работе А.Ф. Ванина и соавт. [30] при изучении влияния Б-ДНКЖ с глутатионом + ДЭТК на интактность бактерий *Escherichia coli* TN530 (их интактность оценивалась по колониеобразующей активности).

Таким образом, факт резкого усиления цитотоксического действия М- и Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами под влиянием производных дитиокарбамата, вызывавших полный распад этих комплексов с высвобождением из них катионов нитрозония, убедительно показал, что именно эти агенты, а не молекулы NO, входившие в состав ДНКЖ, обеспечивали цитотоксическое действие этих комплексов.

1.2.4. Генотоксическое действие ДНКЖ-MS на клетки MCF-7

В работе А.В. Тронова с соавт. [36] методом щелочных комет показано, что смесь тиол-содержащего соединения - меркаптосукцината и ионов Fe^{2+} ($\text{MS} + \text{Fe}^{2+}$) индуцировала в культуре опухолевых клеток MCF-7 через 5 часов одностранные разрывы (ОР) ДНК, которые полностью репарировались через 24 часа. Иной результат был получен при обработке клеток Б-ДНКЖ с тем же тиол-содержащим соединением (Б-ДНКЖ-MS): хотя в этом случае ОР было меньше, часть этих разрывов сохранялась в 19% клеток спустя 24 часа. В свою очередь метод нейтральных комет показал, что это сохранение было обусловлено способностью Б-ДНКЖ-MS инициировать трансформацию ОР ДНК в летальные двустранные разрывы (ДР) в этой молекуле. Обнаруженная корреляция этой генотоксичности и цитотоксичности, определённой по МТТ-тесту, позволяет предполагать, что токсичность использованных Б-ДНКЖ-MS частично может быть обусловлена возникающими под действием этих комплексов ДР ДНК.

1.2.5. Устойчивость Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами и их способность высвобождать катионы нитрозония

Исследования, проведённые в лаборатории А.Ф. Ванина, показали, что стабильность Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, т. е. их устойчивость в кислотной среде, устойчивость к окислительному действию кислорода и к действию тиоловых реагентов в первую очередь определяется природой тиол-содержащих соединений, как входящих в Б-ДНКЖ в качестве лигандов, так и не входящих в эти комплексы, а представленных в свободной форме в водном растворе ДНКЖ. В этом отношении, наиболее устойчивыми (из не оказывающих токсического действия на живые организмы) оказались Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) и Б-ДНКЖ-NAC [77; 78]. Эти комплексы даже в сильно кислой среде (при $\text{pH} = 1,0\text{-}2,0$) сохранялись без заметного распада в течение часа вне зависимости от соотношения концентрации Б-ДНКЖ и концентрации свободных тиолов, т. е. тиолов, не входящих в состав Б-ДНКЖ. Быстрый распад этих комплексов в кислотной среде начинался только при прогреве их раствора при $80\text{-}70\text{ }^{\circ}\text{C}$, причём при низком соотношении концентраций свободных тиолов и Б-ДНКЖ. При соотношении 2:1 Б-ДНКЖ на воздухе полностью распадались примерно за минуту. При повышении этого соотношения до 4 и выше время распада повышалось до десятка минут. При проведении аналогичной процедуры с растворами Б-ДНКЖ-GSH и Б-ДНКЖ-NAC в анаэробных условиях время распада этих комплексов существенно повышалось, что свидетельствует о том, что этот распад мог инициироваться не только протонированием тиоловых групп, но и их окислением кислородом воздуха [77; 78].

Характерно, что при соотношении концентрации свободных тиолов и Б-ДНКЖ равном 2 и более распад Б-ДНКЖ в кислой среде даже при прогреве раствора при $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ не приводил к высвобождению из Б-ДНКЖ катионов нитрозония, идентифицируемым по образованию ими S-нитрозотиолов, как это иллюстрируется на рисунке 1 для Б-ДНКЖ-NAC. Как указано выше, вместо

включения в S-нитрозотиолы, катионы нитрозония восстанавливались свободными тиолами до молекулярной формы NO. Такого превращения не имело места при соотношении свободных тиолов и Б-ДНКЖ равным 1 и менее как для Б-ДНКЖ-NAC, так и для Б-ДНКЖ-GSH.

В соответствии с результатами одной из последних работ А.Ф. Ванина [78] наименее устойчивыми, чем Б-ДНКЖ-NAC и Б-ДНКЖ-GSH, среди не оказывающих токсического действия на живые организмы Б-ДНКЖ, оказались Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-MS) и особенно Б-ДНКЖ с цистеином (Б-ДНКЖ-CYS) [78]. При подкислении растворов этих комплексов до pH 1-2 как на воздухе, так и в анаэробных условиях наблюдалось появление оптических полос на 334 и 543 нм, характерных для S-нитрозоцистеина и S-нитрозомеркаптосукцината без нагревания их растворов — при комнатной температуре (такого рода спектр, характерный для S-нитрозомеркаптосукцината приведен на рисунке 3). При этом в анаэробных условиях превращение S-нитрозотиолов имело место только при соотношении свободного тиола и Б-ДНКЖ равным не более 1. В аэробных условиях, из-за быстрого окисления тиолов кислородом воздуха, образование соответствующих S-нитрозотиолов происходило и при более высоких соотношения свободных тиолов и Б-ДНКЖ.

1.2.6. Биологическое действие Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами как доноров NO и NO⁺

К настоящему времени получены многочисленные данные, свидетельствующие о разнообразных проявлениях биологического действия экзогенных Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами как соединений, активирующих биологические процессы, так и способных подавлять различные патологии в организме животных и человека, в растениях и бактериях. В качестве активаторов биологических процессов эти комплексы выступают благодаря их способности высвобождать молекулы NO, воздействующих на эти процессы через

посредство гуанилатциклазы, активация которой молекулами NO и приводит, как правило, к активации разнообразных физиологических и биохимических процессов в живых организмах, показанных в таблице 1. Из-за высокого сродства гуанилатциклазы как гем-содержащего белка к молекулам NO активация этого фермента происходит в наномолярных стационарных концентрациях NO, при которых имеющийся в тканях животных и человека кислород не окисляет молекулы NO, высвободившиеся из Б-ДНКЖ, позволяя им свободно диффундировать клетках и тканях, достигая мишени их действия — молекул гуанилатциклазы.

№	Эффект
1	Мощное вазодилаторное и гипотензивное действие [70; 73; 82-84]
2	Эффективное ранозаживляющее действие [85]
3	Блокирование агрегации тромбоцитов (тромбоза) [86]
4	Повышение эластичности эритроцитов [87]
5	Повышение выживаемости животных при значительных кровопотерях [88]
6	Мощная пенил-эректильная активность [89]
7	Анти-апоптозное действие на клеточные культуры [90]
8	Активация / подавление активности ряда генов [91-94]
9	Защита миелиновой оболочки нейронов при воспалительных процессах в мозгу [95]
10	Активация синтеза стрессорных белков [96]
11	Антиоксидантное действие [97]
12	Разрушительное действие на электрон-транспортные железосерные белки [98]
13	Регуляция входа и выхода железа из клеток [99]
14	Инициирование остео- и ангиогенеза [100]
15	Уменьшение некротической зоны при экспериментальном инфаркте миокарда [101]
16	Подавление токсического действия амилоидов на нейроны [102]
17	Блокирование фиброзного перерождения тканей почек [103]
18	Ингибирование глутатион-S-трансферазы [104]
19	Усиление когнитивной способности животных [105]

20	Стимуляция усвоения железа при заболевании пшеницы ржой [106]
21	Подавление «чувства» кворума у бактерий [107]

Таблица 1 – Примеры позитивного, регуляторного действия ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами на живые организмы

Иная ситуация реализуется при действии Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами как донорами NO^+ , способными подавлять различные патологические процессы, примеры которого приведены в таблице 2. В этом случае акт донирования катионов нитрозония не следует рассматривать как высвобождение этих катионов из Б-ДНКЖ, т. е. как их выход из Б-ДНКЖ в свободном состоянии. Как известно, катионы нитрозония в водной среде быстро гидролизуются, трансформируясь после связывания с анионами гидроксила в анионы нитрита (при сохранении в водной среде pH при нейтральных значениях). Поэтому Б-ДНКЖ должны передавать катионы нитрозония на мишени их действия непосредственно, по механизму S-транснаитрозирования. Механизм этого переноса остаётся пока неизученным.

№	Эффект
1	Подавление пролиферации опухолевых клеток Jurkat в культуре [26]
2	Подавление пролиферации опухолевых клеток MCF-7 в культуре [73]
3	Подавление пролиферации эндометриом у крыс при экспериментальном эндометриозе [108]
4	Подавление пролиферации перевивной опухоли – саркомы Льюиса в организме мышей [109]
5	Подавление репликации вируса SARS-CoV-2 в организме сирийских хомячков [33; 110]
6	Подавление пролиферации бактерий <i>Escherichia coli</i> [82]

Таблица 2 – Примеры токсического действия ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами как доноров катионов нитрозония на различные биообъекты

1.2.7. Образование М-ДНКЖ и Б- ДНКЖ в живых организмах как защитная реакция от окисления кислородом оксида азота

В настоящее время в литературе практически не обсуждается вопрос о возможности окисления эндогенного NO кислородом, поддерживаемом в тканях животных и человека оксигенированным гемоглобином на уровне, соответствующем 20-40 мм рт.ст. (1-5 мМ на кг ткани). Предполагается, что при стационарной наномолярной концентрации молекулярного NO, при которой он при посредстве гем-содержащего фермента — гуанилатциклазы оказывает разнообразное биологическое действие, приводимое в таблице 1, кислород как окислитель NO, из-за медленного его окисления практически не влияет на его уровень в клетках и тканях, не препятствуя его реакции с гуанилатциклазой. Действительно, если использовать взятый из монографии одного из классиков химии оксидов азота Д. Вильямса коэффициент в формуле скорости окисления NO кислородом в водной фазе: $V=k[\text{NO}]^2[\text{O}_2]$ $k=6 \times 10^6 \text{М}^{-1}\text{сек}^{-1}$ [111], то при концентрации NO, равной 100 нМ, получаем, что за первую секунду реакции будет окислено лишь 10^{-2} нМ NO.

Обратная ситуация реализуется для той же реакции в микромолярной концентрации NO, характерной для тканей животных и человека при активации индуцибельной NOS, т. е. в условиях активации клеточного иммунитета, при котором оксид азота начинает функционировать в качестве одного из его эффекторов. При стационарной концентрации NO, равной 100 мкмоль, в соответствии с вышеприведённой формулой за первую секунду в диоксид азота превратится весь имеющийся в ткани NO (100 мкмоль), т. е. его концентрация снизится до наномолярного уровня, при котором NO не способен функционировать в качестве эффектора клеточного иммунитета.

В соответствии с механизмами трёхмолекулярного окисления NO кислородом по реакции $2\text{NO} + \text{O}_2 = 2\text{NO}_2$ в книге Д. Вильямса [111] приводятся два

возможных варианта трёх стадий этого процесса. Первый вариант с начальной стадией окисления NO кислородом до свободного радикала пероксинитрита с последующим присоединением к нему второй молекулы NO с образованием соединения **O-N-O-O-N-O** распадающегося на две молекулы диоксида азота, невозможен из-за нарушения равенства суммарного спина реагентов и продуктов реакции в первой стадии этого варианта ($S_{\text{реагентов}} = 3/2$, $S_{\text{продукта}} = 1/2$). Второй вариант, начинающийся с образования димера NO со спином $S=1$ с последующим включением в него молекулы кислорода, возможен, но только после перехода димера NO из триплетного в синглетное состояние. Такой переход может инициироваться окружающими димер NO молекулами NO как спиновыми катализаторами. В результате соединение **O-N-O-O-N-O**, образующееся при включении молекулы кислорода со спином $S=1$ в димер NO со спином $S=0$, начинает характеризоваться спином $S=1$, что и обеспечивает возможность его распада на две молекулы NO_2 с суммарным спином $S=1$, т. е. реализацию указанной выше реакции окисления NO кислородом. Этого не происходит, если вместо молекулы кислорода в димер NO включается ион двухвалентного железа, что приводит к образованию по схеме 1 М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами. Таким образом образование этих комплексов является естественным процессом, предохраняющим окисление молекул NO в микромолярном диапазоне его концентраций от его окисления кислородом путём его включения в М-ДНКЖ [47]. Попутно это включение обеспечивает в результате реакции диспропорционирования превращение половины молекул NO в катионы нитрозония.

1.3. Нитропруссид натрия (SNP)

1.3.1. SNP как донор NO⁺

Нитропруссид натрия (Sodium Nitroprusside), (SNP) – неорганическое соединение, комплексная соль с формулой $\text{Na}_2^+ + [(\text{CN})_5 \text{Fe}^{2+} \text{NO}^+]$. Это соединение на протяжении десятилетий остаётся одним из важнейших объектов медико-биологических исследований. Актуальность его изучения в данной работе определяется способностью SNP выступать в роли универсального донора катиона нитрозония (NO⁺), а также его применением в качестве эффективного вазодилататора, что позволяет исследовать механизмы регуляции сосудистого тонуса и внутриклеточной сигнализации.

Научная ценность SNP обусловлена его многогранным действием. Являясь «золотым стандартом» среди доноров NO, препарат даёт возможность изучать фундаментальные процессы регуляции артериального давления, микроциркуляции и реологических свойств крови. Практическая значимость SNP определяется его широким применением в клинической практике при различных патологических состояниях – от гипертонических кризов до сердечной недостаточности.

1.3.2. История применения препарата SNP в химии и медицине

SNP был впервые синтезирован Лайоном Плейфером в середине XIX века (в 1849 году) [112] и долгое время использовался в химии как реактив для качественного определения сульфидов и других веществ [113]. Только в 1929 году Джонсон (Johnson) и соавторы открыли его гипотензивные свойства, что привело к широкому медицинскому применению [114]. В биологической и медицинской литературе SNP обычно описывается как препарат-донор NO [115]. Механизм гипотензивного действия SNP был рассмотрен А. Р. Батлером (A. R. Butler) и К. Глайдвеллом (C. Glidewell) в 1987 году [116]. Позднее Батлер изучил особенности

высвобождения цианида в ходе метаболизма SNP и его цитотоксические свойства [115].

Важный вклад в понимание химии SNP внесли также работы Д. Мулвея (D. Mulvey) и У. А. Уотерса (W. A. Waters), которые предложили механизм взаимодействия SNP с тиолами, включающий образование окрашенного аддукта и последующее формирование восстановленного иона $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$ [117]. К. Глайдвелл (C. Glidewell) и И. Л. Джонсон (I. L. Johnson), используя SNP, меченный ^{13}C , уточнили этот механизм, показав, что наблюдаемый ЭПР-сигнал принадлежит не $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$, а $[\text{Fe}(\text{CN})_4\text{NO}]^{2-}$ [118]. Эти исследования позволили детально описать реакции SNP с биологическими тиолами.

В 1970-х годах SNP стал «золотым стандартом» для управляемой гипотензии в нейрохирургии и кардиохирургии, поскольку его действие быстро начинается и быстро прекращается после прекращения инфузии. Однако систематическое изучение его цитотоксических эффектов, в том числе связанных с высвобождением цианида и катиона нитрозония, началось позднее и продолжается сегодня.

1.3.3. Воздействие SNP на организм

SNP оказывает эндотелий-независимое вазодилатирующее действие, то есть вызывает расслабление гладких мышц сосудов непосредственно, без участия эндотелия. Это свойство широко используется для дифференцировки эндотелий-зависимых и эндотелий-независимых механизмов регуляции сосудистого тонуса в экспериментах [119].

Вазодилатация развивается в течение нескольких минут после внутривенного введения SNP. Для активации растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) необходимо образование свободного NO, которое включает координацию лиганда NO в гемовом центре этого фермента [116]. М. Феелиш (M. Feelisch) и Э. А. Ноак (E. A. Noack) выявили прямую зависимость между количеством высвобождаемого NO и активацией гуанилатциклазы: чем больше NO, тем сильнее активация. Активация напрямую зависит от концентрации SNP. Дитиотреитол, сам по себе не

влияя на активацию, усиливает эффект SNP на 32% в коронарных артериях крупного рогатого скота [120; 121].

SNP метаболизируется с образованием токсичных цианидов, поэтому его применение требует осторожности. В небольших количествах фермент роданаза превращает свободный цианид в менее токсичный тиоцианат (SCN^-) [116], но в клинической практике был ряд летальных исходов при длительном применении препарата и случаи гибели экспериментальных животных при превышении дозировки. Тем не менее препарат широко используется для исследования вазодилататорных механизмов. Исследования показывают эффективность SNP в снижении дисфункции кишечника, вызванной ожирением [17], а также его потенциальное применение при шизофрении и эритромеалгии [122]. Отмечено, что SNP влияет на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов, оказывает ототоксический эффект, ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток человека, влияет на иммунную систему и функции почек у собак [116]. Однако эти эффекты не являются центральными для настоящей работы; они лишь подчёркивают многогранность действия SNP.

Важно отметить, что SNP используется не только как гипотензивное средство, но и как модельное соединение для изучения сигнальных путей оксида азота, что делает его незаменимым инструментом в биофизике и молекулярной фармакологии.

1.3.4. Одноэлектронное восстановление SNP

SNP диамагнитен. Характерная для него резонансная структура описывается как $\text{Na}_2[\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_5\text{NO}^+]$, что, собственно, и определяет его способность высвобождать катион нитрозония. Что касается появления у SNP вазодилататорной активности при его введении в организм человека и животных, этот эффект определяется одноэлектронным восстановлением этого соединения эндогенными восстановителями, например, тиолами, в результате которого SNP становится парамагнитным из-за превращения NO^+ в его вышеприведённой резонансной

структуре в нейтральную молекулу NO [123]. В водном окружении при нейтральных (физиологических) значениях pH комплекс становится неустойчивым, высвобождая сначала цианидный лиганд в транс-положении к NO, а затем и саму молекулу NO [116].

Аналогичное превращение SNP в его водном растворе достигается при обработке SNP как тиолами, так и другими восстановителями, например дитионитом или аскорбиновой кислотой. Происходящий при этом при нейтральных значениях pH распад SNP, как правило, приводит к появлению в растворе М-ДНКЖ с анионными лигандами либо тиоловой природы при использовании последних в качестве восстановителей (в том числе и дитионита, превращающегося в воде в тиол-содержащее производное — тиосульфат), либо анионных лигандов нетиоловой природы, например, при использовании в качестве восстановителя аскорбата. Поскольку М-ДНКЖ, как и их биядерная форма могут выступать в качестве как NO, так и NO⁺ доноров, препараты SNP после такой трансформации могут обнаруживать как возникающие ДНКЖ остаточную цитотоксическую активность.

При обработке SNP в водном растворе различными восстановителями восстановленный SNP при щелочных значениях pH не разрушается, очевидно, из-за реализации резонансной структуры, отличающейся от возникающей при восстановлении SNP при нейтральных значениях pH. Об этом свидетельствует и различие в параметрах сигналов ЭПР SNP, обработанных одноэлектронными восстановителями при нейтральных и щелочных значениях pH. Восстановительный метаболизм SNP ранее был изучен в работах [124-126].

1.3.5. Цитотоксическая активность SNP как донора NO⁺

SNP оказался первым нитрозосодержащим соединением, в экспериментах с использованием которого впервые было показано, что катион нитрозония является агентом, характеризующимся высоким цитотоксическим потенциалом, существенно превышающем аналогичную активность молекулярного NO [25].

Эксперименты проводили на культуре фиброзных клеток Swiss 3T3, в инкубационную среду которых вводили или SNP как донор NO^+ или в качестве доноров NO S-нитрозоглутатион (GS-NO) либо S-нитрозо-N-ацетилцистеин (SNAP), а также непосредственно газообразный NO в водном растворе. Результаты экспериментов, приведённые на рисунке 8, показывают, что через 24 часа инкубации клеток 50%-ный апоптоз у клеток достигался при 0.02 мМ концентрации SNP, тогда как NO вызывал такой процент апоптоз при концентрации в 40 раз большей – при 0,8 мМ. Значительная часть клеток, обработанных SNP с концентрацией 1 мМ, начинала испытывать апоптоз уже через 2 часа (рисунок 8B), тогда как при обработке клеток при той же концентрации NO процент апоптотических клеток через 2 часа инкубации составлял не более 10 %.

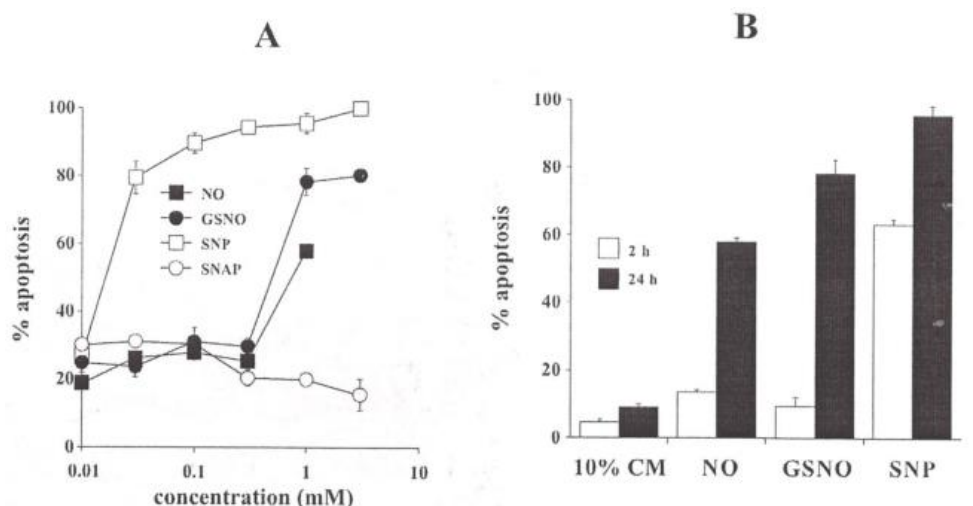


Рисунок 8 – Влияние NO , GS-NO, SNAP и SNP на выживаемость Swiss 3T3 фибробластов в культуре. (A) Клетки инкубировались в течение 24 часов при повышающейся концентрации указанных агентов. (B) Клетки обрабатывались указанными агентами в концентрации 1 мМ в течение 2 и 24 часов [25]

1.4. Заключительное замечание по поводу современного состояния проблемы цитотоксической активности катиона нитрозония

Рассматривая проблему цитотоксической активности катиона нитрозония, можно добавить, что только для SNP не ставится вопроса о наличии в его составе NO^+ . Для большинства исследователей это очевидно: иначе невозможно объяснить, откуда появляется молекулярный NO после его одноэлектронного восстановления

SNP как *in vivo*, так и *in vitro*. Что касается наличия катиона нитрозония в составе М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, такая возможность некоторым исследователям не кажется очевидной. Дело в том, что в соответствии с механизмом образования этих комплексов, которого придерживается большая часть западноевропейских и американских исследователей, резонансная структура железо-динитрозильного фрагмента в этих комплексах описывается как $\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}^-)$, т. е. она характеризуется d^9 электронной конфигурацией железа. В нашей лаборатории под руководством проф. А.Ф. Ванина, мы придерживаемся другого мнения, а именно того, что резонансная структура железо-динитрозильного фрагмента в этих комплексах описывается как $\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}^+)$, т. е. она характеризуется d^7 электронной конфигурацией железа [66, 127]. В первом случае ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами могут высвобождать нитрозильные лиганды в форме молекулярного NO и в форме аниона нитроксила (NO^-), тогда как на самом деле — в форме NO и катиона нитрозония (NO^+). При этом в нашей лаборатории, как это следует из литературного обзора, было продемонстрировано разнообразное проявление способности ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами выступать в качестве доноров этих катионов [1; 12; 27-33; 46; 47; 65-67; 70; 77; 79-81; 126; 128; 129; 130; 131]. Такого рода исследований не описано в литературе в отношении SNP. В связи с этим, была выбрана тема диссертационной работы: «Катион нитрозония как цитотоксический компонент нитропрусида» (SNP), с тем чтобы продемонстрировать особенности биологической активности NO^+ как компонента SNP. Решение этой задачи позволило усилить нашу позицию в отношении того, что ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами действительно способны выступать в живых организмах в качестве донора катионов нитрозония. Также в этой области можно отметить работы Khan S. и Lin W. [24; 25]. Мы опубликовали ряд статей по результатам проведённых исследований в отношении биологической активности NO^+ [20; 21; 22; 23; 74; 132].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Реактивы

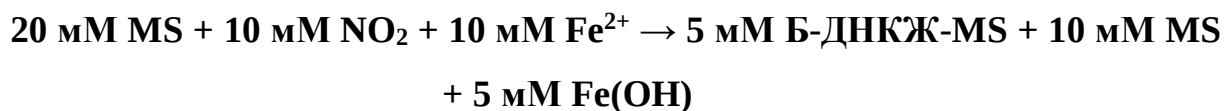
В качестве доноров оксида азота использовали нитропруссид и динитрозильный комплекс железа с меркаптосукцинатом.

Сухие препараты нитропруссид натрия - sodium nitroprusside (SNP) и дитионита натрия - sodium dithionite (SDT) (производства Sigma-Aldrich, США), хранились при -20 °C и растворялись *ex tempore* в инкубационной среде.

Исследования с использованием SNP демонстрируют высокую воспроизводимость результатов. Эксперименты *in vivo* показали органоспецифичность ответа на NO-индуцированное повреждение, клетки иммунной системы проявляют повышенную чувствительность к действию препарата.

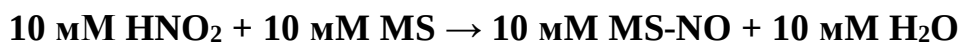
Синтез доноров NO и NO⁺ — нитрозомеркаптосукцината (MS-NO) и Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (ДНКЖ-MS). ДНКЖ-MS синтезирован из ферросульфата и MS по разработанному в лаборатории протоколу [77].

В дистиллированную воду последовательно добавляются меркаптосукцинат (MS, 40 мМ), FeSO₄·7H₂O (20 мМ) и затем NaNO₂ (20 мМ). Первоначальное введение глутатиона приводит к подкислению раствора до pH 1.5–2.0, обеспечивающего полное растворение двухвалентного железа и постепенное образование (в течение 1–1.5 ч) MS-NO, инициируемое 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-MS по следующей суммарной реакции:



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-MS оптическим методом по интенсивности полосы поглощения на 360 нм ($\varepsilon = 3700 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) в оптическом спектре этого комплекса (рисунок 9, б) оценивается концентрация последнего (в пересчете на одну железо-динитрозильную группу в этом комплексе). Полученный препарат Б-ДНКЖ-MS с характерным для него невысоким соотношением концентраций комплекса и свободного MS (2:1) использовался нами в опытах по изучению токсического действия катионов нитрозония, выделявшихся из Б-ДНКЖ-MS при их разрушении производными дитиокарбамата при двукратном превышении концентрации последних в отношении комплекса. Максимальный уровень образующихся БДНКЖ-MS (5 mM) при указанном соотношении реагентов лимитировался концентрацией нитрита. Весь он при взаимодействии с глутатионом по следующей реакции в протонированной форме включался в образование MS-NO:



Образование ДНКЖ-MS регистрировали спектрофотометрически. Концентрацию комплекса определяли по оптической плотности на длине волны 360 нм, исходя из коэффициента экстинкции $3700 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ на один атом железа [77].

В экспериментах с использованием эквимольной смеси ($\text{MS} + \text{Fe}^{2+}$) концентрация компонентов этой смеси не превышала 0.3 mM. При большей их концентрации, особенно при щелочном варианте метода ДНК-комет, ионы железа в заметном количестве включались в водонерастворимые гидроокисные комплексы $(\text{FeOH})_n$, затруднявшие визуализацию комет и искажавшие результаты [36].

2.2. Клетки

Для исследований *in vitro* использовались клетки аденокарциномы молочной железы человека линии (MCF-7), которые были получены из коллекции лаборатории экспериментальной терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва). Их культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C в среде DMEM (ThermoFisherScientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM глутамина и 10 Ед/мл смеси пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия).

2.3. Животные

Для исследований *in vivo* в работе были использованы половозрелые мышигибриды F1CBAxС57B16 в возрасте 2.5 мес. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях (температуре 22 ± 2 °C, относительной влажностью воздуха 60 ± 10 % и 12-часовым световым периодом), имели неограниченный доступ к воде и коммерческому питанию [133; 134]. Все процедуры с животными осуществлялись в соответствии с положением комитета по этике ИБХФ РАН.

Животным внутрибрюшинно вводили вышеописанные растворенные в 10 мл стерильного физраствора навески препаратов SNP, SDT, а также их смесь. Доза SNP составляла 6 мг/кг (20 мкМ), а доза SDT 7 мг/кг (40 мкМ). Вводимый объем варьировался от 0,25 мл до 0,5 мл в зависимости от веса животного (от 20 до 40 гр). Препараты растворяли непосредственно перед инъекцией. Спустя 1 или 24 часа животных декапитировали, извлекали селезенку, которую промывали в охлажденном на льду PBS и отделяли необходимое количество ткани офтальмологическими ножницами. Образец ткани мягко гомогенизировали в стеклянном Поттере. Гомогенат в PBS пропускали через нейлоновую сеть с диаметром пор 200 мкм, затем гомогенат в PBS декантировали в центрифуге 3 мин на 800 g для отделения клеточных агрегатов, отбирали супернатант и ресуспендировали клетки в PBS из чего готовили рабочую суспензию спленоцитов

для микроскопии (двойное окрашивание на целостность мембраны, окрашивание PI без фореа для оценки общего количества ДНК в клетках) и метода комет (окрашивание PI форируемых слайдов подготовленных согласно процедуре). Без ресуспендирования фон кометы, полученной из спленоцитов мышей оказывается слишком зашумлен для обработки в CASP.

Спленоциты были использованы для оценки токсического воздействия NO^+ *in vivo* по нескольким причинам, связанным с их биологической ролью, уязвимостью к окислительному стрессу и практическими аспектами экспериментальной модели.

Селезёнка представляет собой ключевой орган иммунной системы, где сосредоточены различные типы иммунных клеток, включая лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки. Спленоциты, как совокупность клеток селезёнки, представляют собой гетерогенную популяцию, включающую клетки, активно участвующие в иммунных реакциях. Это делает их удобной моделью для изучения воздействия токсических агентов на клетки иммунной системы, которая часто становится мишенью при окислительном стрессе, вызванном NO^+ и его метаболитами, такими как пероксинитрит (ONOO^-), которые способны вызывать двунитевые разрывы ДНК, нитрование белков и перекисное окисление липидов клеточных мембран [129; 135-137].

Спленоциты содержат повышенный уровень ионов железа. Железо может способствовать усилению окислительного стресса, так как при его высвобождении (например, после радиационного или химического воздействия) оно катализирует образование реактивных форм кислорода и азота, включая NO^+ . Это приводит к повреждению клеточных компонентов, в том числе ДНК. В случае с NO^+ его взаимодействие с тиоловыми группами белков (включая ключевые элементы системы апоптоза, например каспазу-3) может нарушать нормальные клеточные процессы и вызывать токсический эффект [129; 135-137].

Таким образом, выбор спленоцитов мышей обусловлен их ролью в иммунной системе, повышенной чувствительностью к окислительному стрессу из-за содержания железа, уязвимостью их ДНК к повреждениям, вызванным NO^+ в

отсутствии восстановителей в органе, который является их носителем. Использование спленоцитов упрощает получение достаточного количества клеток для анализа и снижает вариабельность данных. Это позволяет эффективно изучить механизмы цитотоксического и генотоксического действия NO^+ на организм.

2.4. Методы

2.4.1. МТТ-тест

Для оценки цитотоксичности использовался МТТ-тест, демонстрирующий степень выживаемости клеток. МТТ-тест является стандартным научным методом проверки цитотоксичности различных соединений. Тест чувствителен и воспроизводим. В его основе лежит определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ, что позволяет оценить снижение жизнеспособности клеток [138]. Это отражает непосредственно повреждение митохондрий, которое приводит к клеточной гибели [139].

В рамках нашего исследования, методика проведения исследования с применением данного метода была организована следующим образом. Клеточную суспензию в культуральной среде ($\sim 10^5$ кл./0.2 мл) вносили в лунку 96-луночного планшета. Спустя 24 ч (время адаптации и прикрепления клеток), в каждую лунку добавляли раствор тестируемых соединений в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS) в различном разведении (не более 0.1 общего объема в лунке). Клетки культивировали 24 и 48 ч в CO_2 -инкубаторе при 37 °C, после чего в каждую лунку добавлялось по 20 мкл раствора МТТ-реагента (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолия бромид) [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (AppliChem, Германия), до конечной концентрации в лунке 0.5 мг/мл. Клетки продолжали культивировать в присутствии МТТ-реагента 3 ч, затем отбирали среду и к оставшимся в лунках клеткам добавляли по 200 мкл ДМСО, растворяющего кристаллы формазана (37 °C, 10 мин со встряхиванием). С помощью анализатора Multiscan FC (ThermoScientific, США) измеряли оптическую

плотность раствора формазана в лунке (при длине волны 570 нм), которая прямо пропорциональна количеству жизнеспособных клеток. В каждом эксперименте измерения в контрольных и экспериментальных лунках в планшетах повторялись 5-кратно.

В каждом эксперименте в качестве контроля использовали клетки, культивированные в тех же условиях, но без добавления тестируемых соединений; вместо растворов препаратов вносили эквивалентный объём стерильного PBS. Для каждой концентрационной серии контрольные лунки располагали на том же планшете, что и опытные, и обрабатывали по идентичной схеме (включая добавление МТТ-реагента и ДМСО). Результаты цитотоксичности выражали в процентах от контроля, принятого за 100 % жизнеспособности.

2.4.2. Метод ДНК-комет или кометный анализ (Comet Assay)

Гено- и цитотоксичность взаимосвязаны через способность повреждения ДНК индуцировать гибель клетки посредством запуска апоптотических процессов, сопровождающихся ферментативной деградацией ДНК. Регистрировать этот процесс, а также обратный процесс репарации, позволяет метод ДНК-комет (одноклеточный гель-электрофорез) в сочетании с оценкой морфологических изменений в клетках [137; 139]. Метод широко применяется для измерения повреждений ДНК в отдельных клетках эукариот, позволяет параллельно проследивать формирование комет и выделять среди них погибающие клетки (кометы-«ежики») [140].

Основная идея метода заключается в том, что после иммобилизации клеток в агарозе и лизиса образуются нуклеоиды, которые подвергаются электрофорезу в нейтральной или щелочной среде. При наличии разрывов ДНК происходит её релаксация и миграция к аноду, формируя характерное кометоподобное изображение. В зависимости от условий электрофореза выявляются одностебельные (ОР) или двустебельные (ДР) разрывы, а также щелочелавильные сайты (ЩЛС) [141;

142]. Сочетание нейтрального и щелочного вариантов в данной работе позволило дискриминировать эти типы повреждений [141].

Подготовка клеток к проведению эксперимента

Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина и 10 ЕД/мл смеси пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия).

Во второй серии (*in vivo*) препараты растворяли непосредственно перед инъекцией. Затем, спустя час после инъекций животных декапитировали и извлекали их селезенку, которую промывали в охлажденном PBS и измельчали ножницами. Кусочки ткани мягко гомогенизировали в стеклянном Поттере. Гомогенат в PBS пропускали через нейлоновую сеть 200 мкм. Отфильтрованную суспензию декантировали 2-3 мин для отделения клеточных агрегатов и отбирали верхний слой, из которого готовили рабочую суспензию для микроскопии и метода комет. Оценку жизнеспособности и морфологии спленоцитов проводили по ранее описанным процедурам окрашивания клеток смесью флуорохромов: йодистым пропидием (PI) и акридиновым оранжевым (АО) [143].

Процедура кометного анализа

Размороженные аликвоты клеток (MCF-7 или спленоциты) центрифугировали (400 g, 5 мин), осадок суспендировали в 0,7 %-ном растворе легкоплавкой агарозы (тип IV, Sigma) в PBS [140]. На предметные стёкла, предварительно покрытые застывшей тугоплавкой агарозой, наносили по 60 мкл полученной суспензии, накрывали покровным стеклом (18×18 мм) и выдерживали на льду 1 мин для застывания. После удаления покровного стекла наносили второй слой легкоплавкой агарозы, накрывали стеклом 24×24 мм, снова выдерживали на льду 1 мин и удаляли покровное стекло. Слайды с иммобилизованными клетками

помещали в лизирующий раствор (0,5 М $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 0,1 мг/мл протеиназы К, pH 8, Sigma) при 37 °C на 12–15 ч.

Лизис и электрофорез

Для нейтрального варианта после лизиса слайды подвергали электрофорезу в буфере TAE (pH 8) при напряжении 0,7–0,8 В/см в течение 20–25 мин при 8 °C. Затем слайды промывали PBS, высушивали на воздухе и дегидратировали в метаноле (30 мин).

Для щелочного варианта после лизиса слайды погружали в диссоциирующий раствор (1,2 М NaCl, 100 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 0,1 % Na-лаурилсаркозинат, 0,26 М NaOH, pH > 13) на 1 ч при 8 °C для расплетения ДНК в областях разрывов. Затем их выдерживали в электрофоретическом буфере (0,03 М NaOH, 2 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, pH ~ 12,3) ещё 1 ч при 8 °C. Электрофорез проводили в горизонтальной камере при 8 °C, напряжении 0,8 В/см в течение 25 мин. После электрофореза слайды трижды (по 5 мин) ополаскивали нейтрализующим раствором (0,4 М Tris-HCl, pH 7,5), сушили на воздухе и дегидратировали в метаноле.

Окрашивание и визуализация

Высушенные слайды окрашивали раствором йодистого пропидия (PI, 5 мкг/мл) в антифейде (20 мМ Tris-HCl pH 7,5, 20 мг/мл DABCO, 60 % глицерин). Визуализацию проводили на флуоресцентном микроскопе МИКМЕД-2 (АО ЛОМО, Россия) с видеокамерой ТСС-5.01СЕ (ООО «Ломо-Микросистемы»). Окрашивание PI позволяет выявлять все кометы в красном канале; в отдельных экспериментах использовали SYBR-Green I для визуализации сильно повреждённой одностречевой ДНК в зелёном канале, что особенно полезно при потере общей флуоресценции [142-144]. Полученные микрофотографии сохраняли для дальнейшего анализа.

Сканирование слайдов и сбор изображений проводили по процедуре, подробно описанной в приложении (см. приложение А).

Анализ и обработка данных

Изображения комет анализировали с помощью программы CASP 1.2.2 [145]. Параметр повреждённости ДНК – момент хвоста mt – вычисляли как произведение $mt = Ft \cdot X_m$, где

Ft – доля флуоресценции ДНК в хвосте

X_m – расстояние между центрами тяжести хвоста и головы (рисунок 9).

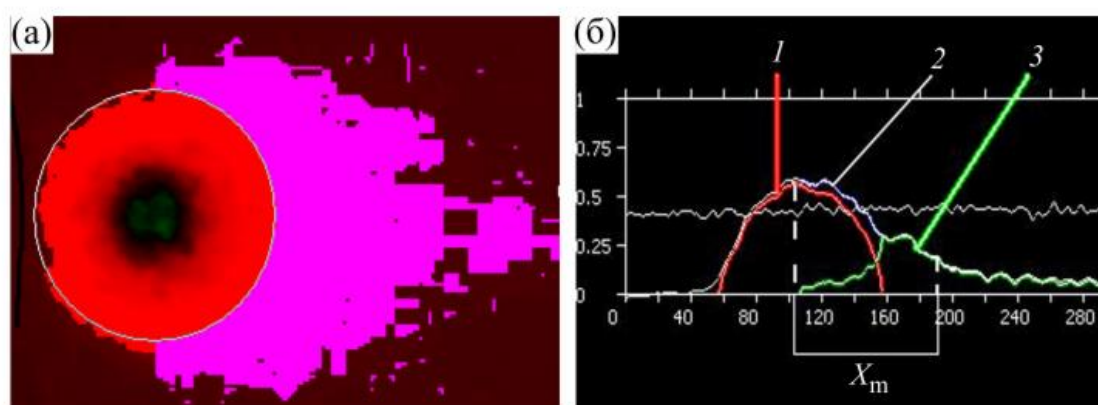


Рисунок 9 – (а) – Микрофотография ДНК-кометы. (б) – Сканограмма этой кометы: 1 (красная линия) – профиль головы кометы, 2 (белая линия) – интегральный профиль кометы, 3 (зеленая линия) – профиль хвоста кометы (разница между профилем 2 и профилем 1) [21]

Представленная сканограмма (рисунок 9, б) позволяет установить количественную взаимосвязь между морфологией кометы и расчетными параметрами. В области головы интегральный профиль кометы (кривая 2) полностью совпадает с профилем головы (кривая 1). Однако начиная с расстояния, соответствующего положению X_m в пространственном распределении, происходит расхождение кривых: область под зеленой кривой (хвост) формируется исключительно за счет мигрировавшей поврежденной ДНК. Таким образом, отношение площади под кривой 3 к общей площади под интегральной кривой 2 численно соответствует параметру Ft , в то время как координата центра тяжести этой зеленой области относительно центра головы определяет величину X_m .

Формула для определения X_m :

$$X_m = \frac{\sum[(li \cdot xi)]}{\sum li}, \text{ где}$$

li – интенсивность флуоресценции в точке i профиля хвоста,

X_i – расстояние от центра головы до этой точки. Суммирование в числителе проводят в пределах хвоста, в знаменателе – по всей комете.

Повреждение ДНК анализировали по изображениям ДНК-комет, используя программу CASP 1.2.2 и оценивали повреждение по параметру момента хвоста комет mt [145].

Полученные данные представляли в виде распределения комет по 5 классам, каждому из которых соответствовал свой интервал значений mt . Сравнение экспериментальных распределений проводили, используя непараметрическую статистику Колмогорова-Смирнова, считая различия достоверными при $P < 0.05$ [142-144].

Особенности интерпретации

Для каждого образца распределение комет по классам mt сравнивали с соответствующим контрольным распределением, полученным на необработанных клетках той же серии. Достоверное увеличение доли комет с высокими значениями mt относительно контроля интерпретировали как генотоксический эффект.

Анализ комет в экспериментах *in vivo* проводили с использованием модифицированной системы визуализации, адаптированной для работы с суспензией спленоцитов. В связи с различиями в морфологии ядер и оптической плотности клеточных суспензий, для экспериментов *in vivo* были оптимизированы параметры регистрации изображений (интенсивность возбуждающего света, усиление сигнала камеры). Это позволило стандартизировать условия съемки для гетерогенной популяции спленоцитов. Важно подчеркнуть, что абсолютные значения параметра mt , полученные на разных клеточных моделях (MCF-7 и спленоциты) с использованием различных настроек регистрации, не подлежат

прямому количественному сравнению друг с другом. Однако это не влияет на возможность сравнительного статистического анализа (например, оценку доли клеток с уровнем повреждения выше контрольного порога, Fdc) внутри каждой экспериментальной серии, поскольку все измерения в серии проводятся в строго одинаковых условиях.

2.4.3. Двойное окрашивание (Double Staining)

С помощью метода двойного окрашивания проводится оценка мембранной цитотоксичности, которая отражает показатель целостности мембран клеток [145].

В качестве дополнительного показателя цитотоксического действия препаратов на клетки использовалось изменение целостности (интактности) клеточных мембран, оцениваемое по стандартной методике двойного окрашивания клеток флуоресцирующими красителями. Этот метод представляет собой комплексный подход к оценке состояния клеток, позволяющий дифференцировать различные типы клеточной гибели и морфологические изменения [146]. В основе метода лежит использование двух флуоресцентных красителей с различными спектральными характеристиками, что обеспечивает высокую точность диагностики.

Особенностью метода является возможность визуализации различных популяций клеток по характерным флуоресцентным маркерам.

В данной работе данный метод проводился следующим образом. После инкубации клеток, к тестируемой клеточной суспензии в сыворотке PBS (Phosphate Buffered Saline) +10% Dulbecco's (сыворотка крови быка) добавляли подготовленную смесь красителей (15γ) акридинового оранжевого (АО) и йодистого пропидия (PI) до конечной концентрации в суспензии с клетками 5 мкг/мл каждого (5γ). Полученную суспензию (35 мкл) наносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом (24x24мм), которое по периметру окружали лаком, тем самым герметизируя клеточную суспензию, что исключало испарение и изменение ионного состава среды под покровным стеклом.

Микроскопию и накопление микрофотографий в памяти компьютера проводили спустя 10-15 мин после добавления красителей. В ультрафиолетовом спектре микроскопа PI флуоресцирует красным, а АО – зеленым. Йодид пропидия взаимодействует исключительно с ДНК погибших клеток, что делает его незаменимым индикатором нарушения целостности клеточной мембраны [147].

Пока мембрана клетки не повреждена, PI не проникает в клетку и цитоплазма вместе с ядром остаются зелеными или желтыми из-за взаимодействия АО с РНК и однонитевой (ss) ДНК. Нарушение клеточной мембраны смещает окраску цитоплазмы и ядра в оранжевую/красную сторону. При небольших повреждениях мембраны жизнеспособная клетка выводит токсичный для неё PI наружу. Подсчет клеток и анализ морфологических изменений в клетках проводили по микрофотографиям, полученным с помощью камеры объективом x40.

В качестве контроля для морфологической оценки использовали клетки, не подвергавшиеся действию соединений, но прошедшие ту же процедуру размораживания, центрифугирования и окрашивания. По контрольным микрофотографиям устанавливали типичные морфологические признаки живых и спонтанно погибающих клеток в данных условиях, что позволяло корректно идентифицировать индуцированные изменения в опытных образцах.

Целью анализа цитотоксичности с помощью этого метода было сопоставление степени приближения состояния клеток от неповрежденных/жизнеспособных до поздне-апоптотических, некротических с показателями ds ДНК-комет и масштабом деградации ДНК в клетках. Также это позволило проследить морфологические изменения на всех стадиях апоптотического цикла при воздействии изучаемых препаратов на исследуемые клетки.

Двойное окрашивание обладает рядом существенных достоинств, делающих его незаменимым инструментом в клеточной биологии. Метод обладает высокой чувствительностью к изменениям в клеточном цикле, обеспечивает точную дифференцировку апоптоза и некроза, а также даёт возможность количественной оценки процессов клеточной гибели [148].

При проведении исследований с использованием данного метода необходимо учитывать ряд важных факторов. Строгое соблюдение температурного режима, точное дозирование красителей, контроль времени инкубации и особенности подготовки образцов — всё это влияет на достоверность результатов. Кроме того, требуется соблюдение мер безопасности при работе с флуоресцентными красителями, которые могут обладать мутагенным действием [149].

Метод двойного окрашивания представляет собой высокоинформативный инструмент для изучения клеточной гибели, позволяющий получать достоверные результаты при исследовании различных биологических образцов. Его универсальность и чувствительность делают его незаменимым в современной клеточной биологии и медицине.

2.4.4. Морфологическая оценка

Исходя из этих предпосылок и в соответствии с таблицей 3, мы анализировали полученные фотографии клеток после их размораживания и (АО/PI)-окрашивания.

Цель этого анализа сопоставление/корреляция степени приближения состояния клеток от неповрежденных/ жизнеспособных до поздне-апоптотических/некротических с показателями dsДНК-комет/масштабом деградации ДНК в клетках.

Окраска				Ds-кометы	Выживаемость клеток
Цитоплазма	ПлазмМембр	Ядро	Хроматин		
зелен	не поврежд	равн. зелен	диффузный	C0-C1	жив
зелен	не поврежд	гетер. зелен	конденсирован	C0-C2	пре-Ап
зелен/желт	поврежд	зел/желт	конденс+фрагм	C0-C3	Ап.ран
оранж	Пермеабил*	оранж+фрагм	конденс+фрагм	C3-C4	Ап.позд
оранж	Пермеабил*	красн+фрагм	фрагментация	C4	Ап.некр

Таблица 3 – Морфологические характеристики клеток после (АО/PI)-окрашивания и ожидаемые параметры двунитевой (ds) ДНК-комет из этих клеток [составлено автором на основании 21]. Примечание. * расплывчатый или не фокусируемый контур по периферии

Более наглядно морфологические изменения представлены в таблице 4, в разделе 3.3.1, который посвящен результатам проведенного исследования с использованием данного метода.

2.4.5. ЭПР-спектроскопия

Спектры ЭПР растворов SNP, обработанных SDT, регистрировали на модифицированном радиоспектрометре фирмы RadioPan (Польша) при температуре жидкого азота (77K) и комнатной температуре. Концентрацию возникающих при этом парамагнитного SNP и динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиоловыми группами оценивали методом двойного интегрирования, используя в качестве стандартного образца моноядерную форму ДНКЖ с глутатионом с известной концентрацией этих комплексов, подробно описанную и полученную в работе Ванина А.Ф. и Ткачева Н.А. [130].

В процессе исследования, изучаемый образец в виде буферного раствора препарата, либо клеточную суспензию в буфере или образец ткани мышцы размещали в трубочках, замораживали в жидком азоте, извлекали из трубочек и помещали в колбе с жидким азотом в специальный резонатор прибора, расположенный между полюсами электромагнита.

Затем оператор прибора производил запись спектра ЭПР, при которой на резонатор подаются СВЧ-колебания определенной частоты, при этом происходит регистрация поглощения энергии при изменении напряженности магнитного поля. Процедура измерения начинается с достижения резонансного значения магнитного поля, при котором наблюдается максимальное поглощение СВЧ-энергии веществом. Важным элементом методики является применение высокочастотной модуляции магнитного поля, что существенно повышает чувствительность измерений. Регистрация сигнала осуществляется путем анализа отраженной от резонатора СВЧ-мощности, которая находится в прямой зависимости от интенсивности ЭПР-поглощения.

Особенностью метода является то, что в ходе эксперимента фиксируется производная спектра поглощения, что позволяет более четко выявлять отдельные линии даже в сложных спектрах [150; 151]. Резонансное значение определяется точкой пересечения производной с нулевой линией, а ширина линии измеряется между максимумом и минимумом сигнала.

В контексте исследования ДНКЖ метод ЭПР играет ключевую роль в определении парамагнитных свойств комплексов. При образовании моноядерной формы ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами происходит переход от ЭПР-неактивного комплекса с четным числом электронов к ЭПР-регистрируемому с нечетным числом электронов, что проявляется в характерном сигнале ЭПР с $g = 2.03$ [151].

При этом важно отметить, что биядерная форма ДНКЖ остается ЭПР-неактивной, что позволяет дифференцировать различные формы комплексов в ходе исследования.

Методологические аспекты применения ЭПР-спектроскопии для анализа повреждений биологических объектов, включая радиационно-индуцированные изменения, рассмотрены в работе [152]. Ранние методологические исследования ЭПР-спектроскопии негемового железа обобщены в диссертации Бурбаева Д. Ш. [153].

2.5. Репрезентация результатов и статистика

Результаты представлялись с помощью программы OriginPro8 в виде двупараметрических распределений точек или частотных распределений параметра поврежденности ДНК в клетках, mt . Сравнение экспериментальных распределений проводили, используя непараметрическую статистику Колмогорова-Смирнова (СКС), считая различия достоверными при $P < 0,05$ (в пакете приложений программы OriginPro8).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Синтез ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами

Для сравнительного анализа с нитропруссидом натрия (SNP) в качестве донора NO^+ был выбран динитрозильный комплекс железа с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-MS). Выбор этого комплекса обусловлен его способностью к спонтанному распаду в кислой среде при комнатной температуре с высвобождением катионов нитрозония (NO^+) в соотношении 1:1 к железо-динитрозильным фрагментам, что позволяет изучать цитотоксический эффект NO^+ без использования дополнительных агентов (подробное обоснование выбора приведено в разделе 2.1).

Динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ) с меркаптосукцинатом (MS) (ДНКЖ-MS) синтезировался из ферросульфата и MS по ранее разработанному протоколу [29; 77].

Образование стабильного комплекса регистрировали спектрофотометрически. Концентрацию комплекса определяли по оптической плотности на длине волны 360 нм, исходя из коэффициента экстинкции $3700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ на один атом железа [77]. В экспериментах с эквимольной смесью (MS + Fe^{2+}) концентрация компонентов не превышала 0,3 мМ, поскольку при больших концентрациях ионы железа образуют нерастворимые гидроокисные комплексы, затрудняющие визуализацию комет [77].

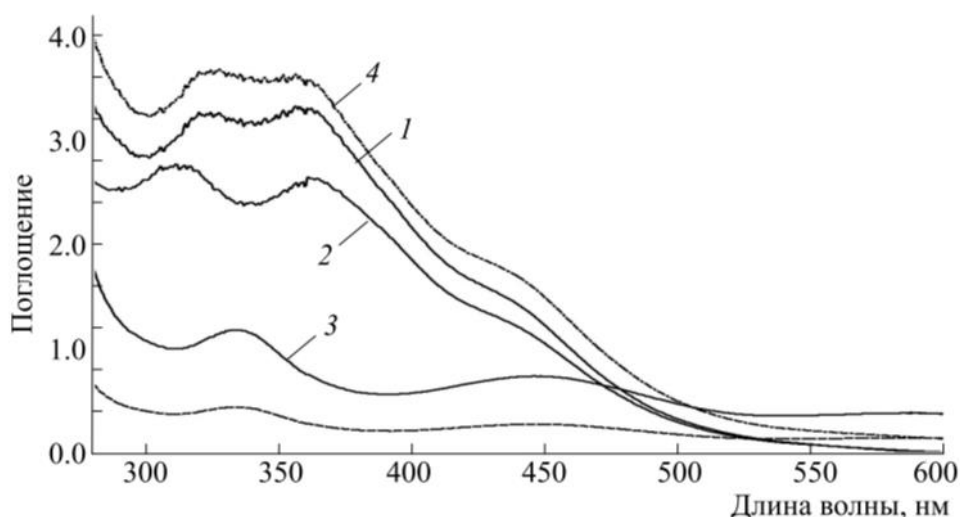


Рисунок 10 – Форма спектра поглощения раствора комплексов Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при соотношении MS: Fe^{2+} : нитрит, равном 40:20:20 mM (спектр 1), с последующим подкислением до pH 1.0 (спектр 2). Спектр 3 – ЭПР-спектр МНКЖ с ЭДТА [77]. Его наложение на спектр 2 дает новый спектр, обозначенный как спектр 4. Спектры комплексов Б-ДНКЖ-MS зарегистрированы при 20-кратном разбавлении растворов [77]

Для проведения дальнейших сравнительных исследований в качестве доноров NO использовались нитрозомеркаптосукцинат (MS-NO) и биядерный комплекс ДНКЖ-меркаптосукцинат (ДНКЖ-MS). В качестве эталонного донора NO^+ применялся нитропруссид натрия (SNP). Дальнейшие исследования с использованием этих доноров NO и NO^+ позволили нам получить важные данные о воздействии этих препаратов на клетки MCF-7 *in vitro*.

В результате этих экспериментов было показано, что препарат SNP (донор NO^+) является значительно более токсичным в сравнении с другими исследуемыми соединениями.

3.2. Выживаемость клеток по МТТ-тесту после воздействия препаратов SNP, ДНКЖ-MS и MS-NO на клетки MCF-7

Для оценки цито и генотоксичности исследуемых соединений был реализован сравнительный эксперимент, где были получены данные о действии препаратов SNP (донор NO^+), ДНКЖ-MS (донор NO и NO^+), MS-NO (меркаптосукцинат - донор NO) при инкубации 24 и 48 часов с клетками MCF-7 на анализ жизнеспособности митохондрий.

Из полученных в данном эксперименте данных, можно сделать вывод, что гибель клеток при воздействии нейтральных молекул NO, образующихся в ходе метаболизма ДНКЖ-MS и MS-NO, и положительно заряженных катионов нитрозония (NO^+), донором которых выступает SNP непосредственно связана с возникновением ДР ДНК. Данные, полученные в результате более продолжительной инкубации в течение 48 часов, указывают на наличие активных механизмов эксцизионной репарации NO-модифицированных нуклеотидов (NER), которые восстанавливают ОР ДНК, и защищают клетки, которые не получили сильного повреждения ДНК, от гибели. Результаты этого эксперимента отображены на рисунке 11 [131].

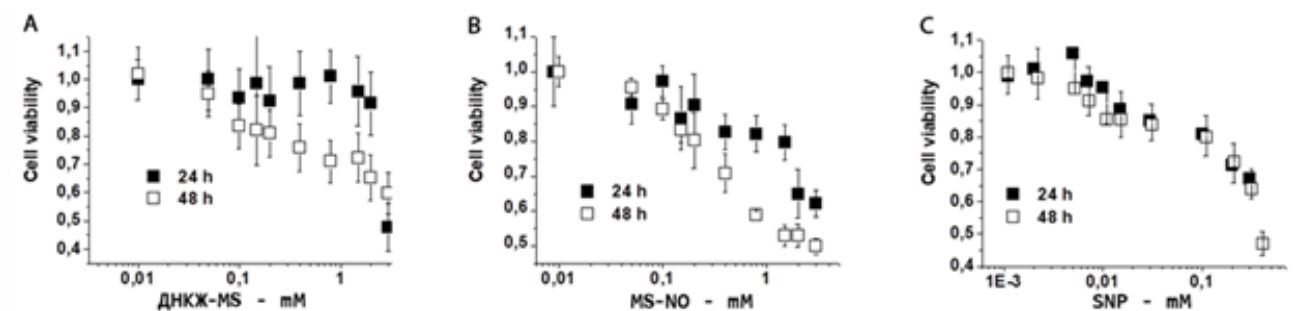


Рисунок 11 – Жизнеспособность клеток MCF-7 при инкубации 24 ч и 48 ч с донорами NO: А) ДНКЖ-MS; В) MS-NO, и с донором NO^+ : С) SNP по результатам МТТ-теста [20, 131]

Сопоставление ответов клеток MCF-7 на 24- и 48-часовую инкубацию с донорами NO и NO^+ выявило принципиальные различия в механизмах цитотоксичности. Для нитропрусида натрия (SNP), являющегося донором катиона нитрозония (NO^+), кривые жизнеспособности при 24 и 48 ч практически совпадают (рисунок 11). Это указывает на то, что цитотоксическое действие NO^+ реализуется в ранние сроки (в течение первых суток) и в дальнейшем не усиливается со временем, а также не зависит от включения механизмов эксцизионной репарации нуклеотидов (NER). Напротив, для доноров нейтрального NO — ДНКЖ-MS и MS-NO — наблюдается иная динамика: их цитотоксичность ниже, а ответы на 24 и 48 ч различаются, что свидетельствует о вовлечении репаративных процессов, модулирующих конечный токсический эффект [131].

В случае доноров NO индуцируемые ими однонитевые разрывы (ОР) ДНК в значительной степени устраняются за счёт активной NER-репарации NO-модифицированных нуклеотидов. Однако, согласно предположению Тронова В.А., именно этот репаративный процесс может становиться причиной возникновения летальных повреждений — двунитевых разрывов (ДР) ДНК, которые детектируются позднее 24 ч инкубации и ассоциированы с выраженным цитотоксическим эффектом [36]. Полученные нами данные о снижении цитотоксичности доноров NO при сокращении времени инкубации с клетками (в диапазоне доз 0,12–1,2 мМ) (рисунок 11 А, В) полностью согласуются с данной гипотезой и подтверждают посредническую роль эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) в реализации токсического действия NO [131].

В отличие от этого, цитотоксический эффект NO^+ (SNP) обусловлен прямым S-нитрозирующим действием катионов нитрозония на тиол-содержащие белки, что не требует репаративных этапов и объясняет быстрое, не зависящее от времени развитие повреждений (Рис. 11, С) [20].

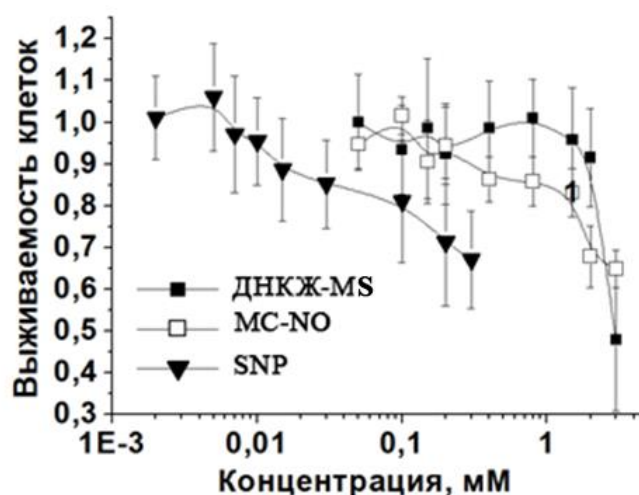


Рисунок 12 – Сравнительные показатели выживаемости клеток MCF-7 по МТТ-тесту и концентрации препаратов ДНКЖ-MS, MS-NO и SNP. Представлены средние значения из трёх независимых экспериментов [131]

Как видно из рисунка 12, препарат SNP среди прочих является наиболее токсичным, его действие не обусловлено участием репаративных процессов, ДР в ДНК появляются стремительно, при этом количество ДНК в клетке не падает. Цитотоксическое действие NO^+ на эти биообъекты обусловлено S-нитрозирующим

действием этих катионов на жизненно важные тиол-содержащие белки [20; 25; 26; 131].

3.3 Генотоксическое действие SNP: индукция двунитевых разрывов ДНК и морфологические изменения клеток MCF-7

Для оценки генотоксического действия нитропрусида натрия (SNP) как донора катиона нитрозония (NO^+) был проведен кометный анализ в нейтральных условиях, позволяющий детектировать двунитевые разрывы (ДР) ДНК. Параллельно с регистрацией ДР оценивались морфологические изменения в клетках, ассоциированные с различными стадиями апоптоза.

Ранее в разделе 3.2 было показано, что цитотоксичность SNP значительно выше таковой для исследованных доноров NO и достигается при меньших концентрациях. Для проверки гипотезы о том, что это различие обусловлено быстрой индукцией двунитевых разрывов ДНК, клетки MCF-7 инкубировали с SNP в течение 1,5 ч и анализировали методом нейтральных ДНК-комет. Оценка проводилась по доле комет класса C4 (включающего погибшие клетки и клетки с негативным прогнозом на выживаемость), классификация которых представлена в таблице 4.

3.3.1 Классификация комет и морфологические критерии повреждения клеток

На первом этапе была разработана классификация нейтральных ДНК-комет, формируемых клетками MCF-7, на основе показателя поврежденности ДНК – момента хвоста кометы (mt), а также сопоставления с морфологическими изменениями, наблюдаемыми при фазово-контрастной микроскопии. Классификация включала четыре класса комет (C0–C4), отражающих прогрессирующую деградацию ядерной ДНК от интактных клеток до

терминальных стадий апоптоза/некроза. Микрофотографии, представленные в таблице 3, иллюстрируют дискретную последовательность морфологических изменений ядерного хроматина в клетках, обработанных SNP (100 мкМ, 90 мин), которая соответствует известной схеме апоптотической деградации ДНК, регистрируемой методом пульс-электрофореза в виде фрагментов размером ≥ 700 , 300 и 50 т.п.н.

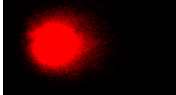
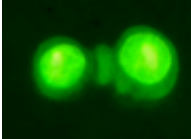
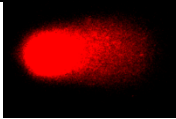
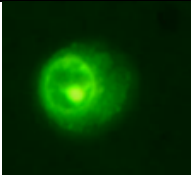
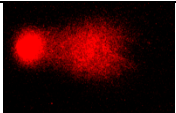
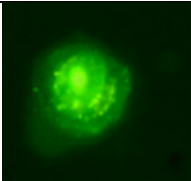
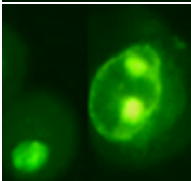
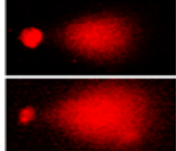
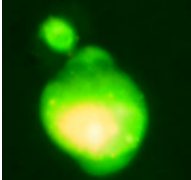
Классы комет		Доля комет данного класса в популяции		Морфология клетки	
		К	SNP 100mkM	Увеличение 600 ^x	
	C0-C1 0<mt<10	37%	5%		Равномерное окрашивание ядра и цитоплазмы с четкими границами ядра и клетки
	C2 10<mt<30	60%	70%		Конденсация хроматина по периферии ядра
	C3 30<mt<40	2%	17%	 	Крупная фрагментация конденсированного хроматина в ядре
	C4 mt>40 «ёжики», «облака»	1%	8%		Множественная фрагментация хроматина в ядре. Апоптотическая фрагментация клетки, некротическое разбухание клетки, утрата целостности мембраны

Таблица 4 – Классы нейтральных комет, диапазоны поврежденности ДНК и ассоциированные с ними морфологические изменения клеток MCF-7, индуцированные нитропруссидом натрия (SNP, 100 мкМ, 90 мин) [21]

Разработанная классификация комет, основанная на показателе mt и сопоставленная с морфологическими изменениями клеток, позволила идентифицировать четыре класса повреждений (C0–C4), отражающих

прогрессирующую деградацию ДНК. На основе этой классификации в следующем разделе проведена количественная оценка индукции двунитевых разрывов ДНК под действием SNP и определена доля клеток, получающих сильные (невосстанавливаемые) повреждения.

3.3.2 Индукция двунитевых разрывов ДНК под действием SNP

Для количественной оценки ДР ДНК клетки MCF-7 инкубировали с SNP в концентрации 100 мкМ в течение 90 мин, после чего проводили нейтральный вариант метода ДНК-комет. На рисунке 13 представлены двупараметрические распределения экспериментальных точек в координатах: интегральная флуоресценция кометы (Мс) и поврежденность ДНК (mt), для intactных клеток (рисунок 13, а) и клеток, обработанных 100 мкМ SNP (рисунок 13, б).

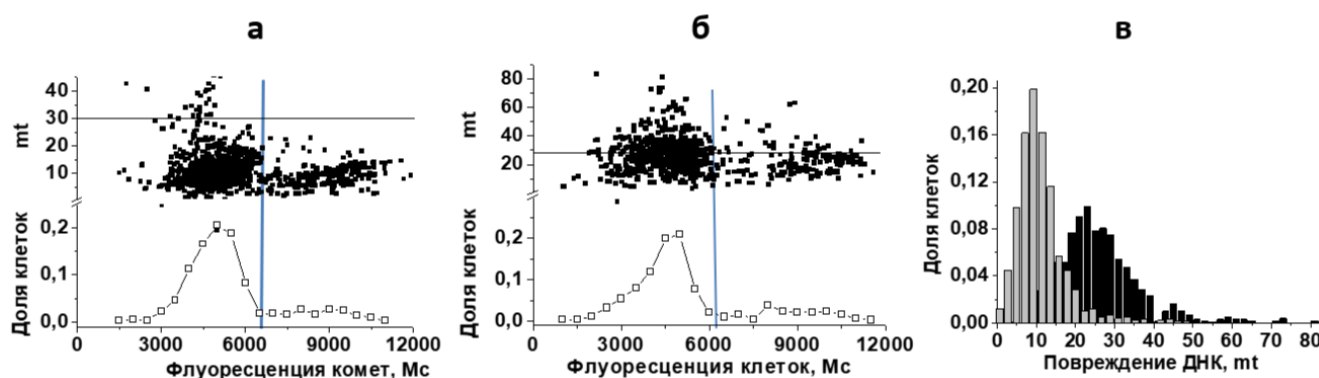


Рисунок 13 – Двупеременные распределения по интенсивности флуоресценции (содержанию ДНК) полученные для экспериментальных точек: а) intactных клеток (N=1070); б) после 90 мин инкубации с 100 мкМ SNP (N=992). в) Частотные гистограммы распределения полученные из а и б по повреждённости ДНК в intactных клетках (серые столбики, mt=13) и клетках инкубированных с SNP (чёрные столбики, mt=27); $p < 0,05$, СКС [21]

Горизонтальная линия на уровне $mt = 30$ согласно классификации (таблица 4), соответствует порогу между слабо и умеренно поврежденными (классы C0–C2, ниже горизонтальной линии) и сильно поврежденными с неблагоприятным прогнозом (классы C3–C4, точки выше линии). Для контрольной популяции 96% (слабоповреждённых классов C0–C2) и 4% (сильно повреждённых классов C3–C4), для клеток обработанных SNP 72% (слабоповреждённых классов C0–C2) и 28% (сильно повреждённых классов C3–C4). На рисунке 13, в, приведены частотные

гистограммы по параметру mt: серые столбики – контроль (среднее $mt = 12,3 \pm 0,7$), чёрные – SNP (среднее $mt = 27,4 \pm 2,5$). Различие распределений достоверно при $p < 0,05$ (критерий Колмогорова–Смирнова) [21].

В контрольной популяции доля сильно-поврежденных клеток составляла 4%, тогда как после обработки SNP она возросла до 28%. Интегральная флуоресценция комет (Mc), отражающая содержание ДНК в клетке, после 90-минутной инкубации с SNP значимо не снижалась, что свидетельствует о том, что регистрируемые двунитевые разрывы являются следствием генотоксического действия SNP, а не ферментативной деградации, ассоциированной с апоптозом или некрозом [21].

Для оценки зависимости индукции ДР ДНК от стадии клеточного цикла были проанализированы субпопуляции клеток (рисунок 13 и таблица 5). Вертикальная синяя линия (рисунок 13, а и б) разделяет субпопуляции клеток в фазах G0/G1 (слева) и G2/M+S (справа). Для контрольных клеток (рисунок 13, а) это 83% в фазах G0/G1 и 17% — тетра- и анеуплоидные клетки в фазах G2/M+S. Для клеток обработанных SNP (рисунок 13, б) это 80% в фазах G0/G1 и 20% в фазах G2/M+S. Полученные данные указывают на отсутствие селективного действия SNP в отношении определенной фазы клеточного цикла [21].

Контрольные клетки (N=1362)			
G0/G1 (83,3%)		G2/M+S (16,7%)	
Клетки +SNP 0,1 mM (N=992)			
G0/G1 (80,5%)		G2/M+S (19,5%)	
НПК*	ФПК, %*	НПК*	ФПК, %*
230±53	29±7	55±11	27±6

Таблица 5 – Генотоксичное действие SNP на G0/G1-субпопуляции и G2/M+S-субпопуляции клеток MCF-7. N – число клеток; Нпк – число клеток с поврежденной ДНК ($mt > 30$); Фпк – доля (%) поврежденных клеток; * - средние значения из 3 независимых измерений $\pm SD$ [21]

Данные таблицы 5 показывают, что доли поврежденных клеток в фазах G0/G1 и G2/M+S статистически не различаются ($29 \pm 7\%$ против $27 \pm 6\%$ соответственно), что свидетельствует о независимости генотоксического действия SNP от стадии клеточного цикла. Важно отметить, что полученная доля клеток с

сильным повреждением (25–30%) близка к доле нежизнеспособных клеток по результатам МТТ-теста ($22 \pm 4\%$) после 24- и 48-часовой инкубации с той же концентрацией SNP (см. раздел 3.2). Это позволяет связать раннее накопление двунитевых разрывов ДНК с последующим цитотоксическим эффектом SNP [21].

Усредненные данные двух аналогичных экспериментов приведены на рисунке 14.

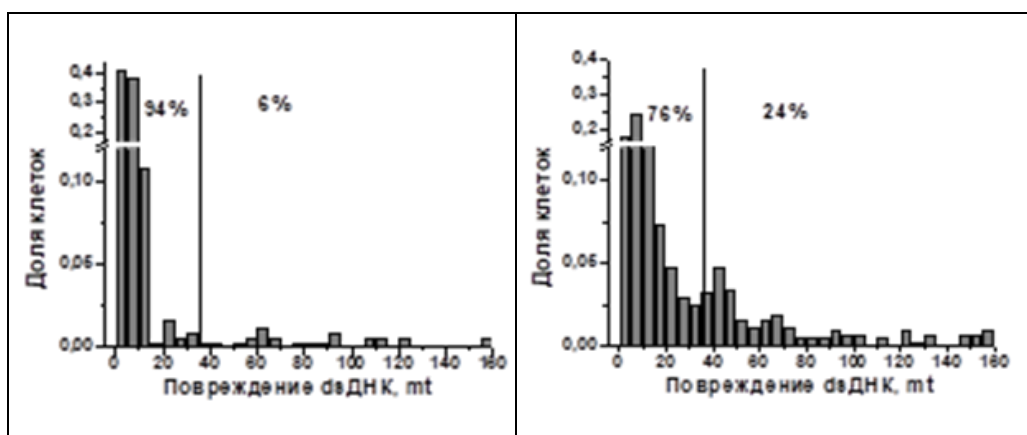


Рисунок – 14 Частотные распределения клеток MCF-7 по параметру mt (разрывы dsДНК) в интактных клетках (левая гистограмма - а) и в клетках, обработанных 0,1 mM SNP (правая гистограмма - б). Различие распределений достоверно при уровне значимости $p < 0,05$: [разработано автором]

Доля клеток с сильно поврежденной ДНК (с ДР ДНК) после инкубации с SNP возрастает до 24%, по сравнению с 6 % таких клеток в интактной популяции (рисунок 14) (что в 4 раза выше показателей контроля). Отметим, что по результатам МТТ-теста (рисунок 15) доля нежизнеспособных клеток после 24- или 48-ч инкубации с 0,1 mM SNP составляет $22 \pm 4\%$, что согласуется с результатами, полученными с помощью метода ДНК-комет.

Таким образом, основным результатом данной серии экспериментов является вывод о том, что донор катиона нитрозония (NO^+) Na-нитропруссид (SNP) вызывает двунитевые разрывы в ДНК клеток MCF-7 в течение 90 мин совместной инкубации. Доля клеток, получивших при этом сильное (невосстанавливаемое) повреждение ДНК, составляет по нашим данным 25-30% (рисунок 13, таблица 4 и

таблица 5), что близко к доле нежизнеспособных клеток по результатам, проведенного ранее, МТТ-теста при 24 и 48-часовой инкубации (22 %).

Клетки, формирующие кометы класса С4 после 1,5 ч совместной инкубации с SNP, идентифицируются как погибшие спустя 24-48ч методом МТТ. Этот результат подтверждает высокую по сравнению с ДНКЖ-MS цитотоксичность SNP и позволяет ее связать с генотоксичностью в виде ДР ДНК [21].

3.3.3 Репарация повреждений ДНК, индуцированных SNP, ДНКЖ-MS, MS-NO (RS-NO) – нитрозотиольная форма меркаптосукцината

Для понимания природы индуцированных SNP повреждений было проведено сравнение с эффектами доноров NO: ДНКЖ-MS и MS-NO, которые, как показано в разделе 3.2, обладают меньшей цитотоксичностью. Предполагается, что в случае доноров NO индуцируются преимущественно одонитевые разрывы (ОР) ДНК, которые эффективно репарируются посредством механизма эксцизионной репарации (NER). В отличие от этого, SNP (донор NO⁺) вызывает двунитевые разрывы (ДР), которые являются потенциально летальными и репарируются с меньшей эффективностью. Это согласуется с данными, полученными *in vivo* на спленоцитах мышей (см. раздел 3.5), где через 24 ч после введения SNP ОР ДНК практически полностью исчезали, тогда как ДР ДНК сохранялись в значительной доле клеток. Таким образом, наблюдаемая высокая цитотоксичность SNP обусловлена не только прямым повреждающим действием NO⁺ на ДНК, но и неспособностью клеток эффективно устранять индуцированные ДР ДНК.

3.4 Влияние дитионита натрия (SDT) на цито- и генотоксичность SNP: проверка роли NO⁺

Для проверки гипотезы о том, что катион нитрозония (NO⁺) является основным токсическим агентом в составе нитропруссиды натрия (SNP), были проведены эксперименты с использованием сильного восстановителя – дитионита

натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, SDT). Восстановление SNP приводит к превращению NO^+ в нейтральную молекулу NO, что должно ослаблять цито- и генотоксическое действие препарата, если гипотеза верна. Цитотоксичность оценивали по МТТ-тесту (жизнеспособность митохондрий), по двойному окрашиванию клеток акридиновым оранжевым (АО) и йодистым пропидием (PI) (целостность мембраны) и по нейтральному кометному анализу (двунитевые разрывы ДНК). Во всех экспериментах сравнивали эффект смеси SNP/SDT (соотношение 1:2 по концентрации) с суммой эффектов отдельных компонентов, рассчитанной как произведение измеренных жизнеспособностей (для МТТ) или долей клеток с целостной мембраной/без разрывов (для окрашивания и комет).

3.4.1 Влияние SDT на цитотоксичность SNP (МТТ-тест)

Клетки MCF-7 инкубировали в течение 24 ч с возрастающими концентрациями SNP, SDT и их смесью в соотношении 1:2. Жизнеспособность определяли по МТТ-тесту. Результаты представлены на рисунках 15 и 16.

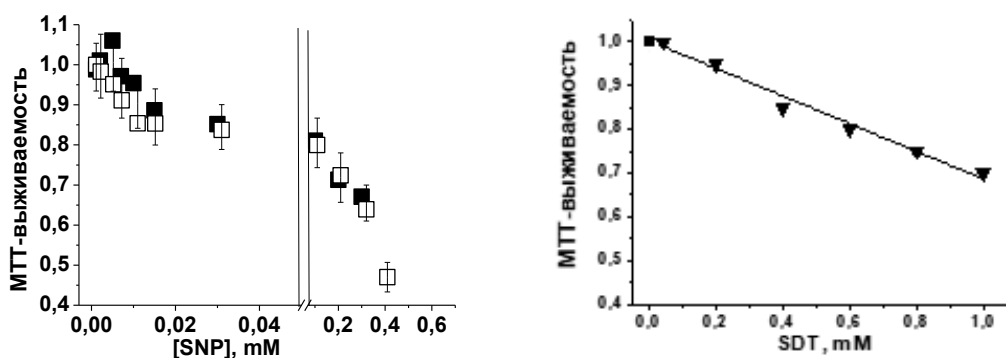


Рисунок 15 – Левая панель: снижение выживаемости клеток MCF-7 по МТТ-тесту в зависимости от концентрации нитропрусида (SNP) в культуральной среде при инкубации клеток в течение 24 (черные) и 48 часов (белые квадраты). Правая панель: изменение выживаемости клеток по МТТ-тесту при одновременном введении в среду инкубации SNP и SDT при соотношении их концентраций 1 : 2 [20]

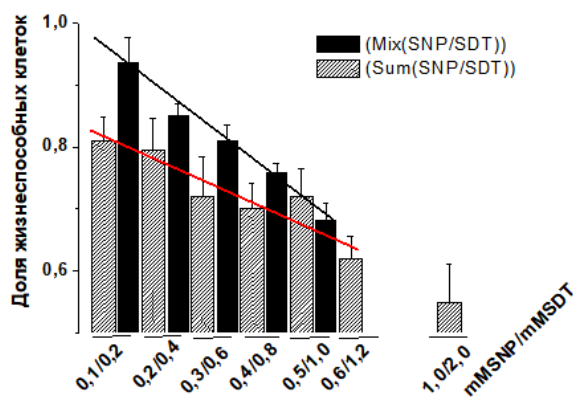


Рисунок 16 – Цитотоксичность смеси SNP/SDT (черные столбики) и расчетная сумма цитотоксичностей отдельных компонентов (серые столбики) по результатам МТТ-теста на клетках MCF-7. Концентрации SNP и SDT указаны в соотношении 1:2 (ось X – концентрация SDT). Представлены средние значения из 5 независимых экспериментов $\pm$ SE [составлено автором]

Как видно из рисунков 15 и 16, цитотоксичность смеси SNP и SDT достоверно ниже суммы цитотоксичностей компонентов, измеренных по отдельности, во всем исследованном диапазоне концентраций. Это указывает на то, что взаимодействие SNP с SDT приводит к ослаблению токсического действия, что согласуется с гипотезой о восстановлении NO^+ до NO .

SDT достоверно снижает цитотоксическое действие SNP на клетки MCF-7, что подтверждает вклад катиона NO^+ в токсический эффект нитропрусида.

3.4.2 Оценка целостности мембраны (двойное окрашивание АО/PI)

Для оценки доли клеток MCF-7 с целостной мембраной инкубировали 90 мин с SNP (0,3 mM), SDT (0,6 mM) и их смесью в тех же концентрациях, после чего окрашивали смесью акридинового оранжевого (АО) и йодистого пропидия (PI). Жизнеспособные клетки с целостной мембраной окрашивались в зеленый цвет (АО), а клетки с поврежденной мембраной – в красный (PI), пример обрабатываемых микрофотографий на рисунке 17. Результаты количественного анализа представлены на рисунке 18.

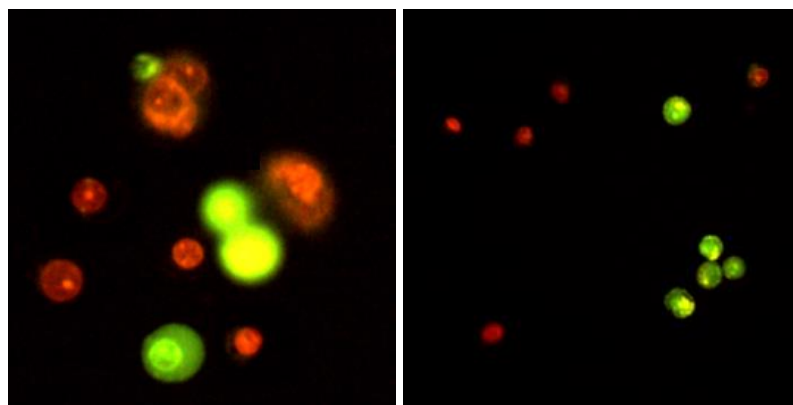


Рисунок 17 – Микрофотографии культуры клеток MCF-7 окрашенных смесью АО и PI [20]

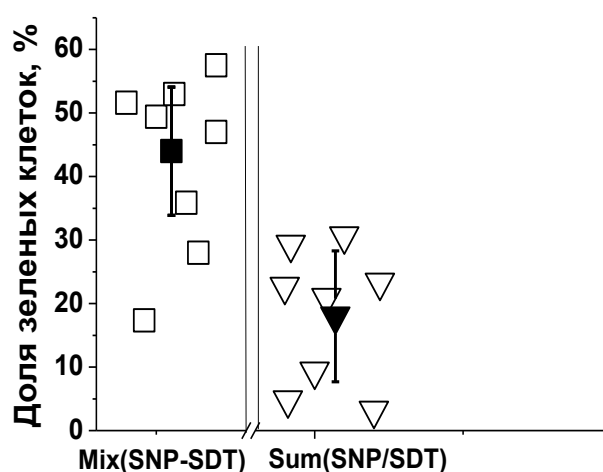


Рисунок 18 – Цитотоксичность смеси SNP+SDT (квадраты) после 90-минутной инкубации и рассчитанная суммарная цитотоксичность SNP (0,3 мМ), SDT (0,6 мМ) без учёта их взаимодействия (треугольники). Представлены усредненные результаты 8 независимых экспериментов, в каждом из которых посчитано не менее 300 клеток [20]

Данные рисунка 18 показывают, что доля клеток с целостной мембраной в смеси достоверно выше, чем расчетная сумма эффектов отдельных компонентов. Это согласуется с результатами МТТ-теста и кометного анализа и подтверждает, что SDT ослабляет цитотоксическое действие SNP, снижая мембранные повреждения.

Оценка целостности мембраны методом двойного окрашивания подтверждает снижение цитотоксичности SNP под действием SDT, что связано с восстановлением NO^+ до NO.

3.4.3 Влияние SDT на генотоксичность SNP (кометный анализ)

В связи с тем, что двунитевой разрыв (ДР) ДНК выступает для клетки потенциально летальным повреждением, в отличие от однонитевых разрывов ДНК, выбран метод нейтрального кометного анализа. Для исследования роли NO^+ в формировании ДР ДНК в клетках MCF-7 используя SDT, превращающий молекулы NO^+ из SNP в молекулы NO, оценивали влияние SDT на способность SNP индуцировать ДР ДНК. Ранее показано, что обработка SNP с помощью SDT достоверно снижала цитотоксичность SNP, оцениваемую по МТТ-жизнеспособности клеток и по целостности клеточной мембраны.

Клетки MCF-7 инкубировали с SNP (100 мкМ), SDT (200 мкМ) и их смесью в течение 90 мин, после чего проводили нейтральный кометный анализ. Оценивали долю клеток с сильно поврежденной ДНК ($mt > 30$, классы C3–C4 по классификации из раздела 3.3). Результаты представлены в таблице 6 и рисунке 19.

Обработка	Доля неповрежденных клеток ($mt \leq 30$)*	$\langle mt \rangle \pm SD, (n=4)**$
Контроль	$0,96 \pm 0,05$	$12,3 \pm 0,7$
SNP 100мкМ	$0,74 \pm 0,03$	$27,4 \pm 2,5$
SDT 200мкМ	$0,90 \pm 0,02$	$16,3 \pm 1,8$
Mix (100+200) мкМ	$0,85 \pm 0,03$	$21,6 \pm 1,3$
Sum (100+200) мкМ	$0,67 \pm 0,04$	

Таблица 6 – Доля клеток, с неповрежденной ДНК ($mt < 30$), в контрольной и обработанной агентами популяциях. Найдены суммированием числа клеток в двумерных распределениях экспериментальных точек рисунков 2, А и Б. Mix – смесь 100мкМ SNP и 200мкМ SDT; Sum – Сумма эффектов 100мкМ SNP и 200мкМ SDT при отсутствии их взаимодействия; * – среднее из 2 экспериментов $\pm$ макс. интервал; ** – среднее из 4 экспериментов $\pm$ SD [21]

Протекторный эффект SDT прослеживается в таблице 3 на уровне клеточной популяции. В экспериментальной смеси SNP и SDT ($0,85 \pm 0,03$) возрастает доля неповреждённых клеток по сравнению с клетками, обработанными только SNP

($0,74 \pm 0,03$). Рассчитанная сумма эффектов 100мкМ SNP и 200мкМ SDT ($0,67 \pm 0,04$) наоборот, даёт увеличение токсического эффекта по повреждению ДНК по сравнению с эффектом SNP ($0,74 \pm 0,03$), $p < 0,05$. наблюдается между суммой и их смесью ($0,85 \pm 0,03$). Ещё большее различие между расчётной суммой эффектов токсичности SNP и SDT ($0,67 \pm 0,04$) и эффектом экспериментальной смеси SNP и SDT ($0,85 \pm 0,03$) отражает наличие взаимодействия между SNP и SDT в смеси, в результате которого SNP из донора NO^+ превращается в донора NO [21].

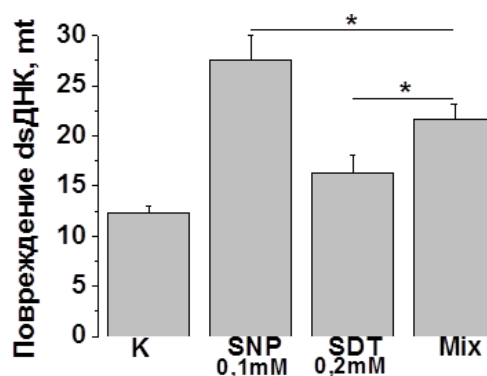


Рисунок 19 – Усредненная поврежденность двунитевой ДНК (по ДР ДНК), в клетках MCF-7, инкубированных 90 мин с SNP, SDT и их смесью. * $p < 0,05$ [21]

Данные рисунка совпадают с результатами оценки эффектов SNP и SDT, представленных на рисунке 15 и в таблице 6: SNP проявляет свою генотоксическую активность индуцируя ДР ДНК. Несмотря на небольшую собственную способность вызывать ДР ДНК в клетках (рисунок 19, столбик SDT и контроль), SDT защищает от деградации, индуцированной SNP (столбик Mix и SNP) [21].

Двунитевая деградация ДНК в клетках MCF-7 наблюдается в ранние сроки после воздействия SNP. Формирующиеся протяжённые одонитевые участки в структуре ДНК становятся доступны экзогенной S1 нуклеазе. Предположительно, такие области формируются вокруг окси-модифицированных оснований и выступают мишенями для атаки клеточных эндонуклеаз, источником ОР и ДР ДНК [142]. Плотное расположение в цепи нуклеотидов модифицированных оснований увеличивает вероятность возникновения ДР ДНК как совпадения от совмещения ОР ДНК в комплиментарных цепочках ДНК [36].

SDT достоверно снижает генотоксическое действие SNP, уменьшая долю клеток с ДР ДНК. Это подтверждает, что NO^+ является основным агентом, ответственным за индукцию ДР в ДНК.

3.4.4 Причины остаточной цито- и генотоксичности SNP после обработки SDT (ЭПР-спектроскопия)

Несмотря на достоверное снижение цито- и генотоксичности SNP в присутствии SDT, полного исчезновения токсического эффекта не наблюдалось (доля поврежденных клеток оставалась выше контрольной). Для выяснения причин остаточной токсичности был проведен анализ методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Образцы готовили в условиях, аналогичных экспериментам на клетках: растворы SNP (0,5 мМ) и SDT (1 мМ) в среде инкубации (рН 6,8) или в дистиллированной воде (рН 6,5). Регистрацию ЭПР-спектров проводили при комнатной температуре. Результаты представлены на рисунке 20.

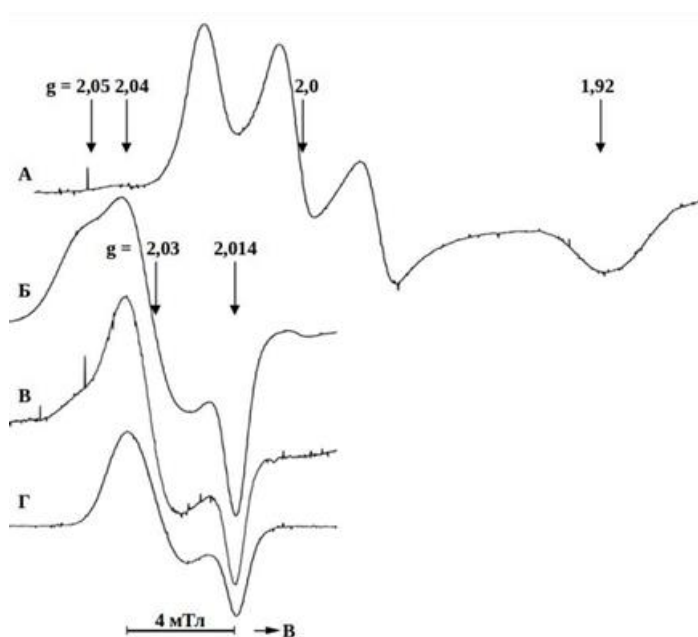


Рисунок 20 – Сигналы ЭПР: (А) – 1 мМ раствор SNP при рН 8,0 + 2 мМ SDT; (Б) – 0,5 мМ р-р SNP в среде инкубации рН 6,8 + 1 мМ SDT; (В) – 0,5 мМ р-р SNP в дистиллированной воде рН 6,5 + 1 мМ SDT; (Г) – 0,3 мМ р-р М-ДНКЖ с глутатионом использованного для оценки концентрации М-ДНКЖ и восстановленного SNP. Запись при температуре = 77 К [20]

Как видно из рисунка 20, при щелочных условиях 1 мМ раствор SNP под действием 2мМ SDT переходил из диамагнитного в парамагнитное состояние, характеризующееся сигналом ЭПР со значениями g-фактора 2,0 и 1,92 и триплетной СТС (рисунок 20, А). По форме и положению он был идентичен наблюдавшемуся ранее сигналу ЭПР SNP, восстановленного различными восстановителями в щелочной среде [154]. Оценка концентрации SNP, ответственного за этот сигнал, показала, что она в точности равна 1 мМ, т. е. в парамагнитную форму в этих условиях перешли все молекулы SNP. Если же SNP растворяли в концентрации 0,5 мМ в среде инкубации клеток при pH 6,8, то вместо сигнала, приведенного на рисунке 19, А, регистрировался сигнал со значениями g-фактора 2,05, 2,03 и 2,014, характерный для М-ДНКЖ с тиоловыми группами белков, например, альбумина, описанный в работе нашей лаборатории при участии Ванина А. Ф. и др. [155] (рисунок 20, Б). Если же аналогичную процедуру проводили с раствором SNP в дистиллированной воде при pH 6,5, то регистрировался сигнал ЭПР М-ДНКЖ с тиосульфатом (также тиол-содержащим соединением, образующимся в воде в результате распада SDT), характеризующийся двумя значениями g-фактора. (рисунок 20, В) (аналогичный описанному ранее в работе [156]. Оценка методом двойного интегрирования сигналов ЭПР концентрации М-ДНКЖ, ответственных за сигналы ЭПР (сигналы 2,03), приведённые на рисунке. 19, Б и В, показала, что в обоих случаях в М-ДНКЖ включалось примерно треть железа, входившего в состав исходных SNP. Что касается нитрозильных (NO^+) лигандов SNP, все они, превратившись в результате их восстановления до NO, в соответствии с механизмом образования М-ДНКЖ, приведенным на схеме 2, шли на образование М-ДНКЖ с тиосульфатом (три молекулы NO на один комплекс).

Таким образом образование М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами приводило к тому, что часть молекул NO, высвободившихся из SNP после его обработки дитионитом в результате их включения в М-ДНКЖ, превращалась в

катионы нитрозония, обеспечивая таким образом частичное сохранение цитотоксических свойств исходных молекул SNP, как доноров этих катионов.

Модель образования ДНКЖ с тиосульфатом из SNP и SDT представлена на схеме изображенной на рисунке 21.

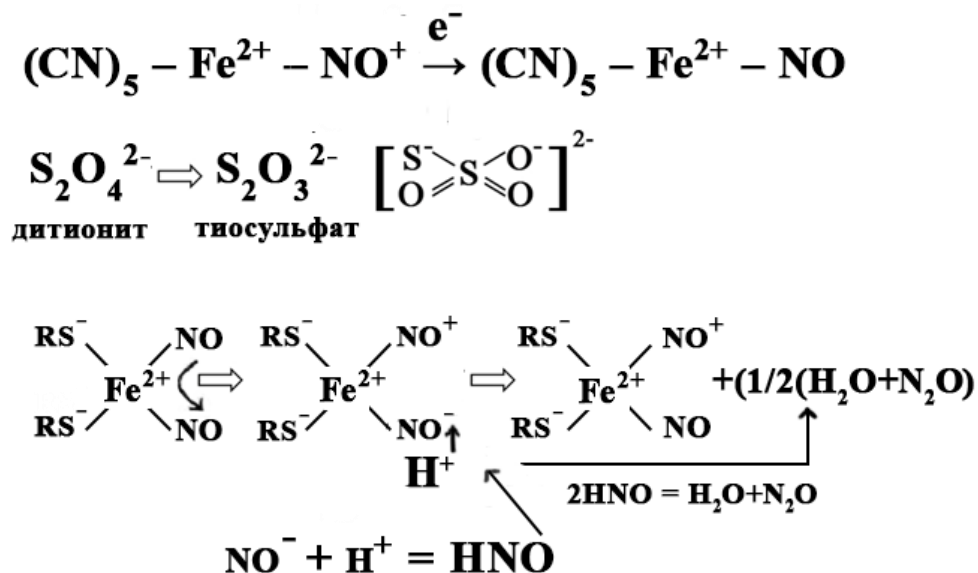


Рисунок 21 – Процесс образования ДНКЖ с тиосульфатом в результате одноэлектронного восстановления SNP дитионитом натрия в условиях, близких к физиологическим [составлено автором]

Таким образом, частичное сохранение токсичности SNP после обработки SDT обусловлено тем, что восстановление сопровождается образованием вторичных комплексов – ДНКЖ с тиосульфатом (или тиоловыми группами белков), которые являются донорами NO^+ и сохраняют токсическое действие.

Остаточная цито- и генотоксичность SNP после обработки SDT связана с образованием ДНКЖ с тиосульфатом, который сам служит источником NO^+ . Это объясняет, почему полного снятия токсического эффекта не происходит, несмотря на восстановление части NO^+ до NO.

Проведенные эксперименты с использованием дитионита натрия (SDT) как восстановительного зонда показали, что SDT достоверно снижает цитотоксичность SNP, что подтверждено МТТ-тестом и оценкой целостности мембраны (двойное окрашивание АО/PI), при этом SDT также достоверно снижает генотоксичность

SNP, уменьшая долю клеток с двунитевыми разрывами ДНК по данным нейтрального кометного анализа. В то же время полного исчезновения токсичности не происходит, что обусловлено образованием вторичных ДНКЖ с тиосульфатом (или тиолами белков), которые сами являются донорами NO^+ (подтверждено ЭПР-спектроскопией). Полученные результаты подтверждают гипотезу о ключевой роли катиона нитрозония (NO^+) в цито- и генотоксическом действии SNP и указывают на необходимость учета вторичных процессов при интерпретации эффектов восстановления.

3.5. Исследование генотоксичности SNP и влияния SDT на спленоцитах мыши *in vivo*

Для подтверждения закономерностей, выявленных в экспериментах на клеточной линии MCF-7, были проведены дополнительные исследования на мышах. Оценивали индукцию одонитевых (ОР) и двунитевых (ДР) разрывов ДНК в спленоцитах через 1 ч и 24 ч после внутрибрюшинной инъекции SNP (20 мкМ), а также влияние дитионита натрия (SDT, 40 мкМ) на генотоксичность SNP в смеси (SNP/SDT 20/40 мкМ). Использовали щелочной для ОР ДНК и нейтральный для ДР ДНК варианты метода ДНК-комет, а также двойное окрашивание для оценки морфологических изменений в клетках.

Доза SNP была ограничена его нейротоксичностью и использовалась максимально допустимая доза в 20 мкМ SNP при внутрибрюшинном введении инъекции раствора. Введение мышам концентрации выше 6 мг/кг (20 мкМ SNP) вызывала появление признаков нейротоксичности [22].

3.5.1. Индукция и репарация ОР и ДР ДНК под действием SNP

Для оценки эффективности репарации спленоциты анализировали через 1 час и 24 ч после инъекции SNP на ОР ДНК (рисунок 21, А) и ДР ДНК (рисунок 22, Б).

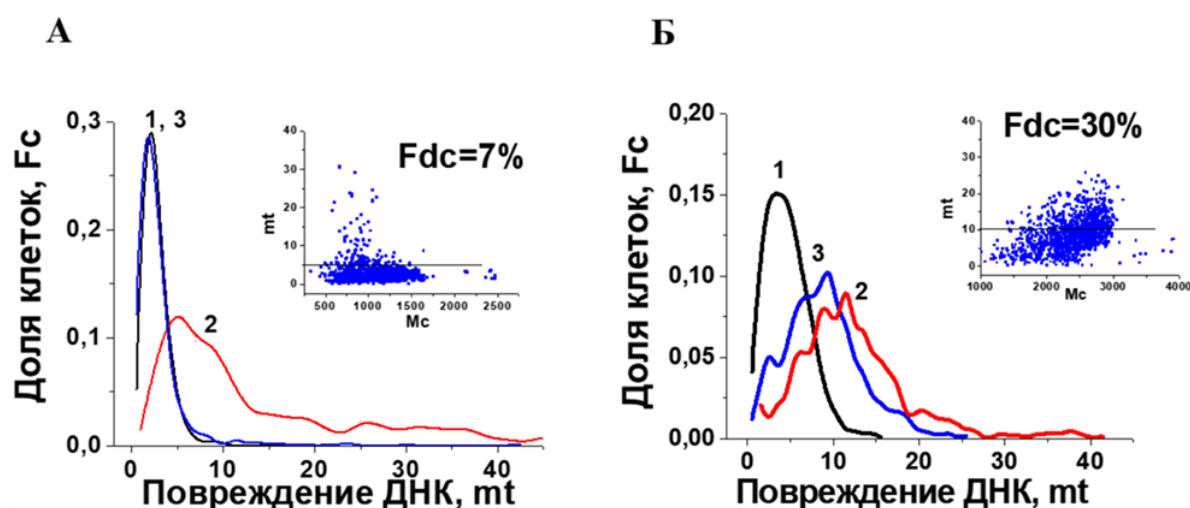


Рисунок 22 – SNP-индукция одностранных (А) и двустранных (Б) разрывов ДНК в спленоцитах мышей через 1 час и их репарация через 24 ч *in vivo*. Изменение распределений спленоцитов по mt для 1 – контрольных клеток; 2 – SNP 20 мкМ+1 час *in vivo*; 3 – SNP 20 мкМ+24 часа *in vivo*. Во вставках по mt и Mc через 24 часа, Fdc – % клеток с нерепарируемыми повреждениями ($mt > 15$), доля клеток над горизонтальной линией. Параметр mt (момент хвоста, отражающий поврежденность ДНК) Данные 5 экспериментов [22]

Как видно из рисунка 22 (панель А), через 24 ч распределение клеток по ОР практически полностью возвращается к контрольному уровню. Доля клеток с нерепарированными ОР (Fdc) составляет менее 7%, что свидетельствует об эффективной репарации одностранных разрывов. В отличие от этого, ДР (рисунок 22, Б) сохраняются в значительной доле клеток (около 30%) даже через 24 ч, хотя их количество снижается по сравнению с 1 ч. Это указывает на то, что двустранные разрывы являются более серьезными повреждениями и репарируются с меньшей эффективностью.

Одностранные разрывы ДНК, индуцированные SNP в спленоцитах, эффективно репарируются в течение 24 ч, тогда как двустранные разрывы сохраняются в значительной доле клеток, что согласуется с данными, полученными на клеточной линии MCF-7 (раздел 3.3).

Это различие объясняется более медленными и ресурсоемкими механизмами репарации ДР (гомологичная рекомбинация и нехомологичное сшивание концов). Кроме того, за 24 ч в части спленоцитов в ответ на повреждение ДНК запускаются апоптотические процессы, что исключает возможность репарации в этих клетках.

Чтобы избежать наложения генотоксического действия SNP с ферментативной апоптотической деградацией ДНК, мы выбрали время анализа 1 ч [22].

3.5.2. Оценка целостности мембраны спленоцитов

Проведена оценка целостности мембраны спленоцитов с использованием смеси красителей PI и АО через 1 ч после внутрибрюшинной инъекции препаратов (Таблица 7). Проницаемые для PI (красные/оранжевые клетки) считаются повреждёнными.

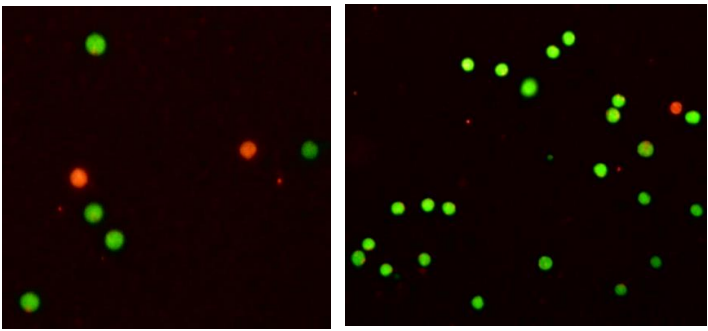
Микрофото		Воздействие	Число клеток	Доля красных, %
		Интактные	1521	10,3
		SNP 20 мкМ	1324	11,5
		SDT 40 мкМ	681	11,8
		Mix(20/40)мкМ	1163	9,4

Таблица 7 – Спленоциты мыши, окрашенные смесью красителей PI + АО, спустя 1 час после в/б инъекции препаратов. Проницаемые для PI (красные/оранжевые клетки) считаются поврежденными [22]

Как видно из таблицы 7, доля клеток с повреждённой мембраной через 1 ч после инъекции SNP (11,5%) не отличается от контрольного уровня (10,3%). Это свидетельствует о том, что индуцированные разрывы ДНК не являются следствием активации апоптотических процессов, а обусловлены прямым генотоксическим действием NO^+ , высвобождающегося из SNP. Этот вывод согласуется с данными об эффективной репарации ОР ДНК (рисунок 22, А), которая была бы невозможна при запуске необратимых апоптотических каскадов [22] и подтверждается отсутствием достоверного увеличения доли PI-позитивных клеток.

3.5.3. Влияние SDT на генотоксичность SNP *in vivo*

Для оценки влияния SDT на генотоксичность SNP *in vivo* мышам внутрибрюшинно вводили смесь SNP (20 мкМ) и SDT (40 мкМ) в соотношении 1:2. Через 1 ч после инъекции спленоциты анализировали методом комет в нейтральном варианте, позволяющем оценить ДР ДНК.

На рисунке 23 и в таблице 8 представлены распределения спленоцитов мыши по трём параметрам повреждённости ДНК. В левой колонке (A1–Г1) — двупеременные распределения M_c – m_t . Из этих распределений находится показатель повреждённости популяции клеток (F_{dc}) как доля клеток с повреждением ДНК (m_t) выше уровня повреждения контроля ($m_t = 15$, что соответствует $F_{dc} \leq 10\%$). В средней колонке (A2–Г2) — распределения клеток по параметру m_t (электрофоретическая подвижность двунитевой ДНК, пропорциональная числу ДР). В правой колонке (A3–Г3) — распределения по параметру M_c (флуоресценция PI, отражающая нарушения вторичной структуры ДНК) [22].

Обработка	m_t (среднее $\pm$ SE)	M_c (среднее $\pm$ SE, у.е.)	F_{dc} (доля клеток с $m_t > 15$, %)
Контроль	$12,3 \pm 0,7$	$100,0 \pm 5,0$	≤ 10
SNP (20 мкМ)	$27,4 \pm 2,5 *$	$65,0 \pm 4,0 *$	$35,0 \pm 4,5 *$
SDT (40 мкМ)	$15,0 \pm 1,2$	$90,0 \pm 4,0$	$15,0 \pm 3,0$
Смесь SNP/SDT (20/40 мкМ)	$18,0 \pm 1,8 *#$	$82,0 \pm 3,5 *#$	$20,0 \pm 3,5 *#$
Расчетная сумма для смеси	—	—	$42,0 \pm 5,0$

Таблица 8 – Параметры повреждения ДНК (m_t , M_c , F_{dc}) в спленоцитах мышей через 1 ч после инъекции SNP, SDT и их смеси. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с SNP и по сравнению с расчетной суммой

Как видно из таблицы 8, инъекция SNP приводила к значительному увеличению доли клеток с ДР ($F_{dc} = 35\%$) по сравнению с контролем ($\leq 10\%$). Введение SDT отдельно вызывало лишь незначительное увеличение F_{dc} (до 15%), что указывает на его слабую собственную генотоксичность. Смесь SNP/SDT

приводила к достоверному снижению Fdc (до 20%) по сравнению с действием SNP, при этом этот показатель был ниже расчётной суммы эффектов отдельных компонентов (42%). Аналогичные изменения наблюдались для параметра Mc: в смеси Mc выше, чем при действии SNP, и выше расчётной суммы. Параметр mt оказался менее чувствительным, что, вероятно, связано с тем, что Mc и Fdc учитывают не только разрывы, но и модификации оснований, приводящие к снижению интеркаляции PI [22].

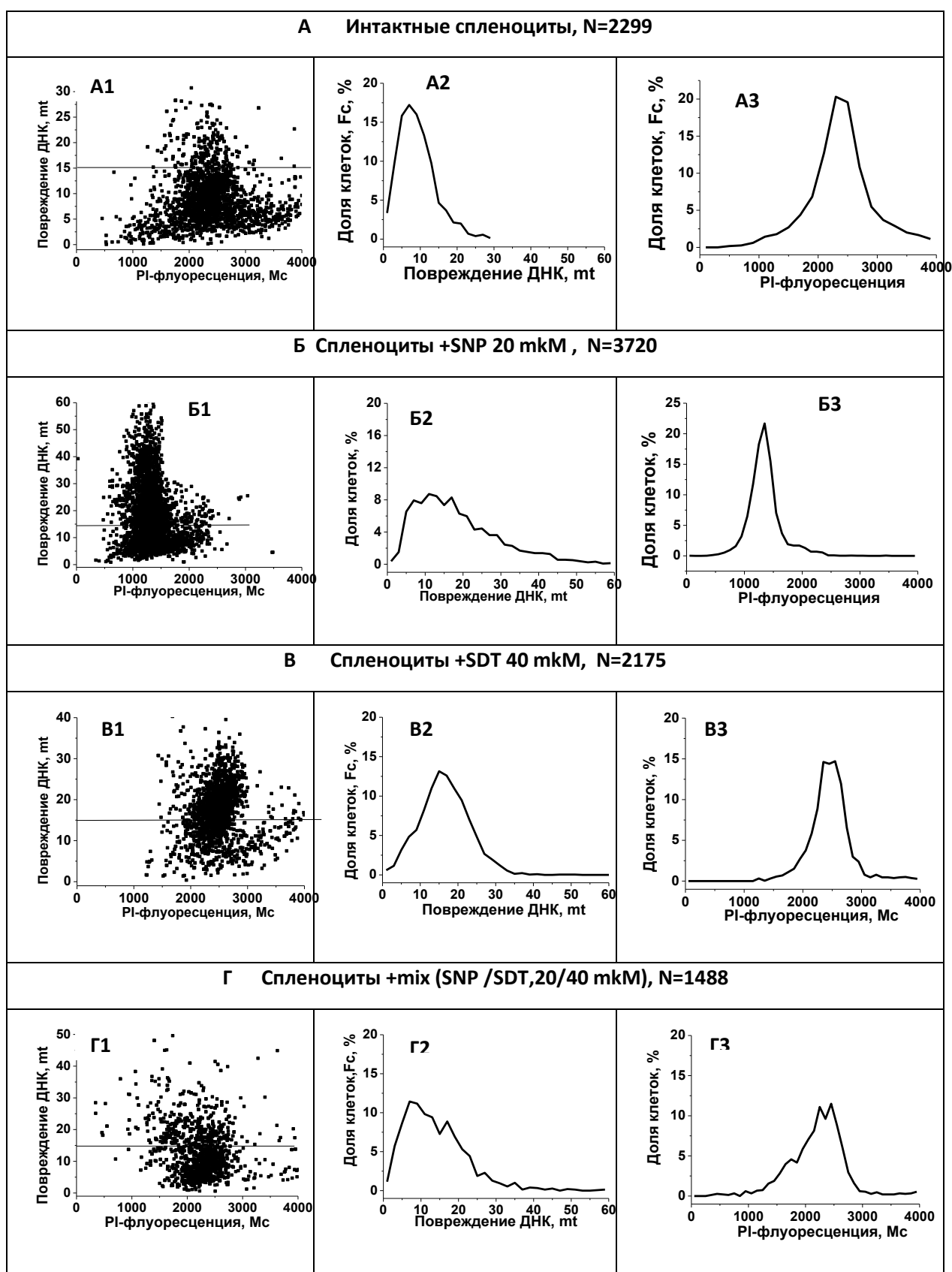


Рисунок 23 – Изменения распределений интактных спленоцитов мыши по 3-м параметрам поврежденности ДНК (A1,A2,A3) в ответ на в/б инъекции SNP 20 мкМ (Б1,Б2,Б3), SDT 40мкМ (В1,В2,В3) и их смеси 20/40 мкМ (Г1,Г2,Г3). Представлены объединенные результаты 5 экспериментов; N – число клеток, по которым строилось распределение клеток с повреждением ДНК (mt), выше уровня повреждения контроля. В нашем случае этот уровень принят за mt = 15, что соответствует Fdc в объединенном контроль $\leq 10\%$ [22]

Рисунок 24 демонстрирует изменение средних параметров повреждения ДНК mt (А), Mc (Б) и Fdc (В) в ответ на инъекции SNP, SDT и их смеси. Средние значения Mc и Fdc в смеси достоверно ниже, чем при действии SNP, и ниже рассчитанной суммы эффектов отдельных компонентов (правая колонка на Рисунке 24, В), что указывает на протекторное действие SDT в отношении генотоксичности SNP.

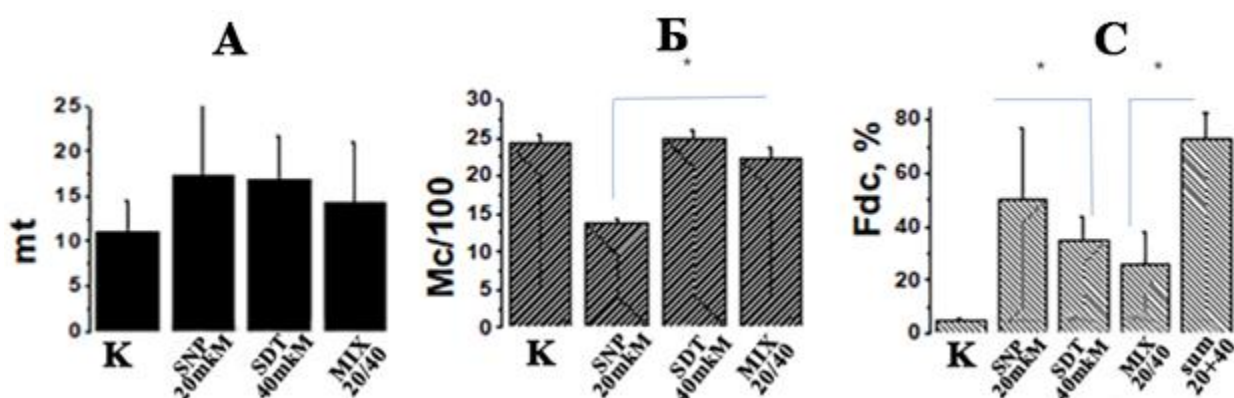


Рисунок 24 – Изменение параметров повреждения ДНК - **mt** (А), **Mc** (Б) и процента поврежденных спленоцитов мыши, **Fdc** (В) в ответ на системные инъекции SNP, SDT и их смеси. *P<0,05 [22]

Таким образом, SDT оказывает протекторное действие в отношении генотоксичности SNP и *in vivo*, снижая долю клеток с двунитевыми разрывами ДНК, что согласуется с результатами, полученными на клеточной линии MCF-7 (раздел 3.4). Эксперименты на спленоцитах мышей подтвердили, что SNP индуцирует как однонитевые, так и двунитевые разрывы ДНК уже через 1 ч после системного введения; при этом однонитевые разрывы эффективно репарируются в течение 24 ч (доля нерепарированных клеток < 7%), тогда как двунитевые разрывы сохраняются в значительной части клеток (около 30%), что коррелирует с появлением морфологических признаков апоптоза через 24 ч. Снижение индукции ДР под действием SDT на ранних сроках коррелирует с меньшей долей клеток, сохраняющих нерепарируемые повреждения через 24 ч, что подтверждает роль NO⁺ как основного генотоксического агента и в условиях целого организма.

Полученные данные согласуются с результатами экспериментов *in vitro* и свидетельствуют об универсальности механизмов действия NO⁺ на ДНК.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Цитотоксическое и генотоксическое действия доноров NO и NO⁺

Полученные в работе данные свидетельствуют о принципиальных различиях в характере цитотоксического действия доноров нейтрального NO (ДНКЖ-MS и MS-NO) и донора катиона нитрозония (SNP) на клетки MCF-7. Согласно результатам МТТ-теста, SNP вызывал значительное снижение выживаемости клеток уже через 24 ч инкубации, причём увеличение времени до 48 ч не усиливало этот эффект, что указывает на быстрое и необратимое действие NO⁺ (рисунок 11). Напротив, для доноров NO наблюдалась зависимость от времени: их цитотоксичность была ниже, а показатели жизнеспособности через 24 и 48 ч достоверно различались, что свидетельствует о вовлечении репаративных процессов.

Это различие, по нашему мнению, обусловлено разной химической природой активных форм азота. Нейтральный NO преимущественно взаимодействует с металлоцентрами, вызывая обратимые модификации, тогда как NO⁺ проявляет выраженные электрофильные свойства и способен напрямую нитрозировать основания ДНК, а также тиолы критически важных белков, что приводит к необратимым повреждениям. Подтверждение этому мы находим в работе Мойнуддина (Moinuddin) et al. (2014) [157], где показано, что инкубация экстрагированной ДНК плаценты человека с SNP (2–8 мМ) в течение 45 мин вызывает частичную денатурацию водородных связей и снижение температуры плавления ДНК почти на 10 °С. Образующиеся протяжённые одностранные участки становились доступными для S1-нуклеазы, что указывает на локальное нарушение вторичной структуры ДНК вокруг окси-модифицированных оснований.

Интересно, что в нашей работе мы не обнаружили зависимости индукции двунитевых разрывов от стадии клеточного цикла: доли повреждённых клеток в фазах G0/G1 и G2/M+S составляли 29±7% и 27±6% соответственно (табл. 5). Это отличается от данных Танака (Tanaka) et al. (2006) [158], которые на модели NO-

аспирина показали преимущественное образование ДР в S-фазе. Такое расхождение, вероятно, связано с различиями в химической структуре использованных доноров и путях их метаболизма в клетке. Можно предположить, что SNP, в отличие от NO-аспирина, генерирует активные формы азота, которые атакуют ДНК независимо от стадии клеточного цикла, возможно, за счёт более быстрой диффузии или прямого взаимодействия с хроматином.

4.2. Механизмы двунитевой деградации ДНК, индуцированной SNP

Исходя из результатов нашего исследования индукция двунитевых разрывов ДНК происходит в клетках MCF-7 уже через 90 мин инкубации с SNP (100 мкМ). Доля клеток с сильными ($mt > 40$), нерепарируемыми и ведущими к гибели клетки повреждениями двунитевой ДНК, достигала 24%, что коррелировало с долей нежизнеспособных клеток, определённой по МТТ-тесту ($22 \pm 4\%$) через 24 и 48 часов. Этот результат позволяет связать раннее накопление ДР ДНК с последующим цитотоксическим эффектом.

Возникновение ДР ДНК может быть следствием как прямого генотоксического действия SNP и его активных метаболитов, так и результатом активации процессов апоптоза. В пользу последнего свидетельствуют морфологические изменения, зафиксированные в таблице 4: конденсация хроматина по периферии ядра, фрагментация хроматина и отшнуровывание апоптотических телец. Всё это типичные признаки апоптоза, которые также наблюдались нами уже через 1,5 ч после обработки клеток SNP. Схожие изменения ранее регистрировали и другие исследователи на различных клеточных моделях, включая гепатоцеллюлярную карциному [159], хондроциты [160] и нейробластомные клетки SH-SY5Y [161], причём временной диапазон индукции апоптоза варьировался от 2 до 24 ч, что согласуется с нашей моделью.

Важная роль в апоптотической деградации ДНК принадлежит митохондриальному белку AIF (apoptosis-inducing factor). В норме AIF представляет собой 67-кДа полипептид, обладающий NADH-зависимой

оксидоредуктазной активностью, локализованный в межмембранном пространстве, и выполняет протекторную функцию в отношении дыхательных комплексов. При апоптотическом митохондриальном сигналинге AIF подвергается протеолизу, транслоцируется в цитоплазму, связывается с циклофилином А и импортируется в ядро [162]. В ядре AIF взаимодействует с различными эндонуклеазами, в частности с MIF (macrophage migration inhibitory factor), что приводит к крупномасштабной фрагментации ДНК. При этом, как показано в работе Wang и соавт. [163; 164], в клетках HeLa, обработанных алкилирующим агентом MNNG, размер формирующихся фрагментов превышал 20–50 т.п.н., что соответствует нашим наблюдениям о формировании комет классов C3–C4.

Повреждения ДНК, индуцированные SNP, могут служить триггером для активации ядерного фермента PARP-1 (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы-1). В зависимости от интенсивности и продолжительности сигнала, а также от состояния клетки, активация PARP-1 способна инициировать два пути гибели. Избыточный синтез поли(АДФ-рибозы) приводит к истощению клеточных запасов NAD^+ и последующему снижению уровня АТФ, создавая энергетический дефицит, который сенсibiliзирует митохондрии и способствует смещению баланса белков семейства Bcl-2 в сторону проапоптотических представителей. Это запускает классический митохондриальный апоптоз, сопровождающийся повышением проницаемости внешней мембраны митохондрий, высвобождением цитохрома с формированием апптосомы и активацией каспазного каскада. С другой стороны, полимеры PAR могут непосредственно связываться с AIF и индуцировать его транслокацию в ядро, где в комплексе с эндонуклеазами (в том числе ENDOG) AIF опосредует крупномасштабную фрагментацию ДНК независимо от каспаз. Этот процесс также известен как *parthanatos* [164; 165].

Митохондрии выступают в роли центрального интегратора сигналов повреждения, обеспечивая реализацию как каспаз-зависимого апоптоза, так и каспаз-независимого партанатоза. Активация этого митохондриального апоптотического центра в ответ на SNP-индуцированный стресс обусловлена одновременным действием двух механизмов: энергетическим дефицитом

вследствие гиперактивации PARP-1, который снижает порог чувствительности митохондрий к проапоптотическим стимулам, и прямым PAR-опосредованным сигналом, инициирующим транслокацию AIF. Эти процессы создают положительную обратную связь между повреждением ДНК, активацией PARP-1 и деградацией генома, усиливая оба пути гибели. Конкретный вклад каждого из этих механизмов может варьировать в зависимости от концентрации SNP, длительности воздействия и типа клеток, что согласуется с литературными данными о способности SNP как ингибировать, так и активировать PARP-1 в разных экспериментальных условиях. Многокомпонентная природа цитотоксичности доноров NO обуславливает необходимость комплексной оценки маркеров обоих путей гибели при исследовании их биологического действия.

Это также подтверждают данные, полученные Клещевым А.Л., который показал, что NO^+ преодолевает фактор Bcl-2. Bcl-2 может блокировать митохондриальный апоптоз при воздействии NO, но не блокирует апоптоз при воздействии NO^+ [26].

4.3. Вклад NO^+ в токсическое действие SNP: данные с использованием SDT

Для проверки гипотезы о том, что катион нитрозония является основным токсическим агентом в составе SNP, мы использовали сильный восстановитель — дитионит натрия (SDT), способный одноэлектронно восстанавливать NO^+ до нейтрального NO. Полученные результаты однозначно подтверждают данную гипотезу.

Во-первых, цитотоксичность смеси SNP/SDT (соотношение 1:2) по данным МТТ-теста оказалась достоверно ниже суммы цитотоксичностей отдельных компонентов во всём исследованном диапазоне концентраций (рисунок 15). Во-вторых, оценка целостности мембраны методом двойного окрашивания (AO/PI) показала, что доля клеток с целостной мембраной в смеси была выше расчётной суммы эффектов (рисунок 16). В-третьих, генотоксичность SNP, оцениваемая по

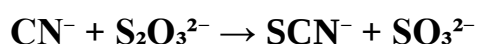
доле клеток с ДР ($mt > 30$), снижалась с 28% до 14% при добавлении SDT (табл. 6). Эти данные согласуются с результатами, полученными на спленоцитах мышей *in vivo* (таблица 8, рисунок 23), где смесь SNP/SDT также давала меньшую долю повреждённых клеток (20%) по сравнению с расчётной суммой эффектов (42%).

Тем не менее полного исчезновения токсичности не происходило, что обусловлено образованием вторичных комплексов – моноядерных динитрозильных комплексов железа (М-ДНКЖ) с тиосульфатом или тиоловыми группами белков, которые сами являются донорами NO^+ . Это подтверждено данными ЭПР-спектроскопии (рисунки 20, 21), где в среде инкубации (pH 6,8), вместо сигнала восстановленного SNP регистрировался сигнал с g-факторами 2,05; 2,03; 2,014, характерный для М-ДНКЖ. Таким образом, даже при восстановлении части NO^+ до NO часть SNP трансформируется в ДНКЖ, сохраняющий донорную активность. Этот результат объясняет, почему цитотоксическое действие SNP не может быть полностью устранено путём одноэлектронного восстановления, что согласуется с литературными данными [130] о постоянном присутствии ДНКЖ в организмах млекопитающих.

4.4. Цианид-ионы не являются причиной цитотоксичности SNP

Наличие ионов цианида в составе нитропрусида натрия (SNP) долгое время считалось основной причиной его токсичности. Действительно, при длительном применении SNP в клинике иногда наблюдались случаи цианидной интоксикации, что требовало введения антидотов [166-170]. Однако в подавляющем большинстве случаев распад SNP с высвобождением свободного цианида не происходит, поскольку железо-цианидные комплексы, образующиеся после высвобождения NO^+ , обладают высокой устойчивостью [116; 117].

Ключевым механизмом детоксикации цианида в организме является фермент роданаза (тиоцианат-цианид-серотрансфераза), который катализирует превращение цианида в тиоцианат (SCN^-) по реакции:



Тиоцианат (также называемый роданид) является нетоксичным продуктом, который выводится из организма [116; 117; 171].

В наших экспериментальных условиях (концентрация SNP ≤ 100 мкМ *in vitro* и 20 мкМ *in vivo*) количество потенциально высвобождающегося цианида невелико. Как показано в разделе 3.4.4, при восстановлении SNP дитионитом натрия (SDT) около 30% железа SNP включается в состав М-ДНКЖ с тиосульфатом или тиоловыми группами белков. Оставшееся железо остается стабильно связано с молекулами цианида в виде пентацианоферрат-ионов $\text{Fe}(\text{CN})_5$, которые в нейтральных условиях могут превращаться в еще более устойчивый ферроцианид $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$.

Образующийся при распаде SDT тиосульфат выполняет двойную функцию. Часть его (около 0.6 мМ из 2 мМ) расходуется на формирование ДНКЖ, где выступает лигандом. Оставшийся тиосульфат обеспечивает эффективную нейтрализацию цианида, который может высвободиться при определенных условиях из комплексов $\text{Fe}(\text{CN})_5$. В присутствии тиосульфата свободный цианид быстро превращается в нетоксичный тиоцианат (SCN^-). Таким образом, количества образующегося тиосульфата оказывается достаточно для полной нейтрализации всего потенциально высвобождающегося цианида [116; 117].

Важно отметить, что сам SNP без добавления SDT не высвобождает свободный цианид больших количествах, так как все его молекулы находятся в форме стабильных $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -комплексов. В этом случае токсичность SNP обусловлена исключительно катионом нитрозония (NO^+) в его составе. В клинических условиях (например, при масштабных воспалительных процессах с локальным ацидозом) токсичность цианида может возрастать, так как протоны способствуют диссоциации $\text{Fe}(\text{CN})_5$ -комплексов с образованием HCN. Однако в наших экспериментальных системах этот вклад был минимальным [23; 116; 117; 171].

Таким образом, вклад цианидной компоненты в токсичность SNP при использованных концентрациях (не более 100 мкМ) минимален, и основная роль принадлежит именно катиону нитрозония (NO^+). Полученные нами данные

согласуются с литературными сообщениями о том, что образующийся в результате распада SNP — цианоферрат $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ биологически инертен, а свободный цианид в реакционной смеси не обнаруживается благодаря эффективной работе роданазной системы

4.5. Сопоставление результатов *in vitro* и *in vivo*

Эксперименты на спленоцитах мышей не только подтвердили основные закономерности, выявленные на клеточной линии MCF-7, но и позволили оценить эффективность репарационных процессов в условиях целого организма. Через 1 ч после системного введения SNP (20 мкМ) наблюдалось значительное увеличение доли клеток с ОР и ДР ДНК (рисунок 22). Однако через 24 ч одонитевые разрывы практически полностью исчезали (доля нерепарированных клеток < 7%), тогда как двунитевые разрывы сохранялись в примерно 30% клеток (рисунок 24). Это различие в кинетике репарации свидетельствует о том, что ОР являются менее серьёзными повреждениями и эффективно устраняются механизмами эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), тогда как ДР, будучи более грубыми нарушениями структуры ДНК, репарируются с меньшей эффективностью и могут инициировать апоптоз.

Полученные данные хорошо согласуются с работой, где показано, что системное введение мышам SNP в дозах 0,67–6 мг/кг (эквивалент 2,2–20 мкМ) индуцировало ОР в ДНК только клеток селезёнки и перитонеальных макрофагов, но не в других тканях [24]. Это указывает на тканевую специфичность действия SNP, возможно, связанную с различной активностью нитрозилирующих ферментов или плотностью рецепторов для активных форм азота. Мы полагаем всё дело в отсутствии восстановителей в селезенке, что увеличивает долю потенциальных молекул NO^+ из SNP. Таким образом, *in vivo* модель подтверждает, что SNP индуцирует цитотоксический и генотоксический стресс, который при недостаточной репарации переходит в апоптотическую гибель клеток.

4.6. Сопоставление с современными представлениями о механизмах повреждения ДНК

Наши результаты хорошо вписываются в современную концепцию о том, что активные формы азота могут вызывать два типа повреждений ДНК: прямые модификации оснований (окислительное дезаминирование, нитрозирование) и опосредованные через активацию апоптотических каскадов. Интересно, что в работе [172] показано, что на эпителиальных клетках пищевода Барретта донор NO (MAHMA NONOate, 25–100 мкМ) вызывал ДР, которые репарировались в течение 60 мин и не отражались на выживаемости клеток. В нашей модели ДР, индуцированные SNP, репарировались менее эффективно (сохранялись в 24% клеток через 24 ч), что, вероятно, связано с более интенсивным и продолжительным воздействием NO⁺.

Таким образом, мы предлагаем следующую последовательность событий: SNP → высвобождение NO⁺ → нитрозирование оснований ДНК и тиолов белков → образование апуриновых/апиримидиновых сайтов → расхождение цепей ДНК → атака эндонуклеазами → ОР и ДР ДНК. Параллельно NO⁺ активирует митохондриальный путь апоптоза через AIF/DAFF (факторы индуцирующие апоптоз и фрагментацию ДНК), что усиливает ДР-деградацию хроматина. В случае недостаточной репарации клетки гибнут, что и регистрируется в МТТ-тесте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование позволило установить, что нитропруссид натрия (SNP) как донор катиона нитрозония (NO^+) обладает значительно более выраженным цитотоксическим и генотоксическим действием на клетки MCF-7 по сравнению с донорами нейтрального NO (ДНКЖ-MS и MS-NO). Это различие обусловлено химической природой NO^+ , который, в отличие от NO, способен напрямую нитрозировать основания ДНК и тиол-содержащие белки, вызывая необратимые повреждения, не требующие репаративных этапов.

Ключевым результатом работы является демонстрация того, что SNP индуцирует двунитевые разрывы ДНК в клетках MCF-7 уже через 90 мин инкубации, причём доля клеток с невозстанавливаемыми повреждениями (24%) коррелирует с долей нежизнеспособных клеток по МТТ-тесту ($22 \pm 4\%$). Генотоксическое действие SNP не зависит от стадии клеточного цикла, что отличает его от некоторых других доноров NO, описанных в литературе. Обнаруженные морфологические признаки апоптоза (конденсация хроматина, фрагментация ядра) свидетельствуют о вовлечении митохондриального пути с участием AIF/DAF-каскада, что объясняет крупномасштабную деградацию ДНК.

С использованием сильного восстановителя – дитионита натрия (SDT) – впервые количественно доказано, что восстановление NO^+ до NO достоверно снижает цито- и генотоксичность SNP, подтверждая гипотезу о ведущей роли NO^+ в токсическом эффекте. Однако полное исчезновение токсичности не достигается, поскольку при восстановлении SNP образуются вторичные мооядерные ДНКЖ с тиосульфатом, которые сами являются донорами NO^+ , что подтверждено ЭПР-спектроскопией.

Эксперименты на спленоцитах мышей подтвердили выявленные закономерности: SNP индуцирует как одонитевые, так и двунитевые разрывы ДНК *in vivo*, причём одонитевые эффективно репарируются в течение 24 ч, тогда как двунитевые сохраняются в значительной доле клеток (около 30%), что коррелирует с апоптотической гибелью клеток. Протекторное действие SDT в

условиях целого организма также согласуется с результатами, полученными на клеточной линии.

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет заключить, что катион нитрозония (NO^+) является основным токсическим фактором в действии нитропрусида натрия на клетки млекопитающих, а его эффект реализуется через прямое повреждение ДНК, активацию митохондриального апоптоза и последующую ферментативную деградацию хроматина. Полученные результаты имеют значение для понимания механизмов действия нитрозирующих агентов и могут быть использованы при разработке подходов к модуляции их токсичности в терапевтических целях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

NO – оксид азота

NO⁺ – катион нитрозония (нитрозильный катион)

ДНКЖ – динитрозильный комплекс железа

ONOO⁻ – пероксинитрит

O₂•⁻ – супероксид-анион

SNP – нитропруссид натрия (sodium nitroprusside)

SDT – дитионит натрия (sodium dithionite)

NOS – NO-синтаза

NO⁻ – нитроксильный анион

М-ДНКЖ – мооядерный динитрозильный комплекс железа

Б-ДНКЖ – биядерный динитрозильный комплекс железа

МНКЖ – мононитрозильный комплекс железа

ДЭТК – диэтилдитиокарбамат

НАС – N-ацетил-L-цистеин

MS – меркаптосукцинат

МГД – N-метил-D-глюкаминдитиокарбамат

GSH – восстановленный глутатион

DMEM – среда Игла, модифицированная Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline)

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (реагент для МТТ-теста)

DMSO – диметилсульфоксид

ЩЛС – щелочелабильные сайты

PI – йодистый пропидий (пропидиум йодид)

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

СКС – статистика Колмогорова–Смирнова

NER – эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair)

ОР – одностанические разрывы ДНК

ДР – двустанические разрывы ДНК

АП-сайты – апуриновые и апиридиновые сайты

PARP-1 – поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1

AIF – фактор, индуцирующий апоптоз (apoptosis-inducing factor)

DFF – фактор фрагментации ДНК (DNA fragmentation factor)

Ключевые слова: Нитропруссид натрия; катион нитрозония; оксид азота; цитотоксичность; генотоксичность; динитрозильные комплексы железа; двустанические разрывы ДНК; метод ДНК-комет; клетки MCF-7; спленоциты; апоптоз; репарация ДНК; дитионит натрия; ЭПР-спектроскопия; МТТ-тест.

Key Words: sodium nitroprusside; nitrosonium cation; nitric oxide; cytotoxicity; genotoxicity; dinitrosyl iron complexes; DNA double-strand breaks; comet assay; MCF-7 cells; splenocytes; apoptosis; DNA repair; sodium dithionite; EPR spectroscopy; MTT assay.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванин, А.Ф. Позитивное (регуляторное) и негативное (цитотоксическое) действие динитрозильных комплексов железа на живые организмы // Биохимия. – 2022. – Т. 87, № 11. – С. 1739–1760.
2. WHO. Global antibiotic resistance surveillance report 2025. – Geneva: World Health Organization, 2025. – 20 p. – Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240116337>.
3. Fang, F.C. Antimicrobial actions of reactive nitrogen species // Current Opinion in Microbiology. – 2004. – Vol. 7, No 4. – P. 387–393. – DOI: 10.1016/j.mib.2004.06.012.
4. Richardson, A.R. Nitric oxide advances anaerobic growth of *Escherichia coli* / A.R. Richardson, B.J. Dunphy, P.S. Stewart, E.P. Skaar // Journal of Bacteriology. – 1998. – Vol. 180, No 13. – P. 3594–3601. – PMID: 9642212.
5. De La Fuente-Núñez, C. Inhibition of bacterial biofilm formation and quorum sensing by a nitric oxide-releasing macromolecule / C. De La Fuente-Núñez, F. Reffuveille, K.E. Fairfull-Smith, R.E.W. Hancock // Angewandte Chemie International Edition. – 2014. – Vol. 53, No 31. – P. 8056–8060. – DOI: 10.1002/anie.201402858.
6. Shafreen, R.M. Synergistic effect of nitric oxide releasing compound and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms / R.M. Shafreen, S. Selvaraj, P.M. Sivakumar // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2020. – Vol. 64, No 5. – e02345-19. – DOI: 10.1128/AAC.02345-19.
7. Nathan, C. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens / C. Nathan, M.U. Shiloh // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2000. – Vol. 97, No 16. – P. 8841–8848. – DOI: 10.1073/pnas.97.16.8841.
8. Hetrick, E.M. Rapidly eradicating *Staphylococcus aureus* biofilms using nitric oxide-generating nanostructures / E.M. Hetrick, J.H. Shin, H.S. Paul, M.H. Schoenfisch // ACS Nano. – 2009. – Vol. 3, No 9. – P. 2663–2671. – DOI: 10.1021/nn9004288.

9. Giacco, F. Oxidative stress and diabetic complications / F. Giacco, M. Brownlee // *Circulation Research*. – 2010. – Vol. 107, No 9. – P. 1058–1070. – DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
10. Török, J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension // *Physiological Research*. – 2008. – Vol. 57, No 6. – P. 813–825. – DOI: 10.33549/physiolres.931569.
11. Reina-Torres, E. The vital role for nitric oxide in intraocular pressure homeostasis / E. Reina-Torres, M.L. De Ieso, L.R. Pasquale, M. Madekurozwa, J. van Batenburg-Sherwood, D.R. Overby, W.D. Stamer // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2021. – Vol. 83. – Art. No. 100922. – DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100922.
12. Burgova, E.N. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as a nitric oxide donor in the treatment of experimental endometriosis / E.N. Burgova, N.A. Tkachev, L.V. Adamyan, A.F. Vanin // *Nitric Oxide*. – 2019. – Vol. 87. – P. 1–8. – DOI: 10.1016/j.niox.2019.02.007.
13. Carmeliet, P. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases / P. Carmeliet, R.K. Jain // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2011. – Vol. 10, No 6. – P. 417–427. – DOI: 10.1038/nrd3455.
14. Wu, S.C. Water-Soluble Dinitrosyl Iron Complex (DNIC): A Nitric Oxide Vehicle Triggering Cancer Cell Death via Apoptosis / S.C. Wu, T.T. Lu, Y.N. Chen, S.J. Chiou, W.F. Liaw // *Inorganic Chemistry*. – 2016. – Vol. 55, No 18. – P. 9383–9392. – DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b01278.
15. Friederich, J.A. Sodium Nitroprusside: Twenty Years and Counting / J.A. Friederich, J.F. Butterworth // *Anesthesia & Analgesia*. – 1995. – Vol. 81, No 1. – P. 152–162. – DOI: 10.1097/00000539-199507000-00031.
16. Garatti, L. Sodium nitroprusside in acute heart failure: A multicenter historic cohort study / L. Garatti, S. Frea, S. Pidello, F. Canavosio, S. Bergerone, M. Morello, G. Giolitto, L. De Luca // *International Journal of Cardiology*. – 2022. – Vol. 369. – P. 37–44. – DOI: 10.1016/j.ijcard.2022.08.022.
17. Li, X. Sodium nitroprusside improves high fat diet induced intestinal dysfunction by modulating gut microbiota and oxidative stress in rats / X. Li, C. Sun, C.

Wang, L. Ma, H. Zhang, X. Li, Y. Zhao, Y. Li // *Molecular Medicine Reports*. – 2021. – Vol. 24, No 3. – Art. No. 622. – DOI: 10.3892/mmr.2021.12261.

18. Zoupa, E. The Nitric Oxide (NO) Donor Sodium Nitroprusside (SNP) and Its Potential for the Schizophrenia Therapy: Lights and Shadows / E. Zoupa, N. Pitsikas // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, No 11. – Art. No. 3196. – DOI: 10.3390/molecules26113196.

19. Hall, V.A. Sodium nitroprusside-induced cyanide intoxication and prevention with sodium thiosulfate prophylaxis / V.A. Hall, J.M. Guest // *American Journal of Critical Care*. – 1992. – Vol. 1, No 2. – P. 19–25. – PMID: 1307909.

20. Ванин, А.Ф. Катион нитрозония как компонент нитропруссиды, определяющий его цитотоксичность / А.Ф. Ванин, В.А. Тронов, Н.Е. Трифонова, Е.И. Некрасова, В.Д. Микоян, Н.А. Ткачев // *Биофизика*. – 2025. – Т. 70, № 1. – С. 122–128.

21. Тронов, В.А. Генотоксичность нитропруссиды как донора катиона нитрозония / В.А. Тронов, Н.Е. Трифонова, Е.И. Некрасова, А.Ф. Ванин // *Биофизика*. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 749–756. DOI: 10.7868/S3034527825040145.

22. Тронов, В.А. Генотоксическое действие нитропруссиды на спленоциты мышей *in vivo*. Поклеточный ДНК-кометный анализ / В.А. Тронов, Н.Е. Трифонова, Е.И. Некрасова, А.Ф. Ванин // *Биофизика*. – 2027. – Т. 72, № 1.

23. Ванин, А.Ф. Цитотоксичность нитропруссиды при физиологических значениях pH определяется не анионами цианида, входящим в его состав, а катионом нитрозония (Обзор) / А.Ф. Ванин, Н.Е. Трифонова, В.А. Тронов, К.Б. Шумаев, Н.А. Ткачев, В.Д. Микоян // *Биофизика*. – 2026. – Т. 71, № 6.

24. Lin, W. Genotoxicity of nitric oxide produced from sodium nitroprusside / W. Lin, H. Xue, S. Liu, Y. He, J. Fu, Z. Zhou // *Mutation Research*. – 1998. – Vol. 413, No 2. – P. 121–127. – DOI: 10.1016/S1383-5718(98)00024-X.

25. Khan, S. Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation / S. Khan, M. Kayahara, U. Joashi, N.D. Mazarakis, C. Sarraf, A.D. Edwards, M.N. Hughes, H. Mehmet // *Journal of Cell Science*. – 1997. – Vol. 110, Pt 18. – P. 2315–2322. – DOI: 10.1242/jcs.110.18.2315.

26. Kleschyov, A.L. Dinitrosyl-iron triggers apoptosis in Jurkat cells despite overexpression of Bcl-2 / A.L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 40, No 8. – P. 1340–1348. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.001.
27. Borodulin, R.R. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO⁺ donors / R.R. Borodulin, L.N. Kubrina, V.D. Mikoyan, A.P. Poltorakov, V.O. Shvydkiy, D.Sh. Burbaev, V.A. Serezhenkov, E.R. Yakhontova, A.F. Vanin // *Nitric Oxide*. – 2013. – Vol. 29. – P. 4–16. – DOI: 10.1016/j.niox.2012.11.001.
28. Lu, T.-T. Bioinorganic chemistry of the natural [Fe(NO)₂] motif: evolution of a functional model for NO-related biomedical application and revolutionary development of a translational model / T.-T. Lu, Y.-M. Wang, C.-H. Hung, S.-J. Chiou, W.-F. Liaw // *Inorganic Chemistry*. – 2018. – Vol. 57. – P. 12425–12443. – DOI: 10.1021/acs.inorgchem.8b01818.
29. Vanin, A.F. Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF7 human breast cancer cell culture) / A.F. Vanin, V.A. Tronov, R.R. Borodulin // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2021. – Vol. 79. – P. 93–102. – DOI: 10.1007/s12013-020-00962-x.
30. Ванин, А.Ф. Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* опосредовано катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов / А.Ф. Ванин, В.И. Телегина, В.Д. Микоян, Н.А. Ткачев, С.В. Васильева // *Биофизика*. – 2022. – Т. 67, № 5. – С. 761–767. – DOI: 10.1134/S0006350922050207.
31. Васильева, С.В. Катион нитрозония NO⁺ ингибирует функции оксида азота в регуляции образования биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* / С.В. Васильева, Н.В. Алексеева, Ю.М. Романова, А.Ф. Ванин // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2023. – Т. 38, № 1. – С. 29–33. – DOI: 10.3103/S089141682301010X.
32. Ванин, А.Ф., Шиповалов А.В., Островская Л.А., Пьянков О.В., Корман Д.Б., Рыкова В.А., Блюхтерова Н.В., Ткачев Н.А., Багрянская Е.Г. Противовирусное

и противоопухолевое действие динитрозильных комплексов железа с тиол-содержащими лигандами *in vivo* (на примере «ковидного» SARS-CoV-2 вируса и перививной саркомы Льюис). Сходство и различие (Обзор) // Биофизика. – 2024. – Т. 69, № 6.

33. Шиповалов, А.В. Противовирусное действие в отношении SARS-CoV-2 растворов динитрозильных комплексов железа при ингаляции сирийским хомячком в «nose-only» камере / А.В. Шиповалов, А.Ф. Ванин, Н.А. Ткачев, О.В. Пьянков, Н.Б. Асанбаева, С.В. Аньков, Е.Г. Багрянская, А.М. Бакланов, С.В. Валиулин, М.Е. Стекленёва // Биофизика. – 2024. – Т. 69, № 6. – С. 1318–1328. – DOI: 10.31857/S0006302924060176.

34. Mašek, J. Kinetic studies of the nitroprusside acid-base equilibria / J. Mašek, H. Wendt // *Inorganica Chimica Acta*. – 1969. – Vol. 3. – P. 455–458.

35. Russell, T.M. Glutathione S Transferases as Potential Targets for Modulation of Nitric Oxide Mediated Vasodilation / T.M. Russell, D.R. Richardson // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12, No 9. – Art. No. 1292. – DOI: 10.3390/biom12091292.

36. Тронов, В.А. Гено- и цитотоксическое действие динитрозильного комплекса железа с меркаптосукцинатом на клетки MCF-7 / В.А. Тронов, Н.А. Ткачев, Е.И. Некрасова, А.Ф. Ванин // Цитология. – 2022. – Т. 64, № 5. – С. 1–9. – УДК: 57.085.23.

37. Denicola, A. Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching / A. Denicola, J.M. Souza, R. Radi, E. Lissi // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1996. – Vol. 328, No 1. – P. 208–212. – DOI: 10.1006/abbi.1996.0162.

38. Moller, M.N. Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein / M.N. Moller, H. Botti, C. Batthyany, H. Rubbo, R. Radi, A. Denicola // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, No 10. – P. 8850–8854. – DOI: 10.1074/jbc.M413699200.

39. Furchgott, R.F. The photoactivated relaxation of smooth muscle of rabbit aorta / R.F. Furchgott, S.J. Ehrreich, E. Greenblatt // *The Journal of General Physiology*. – 1961. – Vol. 44, No 3. – P. 499–519. – DOI: 10.1085/jgp.44.3.499.

40. Furchgott, R.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki // *British Journal of Pharmacology*. – 1980. – Vol. 70, No 3. – P. 441–445.
41. Arnold, W.P. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin, and nitric oxide in various tissue preparations and intact cells / W.P. Arnold, C.K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1977. – Vol. 74, No 10. – P. 4362–4366.
42. Ignarro, L.J. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide / L.J. Ignarro, G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, G. Chaudhuri // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1987. – Vol. 84, No 24. – P. 9265–9269. – DOI: 10.1073/pnas.84.24.9265.
43. Palmer, R.M.J. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor / R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada // *Nature*. – 1987. – Vol. 327. – P. 524–526.
44. Press release. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach 2025. – URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/press-release/>.
45. Ванин, А.Ф. Налбандян, Р.М. Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках // *Биофизика*. – 1965. – Т. 10, № 1. – С. 167–168. – PMID: 5867978.
46. Ванин, А.Ф. Идентификация комплексов дивалентного железа с цистеином в биологических системах методом ЭПР // *Биохимия*. – 1967. – Т. 32. – С. 228–232.
47. Vanin, A.F. Why Does not Oxygen as an Oxidizer of Nitric Oxide Eliminate it from the Human and Animals' Organism? (The Role of EPR Active Dinitosyl Iron Complexes with Thiol Containing Ligands in the Preservation of Nitric Oxide in These Organisms) // *Applied Magnetic Resonance*. – 2025. – DOI: 10.1007/s00723-025-01772-1.
48. Moncada, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology / S. Moncada, R.M. Palmer, E.A. Higgs // *Pharmacological Reviews*. – 1991. – Vol. 43, No 2. – P. 109–142. – PMID: 1852778.

49. Knowles, R.G. Nitric oxide synthases in mammals / R.G. Knowles, S. Moncada // *Biochemical Journal*. – 1994. – Vol. 298, Pt 2. – P. 249–258.
50. Alderton, W.K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles // *Biochemical Journal*. – 2001. – Vol. 357, No 3. – P. 593–615.
51. Меньщикова, Е.Б. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.П. Реутов // *Биохимия*. – 2000. – Т. 65, вып. 4. – С. 485–503.
52. Farah, C. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease / C. Farah, L. Michel, J. Balligand // *Nature Reviews Cardiology*. – 2018. – Vol. 15, No 5. – P. 292–316. – DOI: 10.1038/nrcardio.2017.224.
53. Dixon, J.S. Development of nerves containing nitric oxide synthase in the human male urogenital organs / J.S. Dixon, P.Y. Jen // *British Journal of Urology*. – 1995. – Vol. 76, No 6. – P. 719–725. – DOI: 10.1111/j.1464-410x.1995.tb00763.x. – PMID: 8535715.
54. Николлс, Дж.Г. От нейрона к мозгу / Дж.Г. Николлс, А.Р. Мартин, Б.Дж. Валлас, П.А. Фукс; пер. с англ. – М.: Едиториал УРСС, 2003. – 672 с.
55. Wink, D.A. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide / D.A. Wink, J.B. Mitchell // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1998. – Vol. 25, No 4-5. – P. 434–456.
56. Du, X.L. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by post-translational modification at the Akt site / X.L. Du et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2001. – Vol. 108. – P. 1341–1348.
57. Sanders, K.M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission / K.M. Sanders, S.M. Ward // *American Journal of Physiology*. – 1992. – Vol. 262, No 3 Pt 1. – P. G379–G392.
58. Loscalzo, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis / J. Loscalzo // *Circulation Research*. – 2001. – Vol. 88, No 8. – P. 756–762. – DOI: 10.1161/hh0801.089861. – PMID: 11325866.

59. Воробьева, Е.Н. К вопросу патогенеза болезней системы кровообращения / Е.Н. Воробьева, И.В. Осипова, Р.И. Воробьев, Ю.В. Трещутина // КВТиП. – 2006. – № 5.
60. Radi, R. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide / R. Radi, J.S. Beckman, K.M. Bush, B.A. Freeman // *Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – Vol. 266, No 28. – P. 4244–4250.
61. Beckman, J.S. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation / J.S. Beckman, J.P. Crow // *Biochemical Society Transactions*. – 1993. – Vol. 21, No 2. – P. 330–334. – DOI: 10.1042/bst0210330. – PMID: 8395426.
62. Beckman, J.S. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly / J.S. Beckman, W.H. Koppenol // *American Journal of Physiology*. – 1996. – Vol. 271, No 5. – P. C1424–C1437.
63. Нагорнев, В.А. / В.А. Нагорнев, С.А. Кетлинский // *Бюллетень экспериментальной биологии*. – 1998. – Т. 128, № 10. – С. 364–371.
64. Liu, R.H., Hotchkiss J.H. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: A review // *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. – 1995. – Vol. 339, № 2. – P. 73–89. – DOI: 10.1016/0165-1110(95)90004-7.
65. Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина. – М.; Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2015. – 220 с. – ISBN 978-5-4344-0276-7.
66. Vanin, A.F. How is nitric oxide (NO) converted into nitrosonium cations (NO⁺) in living organisms? (Based on the results of optical and EPR analysis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands) // *Applied Magnetic Resonance*. – 2020. – Vol. 51. – P. 851–859.
67. Ванин, А.Ф. Свободно-радикальная природа молекул монооксида азота как фактор, определяющий их превращение в живых организмах в ионы нитрозония // *Биофизика*. – 2020. – Т. 65. – С. 421–438.
68. Ванин, А.Ф., Блюменфельд, Л.А., Четвериков, А.Г. Исследование комплексов негемового железа в клетках и тканях методом ЭПР // *Биофизика*. – 1967. – Т. 12. – С. 829–841.

69. Ванин, А. Ф. Нитрозильные комплексы негемового железа в тканях животных и микроорганизмах: Автореф. дис. д-ра биол. наук. – М., 1979.
70. Клещёв, А.Л., Мордвинцев, П.И., Ванин, А.Ф. Роль оксида азота и железа в гипотензивном действии нитрозильных комплексов железа с различными анионными лигандами // *Studia Biophysica*. – 1985. – Vol. 105. – P. 93–102.
71. Vanin, A. F., Osipov, A., Kubrina, L. N., Burbaev, D. S., Nalbandyan, R. M. On the origin of paramagnetic centers with $g = 2.03$ in animal tissues and microorganisms // *Stud. Biophys.* – 1975. – Vol. 49. – P. 13–25.
72. Vithaythil, A.J., Ternberg, J.L., Commoner, B. Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis // *Nature*. – 1965. – Vol. 207. – P. 1246–1249. – DOI: 10.1038/2071246a0.
73. Ванин, А.Ф., Орановская, Е.В., Мордвинцев, П.И., Медведев, О.С. Hypotensive effect of dinitrosyl iron complexes in conscious animals // *Бюллетень Всесоюзного Кардиологического Центра*. – 1988. – Т. 2. – С. 73–81.
74. Ванин, А.Ф. Механизмы образования и функционирования в живых организмах динитрозильных комплексов железа как «рабочей формы» оксида азота // *Биофизика*. – 2024. – Т. 69, № 5. – С. 1078–1096.
75. Kubrina, L.N., Mikoyan, V.D., Mordvintcev, P.I., Vanin, A.F. Iron potentiates bacterial lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation in animal organs // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. – 1993. – Vol. 1176, No 3. – P. 240–244. – DOI: 10.1016/0167-4889(93)90050-y.
76. Vanin, A.F., Mordvintcev, P.I., Hauschildt, S., Mülsch, A. The relationship between L-arginine-dependent nitric oxide synthesis, nitrite release and dinitrosyl-iron complex formation by activated macrophages // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. – 1993. – Vol. 1177, No 1. – P. 37–42. – DOI: 10.1016/0167-4889(93)90154-h.
77. Vanin, A.F., Burbaev, D.S. Electronic and spatial structures of water-soluble dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands underlying their ability to act as nitric oxide and nitrosonium ion donors // *Journal of Biophysics*. – 2011. – Vol. 2011. – Art. ID 878236. – DOI: 10.1155/2011/878236.

78. Ванин, А.Ф., Ткачев, Н.А., Микоян, В.Д., Раевская, В.Э., Асанбаева, Н.Б., Багрянская, Е.Г. Природа тиолсодержащих лигандов в динитрозильных комплексах железа как фактор, определяющий устойчивость этих комплексов // Биофизика. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 629–645. – DOI: 10.7868/S3034527825040018

79. Микоян, В.Д., Бургова, Е.Н., Бородулин, Р.Р., Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами в основном представлены в живых организмах их биядерной формой // Биофизика. – 2020. – Т. 65, № 6. – С. 1142–1153. – DOI: 10.31857/S0006302920060149.

80. Vanin, A.F. What is the Mechanism of Nitric Oxide Conversion into Nitrosonium Ions Ensuring S-Nitrosating Processes in Living Organisms? // Cell Biochemistry and Biophysics. – 2019. – Vol. 77, No 4. – P. 279–292. – DOI: 10.1007/s12013-019-00886-1.

81. Vanin, A.F. Nitrosonium Ions as Constituents of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione Responsible for their S-Nitrosating Activity // Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry. – 2018. – Vol. 5, No 4. – 1109.

82. Vanin, A.F., Mokh, V.P., Serezhenkov, V.A., Chazov, E.I. Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione // Nitric Oxide Biol. Chem. – 2006. – Vol. 16. – P. 322–330. – DOI: 10.1016/j.niox.12.003.

83. Lakomkin, V.L., Vanin, A.F., Timoshin, A.A., Kapelko, V.I., Chazov, E.I. Long-lasting hypotensive action of stable preparations of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats // Nitric Oxide Biol. Chem. – 2007. – Vol. 16. – P. 413–418. – DOI: 10.1016/j.niox.2007.03.002.

84. Chazov, E.I., Rodnenkov, O.V., Zorin, A.V., et al. Hypotensive effect of "Oxacom" containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers // Nitric Oxide Biol. Chem. – 2012. – Vol. 26. – P. 147–157. – DOI: 10.1016/j.niox.2012.01.008.

85. Shekhter, A.B., Rudenko T.G., Istranov, L.P., Guller, A.E., Borodulin, R.R., 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. Pharmaceutical Sci.* – 2015. – Vol. 78. – P. 8–18. – DOI: 10.1016/j.jeps/2015.06.002.

86. Мордвинцев, П.И., Руднева, В.Г., Ванин, А.Ф., Шимкевич, Л.Л., Ходоров, Б.И. Ингибирующее действие динитрозильных комплексов железа с низкомолекулярными лигандами на агрегацию тромбоцитов // *Биохимия.* – 1986. – Т. 51. – С. 186–193.

87. Шамова, Е.Б., Бичан, О.Д., Дрозд, Е.С., Горудко, И.В., Чижик, С.А., Шумаев, К.Б., Черенкевич, С.Н., Ванин, А.Ф. Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами оксида азота // *Биофизика.* – 2011. – Т. 56. – С. 265–271. – DOI: 10.1134/S0006350911929278.

88. Remizova, M.I., Kochetygov, N.I., Kerbut, K.A., Burgova, E.N., Vanin, A.F. Effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment // *Eur. J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 662. – P. 40–46. – DOI: 10.1016/ejphar.2011.04.046.

89. Andreev-Andriyevsky, A.A., Mikoyan, V.D., Serezhenkov, V.A., Vanin, A.F. Penile-erectile activity of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands // *Nitric Oxide Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 24. – P. 217–223.

90. Kim, Y.M., Chung, H.T., Symmons, R.L., Billiar, T. Cellular nonheme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 10954–10961.

91. Ding, H., Dimple, B. Direct nitric oxide transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activation // *Proc. Natl. Acad. Sci (USA).* – 2000. – Vol. 97. – P. 5146–5150. – DOI: 10.1073/pnas.97.10.5146.

92. Васильева, С.В., Ступакова, М.В., Лобышева, И.И., Ванин, А.Ф. Активация SoxRS-регулона в *Escherichia coli* оксидом азота и его физиологическими донорами // *Биохимия.* – 2001. – Т. 66. – С. 1209–1214. – DOI: 10.1023/a:1012317508971.

93. Crack, J.C., Smith, J., Stapleton, M.R., et al. Mechanistic insight into the nitrosylation of the [4Fe-4S] cluster in WhiB-like proteins // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 133. – P. 1112–1121. – DOI: 10.1021/ja109581t.

94. Lo, F.C., Lee, J.F., Liaw, W.F., et al. The metal core in the recombinant *Escherichia coli* transcriptional factor SoxR // *Chem. Eur.* – 2012. – Vol. 128. – P. 2565–2577. – DOI: 10.1002/chem.201100838.
95. Lepka, K., Volbracht, K., Bill, E., et al. Iron-sulfur glutaredoxin 2 protects oligodendrocytes against damage induced by nitric oxide release from activated microglia // *Glia.* – 2017. – Vol. 65. – P. 1521–1534. – DOI: 10.1002/glia.23178.
96. Wiegant, F.A.C., Malyshev, I.Y., Kleschyov, A.L., van Faassen, E., Vanin, A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as inductor of heat shock protein synthesis in H35 hepatoma cells // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 455. – P. 179–182.
97. Shumaev, K.B., Gubkin, A.A., Serezhenkov, V.A., Lobysheva, I.I., Kosmachevskaya, O.V., Topunov, A.F., Vanin, A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes // *Nitric Oxide Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 18. – P. 37–46. – DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.085.
98. Voevodskaya, N.V., Serezhenkov, V.A., Cooper, C.E., Vanin, A.F. Exogenous ferrous ion is required for the nitric oxide-catalyzed destruction of the iron-sulfur center in adrenodoxin // *Biochem J.* – 2002. – Vol. 368. – P. 633–639. – DOI: 10.1042/bj20020788.
99. Richardson, D.R., Lock, H.C. The nitric oxide-iron interplay in mammalian cells: transport and storage of dinitrosyl iron complexes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1780. – P. 638–651. – DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.12009.
100. Chang, S.-H., Hsiao, Y.-J., Chen, Y.-H., et al. Conjugation of bone grafts with NO-delivery dinitrosyl iron complexes promotes synergistic osteogenesis and angiogenesis in rat calvaria bone defects // *J. Material Chem.* – 2023. – Vol. 11. – P. 8007–8019. – DOI: 10.1039/d3tb00587a.
101. Писаренко, О.И., Серебрякова, Л.И., Цкитишвили, Щ.В., и др. Кардио-защитное действие динитрозильных комплексов железа с цистеином у крыс // *Изв. Сер. Биол.* – 2008. – Т. 1. – С. 110–114.
102. Chuang, W.-H., Chou, Y.-T., Chen, Y.-T., et al. Neuroprotective effect of NO-delivery dinitrosyl iron complexes (DNICs) on pathology in the Alzheimer's disease

cell model // ACS Chem Neurosci. – 2023. – Vol. 14. – P. 2922–2937. – DOI: 10.1021/acscchemneuro.3c00348.

103. Lee, T.-Y., Lu, H.-H., Cheng, H.-T., et al. Delivery of nitric oxide with pH-responsive nanocarrier for the treatment of renal fibrosis // J. Controlled Release. – 2023. – Vol. 354. – P. 417–429. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.12.059.

104. Keese, M.A., Bose, M., Muelsch, A., Schrimmer, R.H., 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. – 1997. – Vol. 54. – P. 1307–1313. – DOI: 10.1016/s0006-2952(97)00348-1.

105. Wu, C.R., Huang, Y.D., Hong, Y.H., et al. 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. Au. – 2021. – Vol. 1. – P. 998–1013. – DOI: 10.1021/jacsau.1c00160.

106. Graziano, M., Lamattina, L. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story // Trends Plant Sci. – 2005. – Vol. 10. – P. 4–8. – DOI: 10.1016/j.tplants.2004.12.004.

107. McIntere, I.E., Katheresan, V., Hoffman, B., Chang, J., Federele, M.J., Thomas, D.D. Nitric oxide restricts iron availability and induces quorum in *Streptococcus pyogenes* // Redox Biology. – 2025. – Vol. 85. – P. 103699. – DOI: 10.1016/j.redox.2025.103699.

108. Burgova, E. N. Dinitrosyl iron complexes with glutathione suppress experimental endometriosis in rats / E. N. Burgova, N. A. Tkachev, L. V. Adamyan [et al.] // European Journal of Pharmacology. — 2014. — Vol. 727. — P. 140–147. — DOI 10.1016/j.ejphar.2014.01.002.

109. Vanin, A.F., Ostrovskaya, L.A., Korman, D.B., Blyuhterova, N.V., Rykova, V.A., Mikoyan, V.D., Tkachev, N.A. Inhibition of experimental tumour development under action of binuclear dinitrosyl iron complexes with cysteine // Biofizika (Rus). – 2025. – Vol. 70. – P. 480–786. – DOI: 10.1134/S0006350925700757.

110. Ванин, А.Ф., Налбандян, Р.М. Свободно-радикальные состояния с локализацией неспаренного электрона на атоме серы в дрожжевых клетках // Биофизика. – 1966. – Т. 11. – С. 178–179.
111. Williams, D. L. H. Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide. Elsevier, 2004.
112. Playfair, L. On the nitroprussides, a new class of salts // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. – 1849. – Vol. 139. – P. 477–518.
113. Бернштейн, В.Н., Беликов, В.Г. Нитропруссид натрия и его применение в аналитической химии // Успехи химии. – 1961. – Т. 30, № 4. – С. 532–549.
114. Лещинский, П.М., Мареев, В.Ю. Нитропруссид натрия: механизм действия и аспекты клинического применения // Терапевтический архив. – 1982. – Т. 54, № 5. – С. 148–153.
115. Butler, A.R., Megson, I.L. Non-heme iron nitrosyls in biology // Chemical Reviews. – 2002. – Vol. 102, No 4. – P. 1155–1166. – DOI: 10.1021/cr000076d.
116. Butler, A.R., Glidewell, C. Recent chemical studies of sodium nitroprusside relevant to its hypotensive action // Chemical Society Reviews. – 1987. – Vol. 16. – P. 361–380.
117. Mulvey, D.E., Waters, M.J. Reaction of Sodium Nitroprusside with Thiols: Formation of Coloured Adducts and Reduced Species // Biochemical Journal. – 1985. – Vol. 228, No 2. – P. 485–492.
118. Glidewell, C., Johnson, B.F. Mechanism of Reaction of Sodium Nitroprusside with Thiols: Identification of an Intermediate // Journal of Inorganic Biochemistry. – 1987. – Vol. 30, No 3. – P. 245–254.
119. Kukovetz, W.R., Schaffner, F., Wanner, A. Sodium Nitroprusside: Mechanisms of Action and Clinical Applications // Cardiovascular Drugs and Therapy. – 1990. – Vol. 4, No 4. – P. 593–608.
120. Feelisch, M., Noack, E. A. / Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase/Eur. J. Pharmacol. – 1987. – Vol. 139(1). – P. 19–30.

121. Feelisch, M., Noack, E.A. Nitric oxide (NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin or non-heme iron // *European Journal of Pharmacology*. – 1987. – Vol. 142, No 3. – P. 465–469.

122. Talha, K.M., Butler, J., Packer, M. Consequences of Discontinuing Long-Term Drug Treatment in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2024. – Vol. 84, No 22. – P. 2215–2232. – DOI: 10.1016/j.jacc.2024.09.005.

123. Kruszyna, H., Kruszyna, R., Rochelle, L.G., Smith, R.P., Wilcox, D.E. Effects of temperature, oxygen, heme ligands and sulfhydryl alkylation on the reactions of nitroprusside and nitroglycerin with hemoglobin // *Biochemical Pharmacology*. – 1993. – Vol. 46, No 1. – P. 95–102.

124. Rao, D.N.R., Cederbaum, A.I. Production of nitric oxide and other iron-containing metabolites during the reductive metabolism of nitroprusside by microsomes and by thiols // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1995. – Vol. 321, No 2. – P. 363–371. – DOI: 10.1006/abbi.1995.1406.

125. Vanin, A.F., Burbaev, D.S. Formation and Properties of Nitrosyl Complexes of Iron in Biological Systems // *Biochemistry (Moscow)*. – 1995. – Vol. 60, No 11. – P. 1413–1424.

126. Ванин, А.Ф. Роль ионов железа и цистеина в образовании и распаде S-нитрозоцистеина и S-нитрозоглутатиона // *Биохимия*. – 1995. – Т. 60, вып. 4. – С. 593–601.

127. Vanin, A.F. EPR Characterization of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as an Approach to Their Identification in Biological Objects: An Overview // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2018. – Vol. 76. – P. 3–17. – DOI: 10.1007/s12013-017-0811-8.

128. Курбанов, И. С., Мордвинцев, П. И., Алиев, Д. И., Ванин, А. Ф. (1989). Влияние тиоловых соединений и железа на продукцию окиси азота из нитропруссиды и нитроглицерина. *Вопросы медицинской химии*, 35(6), 87-91.

129. Ванин, А. Ф. Биологическая роль оксида азота / А. Ф. Ванин // *Респираторная медицина: руководство: в 3 т. / под ред. А. Г. Чучалина*. – 3-е изд., доп. и

перераб. – Москва: ООО «Атмосфера», 2024. – Т. 1. – С. 318–329. – ISBN 987-5-6048754-9-0. – DOI: 10.18093/987-5-6048754-9-0-2024-1-318-329.

130. Ванин, А.Ф., Ткачев, Н.А. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как источники универсальных цитотоксинов - катионов нитрозония // Биофизика. – 2023. – Т. 68. – №3. – С. 421-434. – DOI: 10.31857/S0006302923030018.

131. Трифонова, Н.Е., Некрасова, Е.И., Тронов, В.А. Генотоксическое и цитотоксическое действие доноров оксида азота: ДНКЖ с меркаптосукцинатом, нитромеркаптосукцинатом; и донора катионов нитрозония, Na-нитропруссид, на клетки MCF-7 // X международная конференция молодых учёных «OpenBio», 26–28 сентября 2023, Новосибирск. – Новосибирск, 2023. – DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-217.

132. Трифонова, Н.Е., Некрасова, Е.И., Тронов, В.А., Ванин, А.Ф. Снижение количества молекул NO^+ в системе понижает цито- и генотоксичность Na-нитропруссид при восстановлении дитионитом Na на культуре клеток MCF-7 // XI международная конференция молодых учёных «OpenBio», 24–27 сентября 2024, Новосибирск. – Новосибирск, 2024. – С. 334. – DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6.

133. Тронов, В.А. Радиационное прекондиционирование сетчатки глаза у мышей *in vivo* повышает ее устойчивость к последующему генотоксическому воздействию и стимулирует восстановление / В.А. Тронов, Ю.В. Виноградова, В.А. Поплинская [и др.] // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 2. – С.119–128.

134. Tronov, V.A. Radiation preconditioning *in vivo* increases the resistance of mouse retina to genotoxic exposure and stimulates its regeneration / V.A. Tronov, J.V. Vinogradova, V.A. Poplinskaya [et al.] // Cell and Tissue Biology. – 2015. – V.9, № 3. – P. 198-207.

135. Абдуллаев, С.А., Глухов, С.И., Газиев, А.И. Мелатонин снижает радиационные повреждения селезенки и увеличивает выживаемость при его введении до и после воздействия на мышей рентгеновского излучения // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2022. – Т. 62, № 5. – С. 523–531.

136. Блохина, Т.М. Повреждение ДНК спленоцитов мышей при воздействии вторичного излучения, формирующегося при прохождении пучка 650 МЭВ протонов через бетонную преграду / Т.М. Блохина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – №8. – С. 23-28. – URL: <https://rucont.ru/efd/804726> (дата обращения: 27.04.2026).

137. Flegal, M., Blimkie, M.S., Wyatt, H., Bugden, M., Surette, J., Klovov, D. Measuring DNA Damage and Repair in Mouse Splenocytes After Chronic In vivo Exposure to Very Low Doses of Beta- and Gamma-Radiation // Journal of Visualized Experiments. – 2015. – No 101. – e52912. – DOI: 10.3791/52912.

138. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity // Journal of Immunological Methods. – 1983. – Vol. 16, No 1-2. – P. 55–63.

139. Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L., Blázquez-Castro, A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives // Acta Histochemica. – 2018. – Vol. 120, No 3. – P. 159–167.

140. Chandna, S. Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death // Cytometry Part A. – 2004. – Vol. 61A. – P. 127–133.

141. Olive, P.L., Banáth, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // Nature Protocols. – 2006. – Vol. 1, No 1. – P. 23–29.

142. Тронов, В.А., Некрасова, Е.И. Повреждение ДНК и белка p53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевина // Биофизика. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 543–551.

143. Тронов, В.А. Пролиферация клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на ретинотоксический стресс, индуцированный метилнитрозомочевинной / В.А. Тронов, Е.И. Некрасова, М.А. Островский // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 6. – С. 440–447.

144. Tronov, V.A. Proliferation of mouse retinal Muller cells in response to methylnitrosourea-induced retinotoxic stress / V.A. Tronov, E.I. Nekrasova, M.A. Ostrovski // *Cell and Tissue Biology*. – 2018. – V.12, № 6. – P. 468-476.
145. Końca, K., Lankoff, A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., Końca Z., Wojcik A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2003. – Vol. 534, No 1-2. – P. 15–20.
146. McGlynn, A.P., et al. Detection of replicative integrity in small colonic biopsies using the BrdUrd comet assay // *British Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 88, No 6. – P. 895–901.
147. Atale, N., Gupta, S., Yadav, U.C.S., Rani, V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques // *Journal of Microscopy*. – 2014. – Vol. 255. – P. 7–19. – DOI: 10.1111/jmi.12133.
148. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death // *Toxicologic Pathology*. – 2007. – Vol. 35, No 4. – P. 495–516. – DOI: 10.1080/0192623070132033
149. Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis) // *Cytometry*. – 1997. – Vol. 27, No 1. – P. 1–20.
150. Петухов, В.Ю., Хабибуллина, Н.Р. Исследование тонких пленок методом ЭПР // Учебно-методическое пособие для студентов физического факультета. – Казань, 2009.- 31 с. [Электронный ресурс] // Сайт Казанского федерального университета. URL: https://kpfu.ru/docs/F17342246/16_petuhov_epr.pdf (дата обращения: 9.9.2026).
151. Van Doorslaer, S. EPR spectroscopy in catalysis / S. Van Doorslaer, D. M. Murphy // *Topics in Current Chemistry*. — 2012. — Vol. 321. — P. 1–40.
152. Шарыгин, В. Л. Методология использования спектроскопии ЭПР в анализе физико-химических механизмов радиогенных повреждений организма животных и человека (опыт и тенденции) / В. Л. Шарыгин // *Радиационная биология. Радиоэкология*. — 2024. — Т. 64, № 5. — С. 473–488. — DOI 10.31857/S0869803124050035.

153. Бурбаев, Д. Ш. Исследование методом ЭПР соединений, моделирующих комплексы негемового железа биологических объектов : диссертация на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук : 01.00.00 / Бурбаев Досымжан Шингожинович. — Москва, 1971. — 210 с. : ил.

154. Van Voorst, J.D.W., Hemmerich, P. Electron spin resonance of $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2^{2-}$ and $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NOH}_2^{2-}$ // *Chemical Physics*. – 1966. – Vol. 45, No 11. – P. 3914–3920. – DOI: 10.1063/1.1727437.

155. Vanin, A.F., Serezhenkov, V.A., Mikoyan, V.D., Genkin, M.V. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands // *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. – 1998. – Vol. 2, No 4. – P. 224–234.

156. Бурбаев, Д.Ш., Ванин, А.Ф., Блюменфельд, Л.А. Электронная и пространственная структура парамагнитных динитрозильных комплексов железа // *Журнал структурной химии*. – 1971. – Т. 12. – С. 252–256.

157. Moinuddin, Dixit, K., Ahmad, S., Shahab, U., Habib, S., Naim, M., Alam, K., Ali, A. Human DNA Damage by the Synergistic Action of 4-Aminobiphenyl and Nitric Oxide: An Immunochemical Study // *Environmental Toxicology*. – 2014. – Vol. 20. – P. 568–576.

158. Tanaka, T., Kurose, A., Halicka, H.D., et al. Nitrogen Oxide-Releasing Aspirin Induces Histone H2AX Phosphorylation... // *Cell Cycle*. – 2006. – Vol. 5, No 15. – P. 1669–1674.

159. Quan, Y.Y., Liu, Y.H., Lin, C.M., Wang, X.P., Chen, T.S. Peroxynitrite dominates sodium nitroprusside-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, No. 18. – P. 29833–29845.

160. Quan, Y.Y., Qin, G.Q., Huang, H., Liu, Y.H., Wang, X.P., Chen, T.S. Dominant roles of Fenton reaction in sodium nitroprusside-induced chondrocyte apoptosis // *Free Radic. Biol. Med.* – 2016. – Vol. 94. – P. 135–144.

161. Cardaci, S., Filomeni, G., Rotilio, G., Ciriolo, M.R. Reactive oxygen species mediate p53 activation and apoptosis induced by sodium nitroprusside in SH-SY5Y cells // *Mol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 74. – P. 1234–1245.

162. Zhu, C., Wang, X., Deinum, J., Huang, Z., Gao, J., Modjtahedi, N., Neagu, M.R., Nilsson, M., Eriksson, P.S., Hagberg, H., Luban, J., Kroemer, G., Blomgren, K. Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia // *Journal of Experimental Medicine*. – 2007. – Vol. 204. – P. 1741–1748.
163. Wang, Y., An R., Umanah, G.K., Park H., Nambiar, K., Eacker, S.M., Kim, B., Bao L., Harraz, M.M., Chang, C., Chen, R., Wang, J.E., Kam, T.I., Jeon, J.S., Xie, Z., Neifert, S., Qian, J., Andrabi, S.A., Blackshaw, S., Zhu, H., Song, H., Ming, G.L., Dawson, V.L., Dawson, T.M. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1 // *Science*. – 2016. – Vol. 354, No. 6308.
164. Bai, P. Biology of poly(ADP-ribose) polymerases: The factotums of cell maintenance // *Mol. Cell*. – 2015. – Vol. 58. – P. 947–958.
165. Wang, Y., Dawson V.L., Dawson T.M. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: A key event in parthanatos // *Exp. Neurol*. – 2009. – Vol. 218. – P. 193–202.
166. Johanning, R. J., Zaske, D. E., Tschida, S. J., Johnson, S. V., Hoey, L. L., & Vance-Bryan, K. (1995). A retrospective study of sodium nitroprusside use and assessment of the potential risk of cyanide poisoning. *Pharmacotherapy*. – 1995. – Vol. 15, No 6. – P. 773–777.
167. Marbury, T.C., Sheppard, J.E., Gibbons, K., Lee, C.-S.C. Combined antidotal and hemodialysis treatments for nitroprusside-induced cyanide toxicity // *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*. – 1982. – Vol. 19, No 5. – P. 475–482. – DOI: 10.3109/15563658208992502.
168. Schulz, V. Clinical pharmacokinetics of nitroprusside, cyanide, thiosulphate and thiocyanate // *Clinical Pharmacokinetics*. – 1984. – Vol. 9, No 3. – P. 239–251.
169. Thomas, C., Svehla, L., Moffett, B.S. Sodium-nitroprusside-induced cyanide toxicity in pediatric patients // *Expert Opinion on Drug Safety*. – 2009. – Vol. 8, No 5. – P. 599–602. – DOI: 10.1517/14740330903081717.

170. Rindone, J.P., Sloane, E.P. Cyanide toxicity from sodium nitroprusside: risks and management // *Annals of Pharmacotherapy*. – 1992. – Vol. 26, No 4. – P. 515–519. – DOI: 10.1177/106002809202600413.

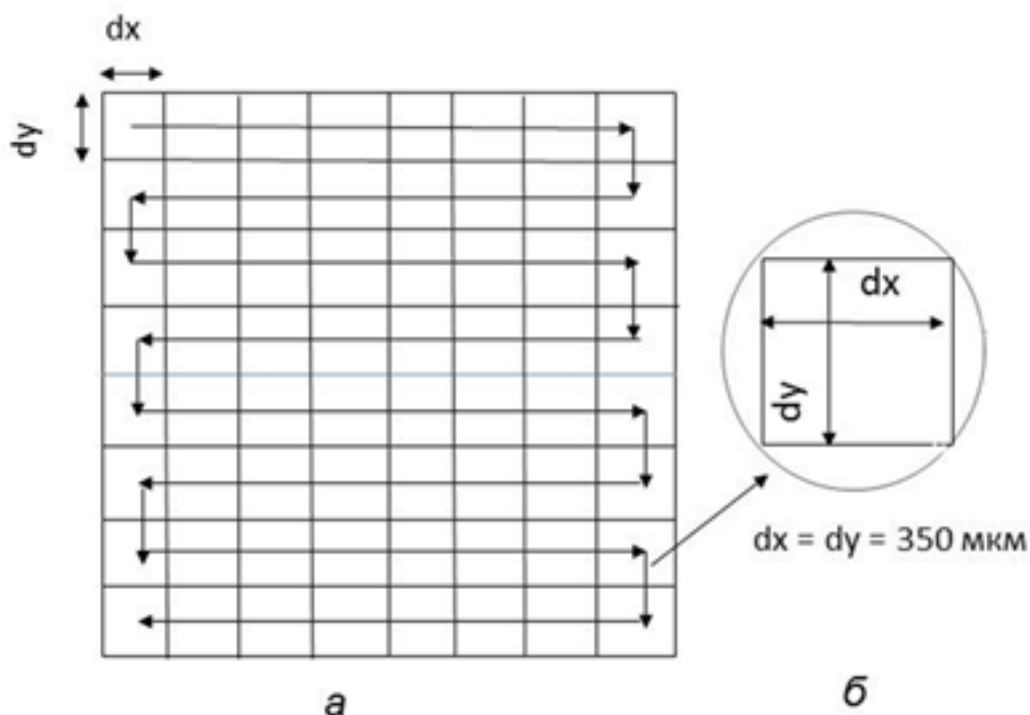
171. Roncaroli, F., van Eldik, R., Olabe, J.A. Release of NO from reduced nitroprusside ion. Iron-dinitrosyl formation and NO-disproportionation reactions // *Inorganic Chemistry*. – 2005. – Vol. 44, No 8. – P. 2781–2790. – DOI: 10.1021/ic050070c.

172. Clemons, N.J., McColl, K.E.L., Fitzgerald, R.C. Nitric oxide and acid induce double-strand DNA breaks in Barrett's esophagus carcinogenesis via distinct mechanisms // *Gastroenterology*. – 2007. – Vol. 133, No. 4. – P. 1198–1209. – DOI: 10.1053/j.gastro.2007.06.061.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А

Процедура сканирования: весь слайд (18×18 мм) или его репрезентативную часть сканировали с шагом 0,35 мм при увеличении 400×; с одного слайда получали до 2500 снимков в зависимости от состояния клеток.



Процедура сканирования слайда и обработка клеток на полученных фотографиях: (а). Затем поле сканирования слайда (б) фрагмент поля размерами 350х350 мкм, содержащий клетки-кометы, транслируется на монитор, где происходит подсчет и анализ.

С одного слайда размером 18х18мм можно сделать 2500 снимков, при подходящем состоянии клеток. Сканирование производится в зеленом или красном спектрах флуоресценции в зависимости от используемого красителя.

09.09.2026, 12:28

Gmail - Тезисы будут опубликованы в сборнике



Наталья Трифонова <trifonova.n1991@gmail.com>

Тезисы будут опубликованы в сборнике

Площадка OpenBio <openbio@openbio.ru>
Кому: OpenBIO Площадка <openbio@openbio.ru>

7 сентября 2026 г. в 08:52

Добрый день!

Команда OpenBio благодарит вас за проявленный интерес к Конференции молодых ученых.

Ваш доклад будет опубликован в «Сборнике Тезисов XIII международной конференции молодых ученых биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и вирусологов».

Приглашаем вас на мероприятия площадки открытых коммуникаций OpenBio в качестве слушателя, вы также сможете подключиться онлайн, если не имеете возможности присутствовать лично.

По ссылке вы найдете программу четырех дней Конференции и Форума, специально для Вас мы подготовили множество интересных мероприятий, докладов и мастер-классов с 22 по 25 сентября

https://openbio.ru/new/docs/openbio_program_2026.pdf

Конференция, Форум и Выставка будут проходить в здании Биотехнопарка по адресу: Новосибирская область, наукоград Кольцово, ул. Технопарковая, д.8.

Будем рады видеть вас на Конференции и других мероприятиях OpenBio-2026!

С уважением,
Ирина Чипугова,
координатор научной конференции OpenBio
тел. +7 (923) 101- 8454
www.openbio.ru

