

УДК 577.3

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ В ОТНОШЕНИИ SARS-CoV-2 НА МОДЕЛИ СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА

© 2022 г. А.В. Шиповалов*, А.Ф. Ванин**, #, О.В. Пьянков*, Е.Г. Багрянская***, В.Д. Микоян**, Н.А. Ткачев**, Н.А. Асанбаева***, В.Я. Попкова**

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора РФ, Кольцово, Новосибирская область, 630559, Россия

**Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119991, Россия

***Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, просп. Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090, Россия

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

Поступила в редакцию 04.07.2022 г.

После доработки 04.07.2022 г.

Принята к публикации 08.07.2022 г.

В экспериментах на модели сирийского хомячка продемонстрировано противовирусное действие в отношении вируса SARS-CoV-2 биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и диэтилдитиокарбамата натрия при последовательной аэрозольной обработке зараженных животных растворами этих соединений. Методом электронного парамагнитного резонанса в аналогичных экспериментах на здоровых хомячках установлена преимущественная локализация комплексов железа и диэтилдитиокарбамата натрия в ткани легких. У мышей при таких же измерениях эти агенты равно эффективно локализовались как в легких, так и в печени. Предполагается, что при контакте биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и диэтилдитиокарбамата натрия в организме животных происходит высвобождение из комплексов железа катионов нитрозония, вызывающих S-нитрозирование протеаз клетки-хозяина и вируса, что приводит к подавлению инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, диэтилдитиокарбамат натрия, катионы нитрозония.

DOI: 10.31857/S0006302922050167, EDN: JJZIZA

Для вирусных инфекций характерно резкое повышение в клетках организма-хозяина уровня одного из универсальных регуляторов метаболических процессов – оксида азота (NO) [1–15]. Поскольку внутриклеточное увеличение концентрации NO сопровождается S-нитрозированием разнообразных вирусных белков – протеаз, белков оболочки, обратных транскриптаз, факторов

транскрипции, а также протеаз клетки-хозяина [2–16], есть основание предполагать, что именно этот процесс обеспечивает снижение вирусной продукции, являясь эффективным средством защиты организма животных и человека от вирусной инфекции.

Учитывая тот факт, что S-нитрозирование различных внутриклеточных компонентов не осуществляется непосредственно молекулами NO, а обеспечивается одноэлектронно-окисленной формой этих молекул – катионами нитрозония (NO⁺), связывающимися вместо протонов с тиоловыми группами тиолсодержащих белков и низкомолекулярных соединений, необходимо понимание механизма превращения NO в NO⁺ в клетках животных и человека.

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, М-ДНКЖ – моноядерная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ – биядерная форма динитрозильных комплексов железа, МНКЖ – мононитрозильные комплексы железа, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат, GSH – восстановленный глутатион, ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, в/б – внутрибрюшинно.

В настоящее время большинство исследователей полагает, что это превращение обеспечивается окислением NO до диоксида азота с последующим связыванием NO₂ с NO с образованием донора NO⁺ – триоксида азота (N₂O₃), способного S-нитрозировать тиолы [17–19]. Однако показано, что процесс S-нитрозирования может происходить в клеточных культурах и в отсутствие кислорода, т. е. без окисления NO до NO₂ [20–22]. Ряд авторов предполагает, что появление в клетках животных и человека катиона NO⁺ обеспечивается образованием в них при участии молекул NO динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами, способных выступать в качестве доноров как молекул NO, так и катионов нитрозония [20–26].

ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами были открыты и идентифицированы сначала в дрожжевых клетках, а затем в тканях животных методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в 60-е годы прошлого столетия одним из авторов настоящей работы А.Ф. Ваниным по характерному для моноядерной формы ДНКЖ (М-ДНКЖ) сигналу ЭПР со средним значением g-фактора (g_{cp}), равным 2.03 (сигнал с $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$, $g_{cp} = 2.03$) [27, 28]. В последние годы им же был предложен механизм образования этих комплексов, в основе которого лежит реакция диспропорционирования двух молекул NO, связывающихся с ионом Fe²⁺ в присутствии тиолсодержащих лигандов (схема 1):

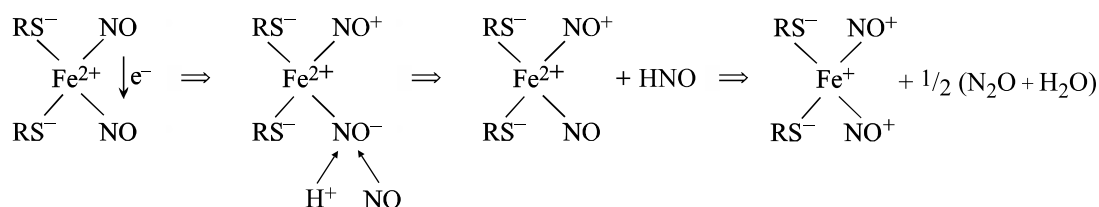


Схема 1. Механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции Fe²⁺, NO и тиолов, предполагающий взаимное одноэлектронное окисление-восстановление молекул NO, превращающихся в соответствии с этой реакцией (реакцией диспропорционирования) в катион нитрозония (NO⁺) и анион нитроксила (NO⁻) [25, 26].

Образующийся в ходе этой реакции анион нитроксила в результате гидролиза (связывания с протоном) превращается в молекулу нитроксила и выходит из комплекса. Его место занимает нейтральная молекула NO. Гидролиз сохраняющегося в комплексе катиона нитрозония (его связывание с анионом гидроксила) предотвращается перемещением на этот катион части электронной плотности с тиоловой серы, характеризующейся высокой π-донорной активностью. В результате положительный заряд на этом нитрозильном лиганде нейтрализуется, и он перестает связываться с OH⁻-анионами.

Таким образом, согласно приведенному на схеме 1 механизму образования М-ДНКЖ, одна из его резонансных структур может быть представлена как [(RS⁻)₂Fe²⁺(NO)(NO⁺)]⁺. Подобная структура может быть характерной и для биядерной формы ДНКЖ (Б-ДНКЖ) – [(RS⁻)₂Fe²⁺₂(NO)₂(NO⁺)₂]²⁺ [25, 26]. Реализация этой структуры обеспечивает

появление в клетках организма-хозяина доноров катионов нитрозония – ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, способных инициировать S-нитрозирование различных тиолсодержащих соединений в клетках животных и человека и тем самым снижать и/или исключать вирусную продукцию в чувствительной клетке.

В работах группы А.Ф. Ванина был предложен подход, позволяющий селективно высвобождать из М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ катионы нитрозония с одновременным включением ионов железа и молекул NO в устойчивые комплексы – мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ) с производными дитиокарбамата, устраняя тем самым какое-либо влияние ионов железа и молекул NO на внутриклеточные процессы. Такое влияние могли оказывать только высвобождающиеся под действием дитиокарбамата в соответствии со схемой 2 катионы нитрозония:

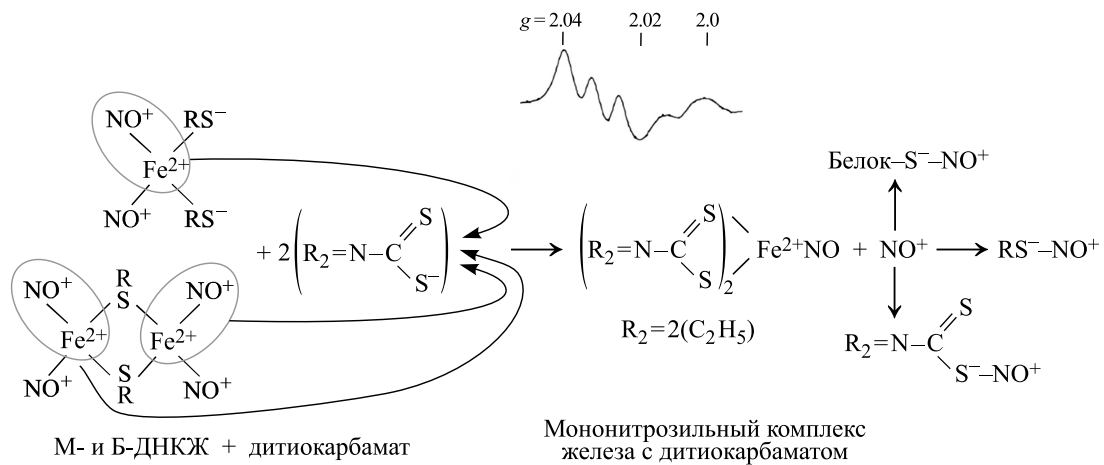


Схема 2. Механизм превращения М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с производными дитиокарбамата. Высвобождающиеся при этом катионы нитрозония могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе дитиокарбамата. Наверху приводится зарегистрированный при 77 К сигнал ЭПР со значениями g-фактора 2.04 и 2.02 и триплетной сверхтонкой структурой, характерный для МНКЖ с дитиокарбаматом [29, 30].

В настоящей работе мы изучили противовирусную активность катионов нитрозония в отношении вируса SARS-CoV-2 на сирийском хомячке (животная модель COVID-19), используя Б-ДНКЖ с глутатионом + производное дитиокарбамата (диэтилдитиокарбамат – ДЭТК) как систему, способную путем аэрозольного введения этих соединений поставлять катионы нитрозония в организм этих животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соединения. В экспериментах использовали сульфат железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион (GSH), N-ацетил-L-цистеин, диэтилдитиокарбамат натрия и нитрит натрия (Sigma, США).

Вирусы. В работе использовали штамм SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/Vologda-171613-1208/2020, полученный из Государственной коллекции микроорганизмов ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская область). Инфекционный вирус выделяли в культуре клеток *Vero E6*, аликвоты вируса были заморожены и хранились при температуре -80°C . Титр стока составлял не менее 10^6 ЦПД₅₀/мл. Для исследований использовали вирус пассажа 4. Титр вирусной суспензии определяли методом конечных разведения на клетках *Vero E6* по методу Рида и Менча [31]. Работы, связанные с живым вирусом, проводили в условиях максимальной изолированной лаборатории, соответствующей международным требованиям BSL3+, в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, имеющего разрешение на проведение таких исследований.

Культуры клеток. В работе использовали линию клеток *Vero E6*, полученную из коллекции культур клеток ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Выращивание монослая клеток *Vero E6* осуществляли в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) и комплексного антибиотика (Gibco, США). В качестве поддерживающей среды при культивировании вируса использовали ту же среду, но с 2% эмбриональной сыворотки.

Животные. В эксперименте использовали самцов и самок аутбредных сирийских хомячков массой тела 80–100 г. Животные были получены из Питомника лабораторных животных ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Хомячкам подкожно имплантировали транспондеры (чипы) IPTT-300 (BMDS, США) для бесконтактного измерения температуры и идентификации и помещали по два в индивидуально вентилируемые клетки. Животные имели неограниченный доступ к пище и воде. Акклиматизация к условиям эксперимента была проведена в течение 7 суток до заражения. Во время экспериментов в клетках поддерживали температуру $22-24^\circ\text{C}$ и относительная влажность 40–55%. Хомячков взвешивали, измеряли температуру и оценивали на клинические признаки болезни ежедневно.

Для определения оптимальных концентраций вводимых аэрозольно соединений использовали самцов аутбредной линии мышей CD1 массой тела 18–20 г. Животные были получены из вивария Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН.

Модель инфекции SARS-CoV-2 в сирийских хомячках. Модель заражения хомячков вирусом SARS-CoV-2 была описана ранее [32].

В работе использовали шесть групп животных (две опытных и одна контрольная), по восемь хомячков (четыре самца и четыре самки) в каждой.

Перед заражением хомячков анестезировали внутримышечным наркозом Zoletil 100 (Virbac, Франция). Заражение анестезированных животных производили интраназально инокуляцией вируса пипеткой в объеме 50 мкл, в дозе 50 ИД₅₀. Через 120 ч после заражения всех животные подвергали эвтаназии методом трансервикальной дислокации. Проводили вскрытие, забор тканей носовых ходов и легких. Полученные с помощью механического гомогенизатора (FastPrep-24, MP Biomedical, США) 10%-е гомогенаты тканей осветляли центрифугированием при 10000 об/мин (ротор SW28, Beckman Coulter, США). Аликвоты осветленных образцов использовали для определения количества РНК вируса в образцах методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени через суррогатный показатель Ct (число циклов) и для определения концентрации в ЦПД₅₀/мл инфекционного вируса методом титрования на культуре клеток *Vero E6*.

Определение РНК вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для выделения РНК использовали набор «РИБО-преп» («Амплиценс», Россия). Синтез кДНК из выделенной РНК проводили реагентами для реакции обратной транскрипции «Реверта-Л» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Набор реагентов «Вектор-ПЦРРВ-COVID19-RG» (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область) использовали для амплификации фрагментов кДНК вируса SARS-CoV-2. Результаты исследования интерпретировали в соответствии с инструкцией производителя.

Определение инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах на перевиваемой культуре клеток *Vero E6*. Клетки *Vero E6* высевали за 24 ч до заражения в 96-луночные планшеты с посевной дозой $1.5 \cdot 10^4$ клетки/луночка. В день эксперимента были сделаны последовательные десятикратные разведения вируса в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 2% эмбрио-

нальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) и комплексного антибиотика (Gibco, США), в общей сложности от шести до восьми лунок были заражены каждым разведением вируса. После 72-часовой инкубации клетки фиксировали 4%-м раствором забуференного формалина с последующим окрашиванием 0.1% кристаллическим фиолетовым. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали как ЦПД. Расчет титра вируса проводили по формуле Рида–Менча [31] и выражали в lg ЦПД₅₀/мл (lg TCID₅₀/мл).

Введение соединений. Аэрозольное введение соединений проводили в вертикальной динамической камере в течение 30 мин. Рабочий расход воздуха через камеру составлял 10 л/мин. Во внутренний объем камеры одновременно помещали восемь хомячков. Диспергирование проводили распылителем «Омрон» с расходом воздуха 6 л/мин. В распылитель заливали 10 мл 10 мМ водного раствора препаратов. Отбираемый аэрозоль улавливали с помощью пробоотборника МЦ-2, соединяемого с выходным штуцером камеры. Объемная скорость отбора проб аэрозоля в пробоотборнике составляла 10.0 ± 0.5 л/мин, объем сорбирующей жидкости (дистиллированная вода) — 10 мл.

Аналогичным образом вводили ингаляционным путем те же соединения аутбредным мышам CD 1, не зараженным коронавирусом.

Введение препарата зараженным коронавирусом сирийским хомячкам проводилось в течение четырех суток дважды в сутки, первое введение через 1 ч после заражения. Через 120 ч после заражения животных подвергали эвтаназии (методом трансервикальной дислокации) с последующим вскрытием и забором тканей носовой полости и легких (в асептических условиях) для определения в них количества РНК вируса в гомогенатах тканей методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени через показатель Ct (число циклов) и методом титрования на культуре клеток *Vero 6* (lg TCID₅₀/мл).

Синтез биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом. При синтезе Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) использовали способность S-нитрозотиолов, как это показано на схеме 3, образовывать в реакции с ионами Fe²⁺ и тиолами соответствующие М-ДНКЖ.

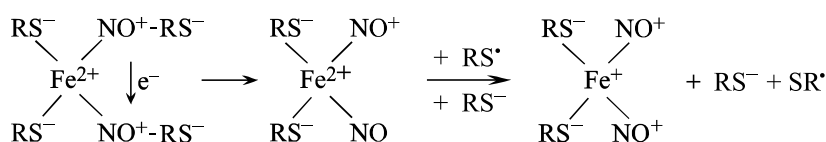


Схема 3. Механизм образования М-ДНКЖ в реакции S-нитрозотиолов, Fe²⁺ и тиолов [33].

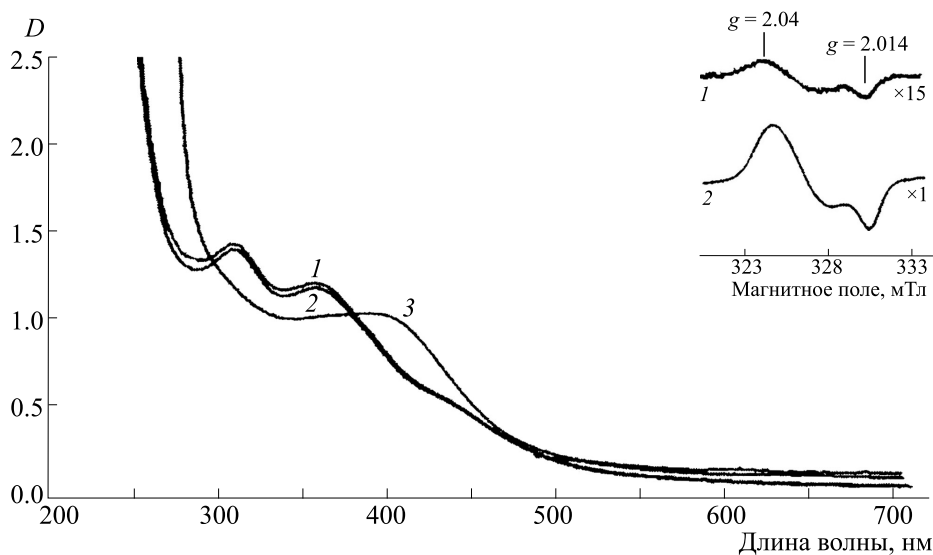


Рис. 1. Спектры оптического поглощения Б-ДНКЖ-GSH и М-ДНКЖ-GSH при концентрации 0.46 мМ (соответственно спектры 1 и 3); на вставке – ЭПР-сигнал М-ДНКЖ-GSH (сигнал 2.03 со значениями тензора g -фактора, равными $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$) [25].

В соответствии со схемой 3 ионы Fe^{2+} связывают по две молекулы S-нитрозотиолов на ион с последующим диспропорционированием этих молекул, что сразу же приводит к образованию М-ДНКЖ, характеризующихся, как уже указывалось выше, сигналом ЭПР с $g_{\text{ср}} = 2.03$ (сигналом 2.03). При низкой концентрации тиолов в растворе М-ДНКЖ конденсируются в

соответствии со схемой 4 в Б-ДНКЖ-диамагнитные комплексы, не дающие сигнала 2.03. Их концентрацию можно было оценить по интенсивности двух полос оптического поглощения на 310 и 360 нм (приведены на рис. 1) с коэффициентами экстинкции в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ, равными соответственно 4600 и $3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

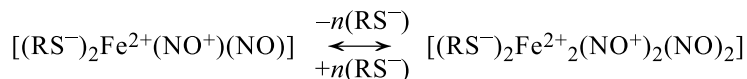


Схема 4. Равновесное взаимопревращение М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Равновесие сдвигается влево при повышении в растворе уровня тиолов (RS^-), ионизованных по тиоловой группе [34].

Синтез 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH проводили в соответствии с методом, описанным в работе [35]. Для этого в 15 мМ раствор HEPES-буфера при pH 7.2–7.4 последовательно вводили глутатион, ферросульфат и нитрит натрия в концентрации соответственно 40, 20 и 20 мМ, тщательно перемешивая раствор после каждого введения. Введение глутатиона приводило к подкислению раствора этого буфера до pH 3.6–3.8; для надежного предотвращения образования гидроксидных комплексов железа при последующем добавлении в раствор глутатиона ферросульфата до введения последнего pH раствора понижали добавлением серной кислоты до pH 1–2. Последнее гарантировало также более эффективное образование в растворе S-нитрозоглутатиона после добавления в реакционный раствор нитрита натрия. За этим процессом следили по интенсивно-

сти полосы поглощения на 334 нм, характерной для S-нитрозоглутатиона с $\epsilon = 0.94 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [36]. Обычно образование S-нитрозоглутатиона в концентрации 20 мМ завершалось при комнатной температуре в течение полутора часов. После этого pH раствора, окрашенного из-за наличия в нем S-нитрозоглутатиона в розовый цвет, повышали до pH 7.3–7.5 капельным добавлением крепкого (100 мМ) раствора NaOH – при этом раствор приобретал оранжевую окраску, обусловленную начавшимся в соответствии со схемой 3 образованием М-ДНКЖ-GSH. Раствор оставляли на ночь на воздухе при комнатной температуре. За это время в соответствии со схемами 3 и 4 половина железа (10 мМ) включалась в М-ДНКЖ-GSH, а затем в Б-ДНКЖ-GSH, тогда как другая половина железа включалась в водонерастворимые гид-

Таблица 1. Вирусная нагрузка в тканях носовой полости и тканях легких хомячков, интраназально инфицированных вирусом SARS-CoV-2 с последующим аэрозольным лечением препаратами Б-ДНКЖ-GSH и Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК

Соединение	Вирусная нагрузка SARS-CoV-2			
	в тканях носовой полости		в тканях легких	
	lg TCID ₅₀ /vk	Ст*	lg TCID ₅₀ /ml	Ст*
Б-ДНКЖ-GSH	4.1 ± 0.5	23.83 ± 1.27	4.4 ± 0.8	20.67 ± 2.13
Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК	2.7 ± 0.4	27.28 ± 3.44	2.4 ± 0.4	30.33 ± 1.18
Плацебо	5.0 ± 0.5	19.80 ± 2.19	3.7 ± 0.4	25.96 ± 1.60

Примечание. * – Более низкие пороговые значения числа циклов (Ст) указывают на более высокие вирусные нагрузки.

роокисные комплексы, выпадавшие в осадок. На следующий день этот осадок удаляли фильтрованием раствора на бумажном фильтре.

В результате получали прозрачный раствор Б-ДНКЖ-GSH в концентрации 10 мМ, который замораживали в жидком азоте и хранили в замороженном состоянии при температуре не выше –18°C до использования в экспериментах на животных.

На рис. 1 приводятся спектры поглощения полученного описанным выше методом препарата Б-ДНКЖ-GSH (спектр 1) с полосами поглощения на 310 и 360 нм (раствор разбавлен до концентрации 0.5 мМ). Спектр не изменялся в течение часа при подкислении раствора до pH 1.0 (спектр 2). На вставке приводится сигнал ЭПР 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (сигнал 2.03, спектр 1), обусловленный 5%-й примесью М-ДНКЖ. При добавлении к этому раствору 10 мМ GSH и повышении pH с 7.5 до 10.5 Б-ДНКЖ полностью переходил в М-ДНКЖ. Спектр поглощения последнего с полосой на 400 нм и сигнал 2.03 представлены на рис. 1 соответственно кривой 3 и ЭПР-сигналами на вставке.

Измерение спектров ЭПР изолированных тканей нативных (незараженных) животных. После проведения эксперимента у нативных (незараженных) животных (сирийские хомячки, мыши) проводили эвтаназию методом трансервикальной дислокации для последующего определения локализации ДНКЖ и МНКЖ-ДЭТК в изолированных образцах крови и тканях легких и печени животных методом ЭПР. Забор крови и тканей органов осуществляли в асептических условиях. Образцы (легкие, печень и кровь) помещали в пластмассовые трубки диаметром 4 мм и замораживали в жидком азоте. Для последующего измерения спектров ЭПР в препаратах замороженных тканей трубки с замороженными в них тканями извлекали из жидкого азота и постепенно, нагревая в руках, поршнем выдавливали образцы тка-

ней в жидкий азот, образцы цилиндрической формы помещали в жидком азоте в палец Дьюара соответствующей формы, после чего регистрировали в этих образцах спектры ЭПР при соответствующих параметрах ЭПР-радиоспектрометра (Bruker, Германия) или модифицированного ЭПР-радиоспектрометра («РадиоПан», Польша). В качестве эталонного образца (стандарта) при определении концентрации М-ДНКЖ, возникавших в тканях животных, использовали раствор М-ДНКЖ-GSH, сигнал ЭПР которого (ЭПР-сигнал 2) приводится на рис. 1. Поскольку плотность ткани легкого примерно в два раза меньше плотности воды, после оценки содержания М-ДНКЖ в этом органе в соответствии со стандартом, полученную величину удваивали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка эффективности соединений Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК при аэрозольном введении. Анализ результатов, приведенных в табл. 1, по данным метода ОТ-ПЦР (Ст) показывает, что при проведении лечения животных только раствором Б-ДНКЖ-GSH достоверно снижается вирусная нагрузка в тканях носовой полости в 16 раз ($p = 0.0006$, по критерию Манна–Уитни) по сравнению с контрольными животными (плацебо). При этом по инфекционному титру (lg TCID₅₀/мл) достоверное снижение вирусной нагрузки ни в тканях носовой полости, ни в тканях легких зафиксировано не было ($p > 0.005$, по критерию Манна–Уитни).

Для системы соединений Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК при их последовательном введении определена достоверная противовирусная активность. По данным метода ОТ-ПЦР (Ст) отмечено снижение уровня накопления РНК в тканях легких в 21 раз ($p = 0.0007$, по критерию Манна–Уитни), в тканях носовой полости – в 16 раз ($p = 0.0025$, Манн–Уитни). Методом титрования в тканях носовой полости определено еще большее снижение вирусной нагрузки – в 200 раз

Таблица 2. Вирусная нагрузка в тканях носовой полости и тканях легких хомячков, интраназально инфицированных вирусом SARS-CoV-2 с последующим аэрозольным лечением препаратами ДЭТК и ДЭТК + Б-ДНКЖ-GSH

Соединение	Вирусная нагрузка SARS-CoV-2			
	в тканях носовой полости		в тканях легких	
	lg TCID ₅₀ /ml	Ст*	lg TCID ₅₀ /ml	Ст*
ДЭТК	5.3 ± 0	11.59 ± 2.04	5.5 ± 0	13.31 ± 1.28
ДЭТК + Б-ДНКЖ-GSH	5.3 ± 0	10.78 ± 0.44	5.2 ± 0.3	14.60 ± 0.86
Плацебо	5.5 ± 0	9.60 ± 2.02	4.3 ± 0.1	15.54 ± 1.84

Примечание. * – Более низкие пороговые значения числа циклов (Ст) указывают на более высокие вирусные нагрузки.

($p = 0.0002$, по критерию Манна–Уитни). При исследовании тканей легких наблюдалось снижение вирусной нагрузки в 20 раз ($p = 0.0002$, по критерию Манна–Уитни).

В соответствии со схемой 2 такая последовательность введения в дыхательные пути хомячков Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК должна приводить к накоплению в тканях дыхательных путей высвобождающихся из Б-ДНКЖ катионов нитрозония, что, по-видимому, и обеспечило подавление инфекции SARS-CoV-2.

Результаты, полученные после аэрозольного введения зараженным хомячкам соединений ДЭТК или ДЭТК с последующим аэрозольным введением Б-ДНКЖ-GSH, показали (табл. 2), что при такой комбинации введения соединений достоверное снижение вирусной нагрузки в чувствительных тканях органов-мишеней по двум исследуемым параметрам по сравнению с контрольными животными (плацебо) зафиксировано не было.

ЭПР-измерение тканей сирийских хомячков. На рис. 2 приведены одни из типичных спектров

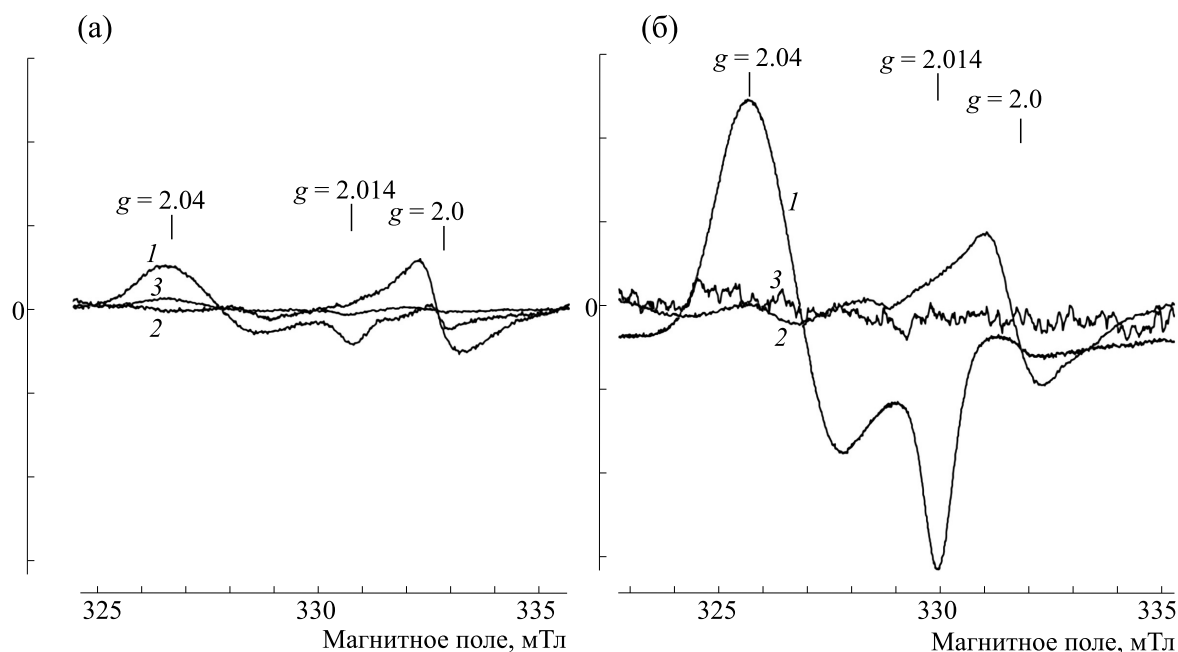


Рис. 2. Спектры ЭПР легких (1), печени (2) и крови (3) хомячков, подвергнутых ингаляции распыленным 10 мМ раствором ДНКЖ (а) и 10 мМ растворами сначала ДНКЖ, а затем ДЭТК (ДНКЖ + ДЭТК) (б). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре Bruker при 77 К, СВЧ-мощности 5 мВт, амплитуде высокочастотной модуляции магнитного поля 0.5 мТ и одинаковом усилении радиоспектрометра.

ЭПР, зарегистрированных при 77 К в крови, легких и печени здоровых (незараженных) хомячков после аэрозольного введения в течение 30 мин 10 мл 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2а) и спектры ЭПР тех же тканей хомячков при том же способе введения 10 мл 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH с последующим 30-минутным введением 10 мМ раствора ДЭТК (ДНКЖ + ДЭТК, рис. 2б). В обоих случаях наибольший сигнал 2.03 (сигнал ЭПР появляющихся в тканях М-ДНКЖ) наблюдался в легких. При ингаляции животных только раствором Б-ДНКЖ-GSH концентрация М-ДНКЖ в этом органе варьировала в пределах 30–40 мкмоль/кг влажной ткани. В крови эта величина варьировала в пределах 3–5 мкмоль/л, а в печени сигнал 2.03 практически не обнаруживался. При ингаляции животных сначала растворами Б-ДНКЖ-GSH, а затем ДЭТК (ДНКЖ + ДЭТК), судя по интенсивности сигнала 2.03, уровень М-ДНКЖ в легких достигал 140–160 мкмоль/кг, т. е. в среднем повышался в четыре-пять раз по сравнению с величиной, наблюдавшейся при ингаляции животным только Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2а). В печени содержание М-ДНКЖ достигало 3 мкмоль/кг, в крови сигнал 2.03 не обнаруживался (рис. 2б).

На рис. 3 приведены спектры ЭПР, зарегистрированные в крови, легких и печени хомячков после обработки в течение 30 мин распыленным 10 мМ раствором ДЭТК с последующим аэрозольным введением 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH. Судя по интенсивности сигнала 2.03 в этих тканях, наибольшее количество М-ДНКЖ обнаруживалось в легких (30–40 мкмоль/кг), максимальная концентрация в печени достигала 10 мкмоль/кг, а в крови – 0.5 мкмоль/кг.

ЭПР-измерение тканей мышей. Аэрозольное введение мышам 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH объемом 10 мл в течение 40 мин приводило, судя по интенсивности сигнала 2.03, к появлению М-ДНКЖ в легких и печени в концентрации соответственно 0.5–1.2 и 1.5–2.0 мкмоль/кг (рис. 4а), т. е., в отличие от сирийских хомячков, аэрозольно вводимые Б-ДНКЖ-GSH достаточно эффективно переходили из легких в кровь, а оттуда в печень. Тем не менее в крови регистрировался лишь очень слабый сигнал 2.03. При последующем введении этим животным 10 мл распыленного 10 мМ раствора ДЭТК уровень появляющихся в тканях мышей М-ДНКЖ практически не повышался. При увеличении концентрации ДЭТК до 50 мМ существенно, в три-четыре раза, увеличивалась концентрация М-ДНКЖ во всех исследованных тканях животных (рис. 4б). При этом в легких уровень М-ДНКЖ варьировал в пределах 1.5–3.0 мкмоль/кг, в печени – 0.8–1.4 мкмоль/кг, а в крови – 0.3–0.5 мкмоль/л.

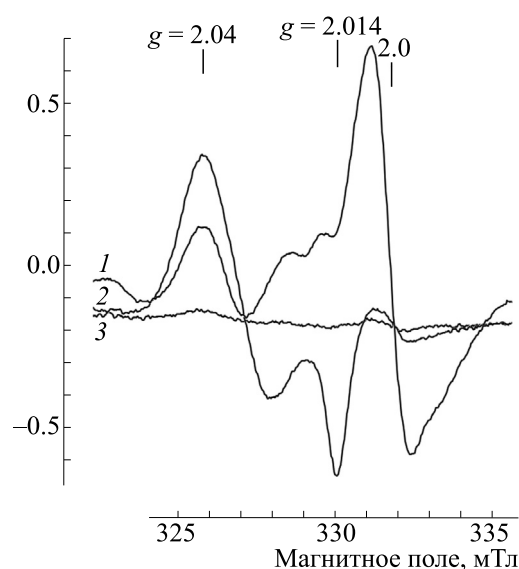


Рис. 3. Спектры ЭПР легких (1), печени (2) и крови хомячков, подвергнутых 30-минутной ингаляции распыленным 10 мМ раствором ДЭТК с последующей 30-минутной ингаляцией распыленным 10 мМ раствором Б-ДНКЖ-GSH (ДЭТК + ДНКЖ). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре Bruker при 77 К, СВЧ мощности 5 мвт, амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля 0.5 мТ и одинаковом усилении радиоспектрометра.

При обратной последовательности аэрозольного введения мышам – сначала 50 мМ раствора ДЭТК, а затем 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH – соотношение содержания возникающих в тканях мышей М-ДНКЖ не менялось: (рис. 5а) оно оставалось наибольшим в легких (в пределах 6–10 мкмоль/кг), в крови достигало уровня 0.8 мкмоль/кг, в печени – 1.5–3.0 мкмоль/кг (рис. 5). При этом наряду с сигналом 2.03 в печени животных обнаруживался сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК – комплексов, возникавших в результате взаимодействия ДЭТК с ДНКЖ (в соответствии со схемой 2). Сигнал ЭПР этих комплексов характеризовался (в полном соответствии с работой [37]) значениями g -фактора, равными $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.02$, $g_{cp} = 2.033$, и разрешенной триплетной сверхтонкой структурой при g_{\perp} (рис. 5б).

Сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК в «чистом виде» обнаруживался в легких после ингаляции животных только 50 мМ раствором ДЭТК (рис. 6а). Концентрация МНКЖ при этом не превышала 0.4 мкмоль/кг. При последующем внутрибрюшинном (в/б) введении этим животным Б-ДНКЖ-GSH в дозе 100 мкмоль/кг массы животных сигнал МНКЖ-ДЭТК в легких маскировался сигналом 2.03, обусловленным примесью крови (рис. 6а). В крови этих животных концен-

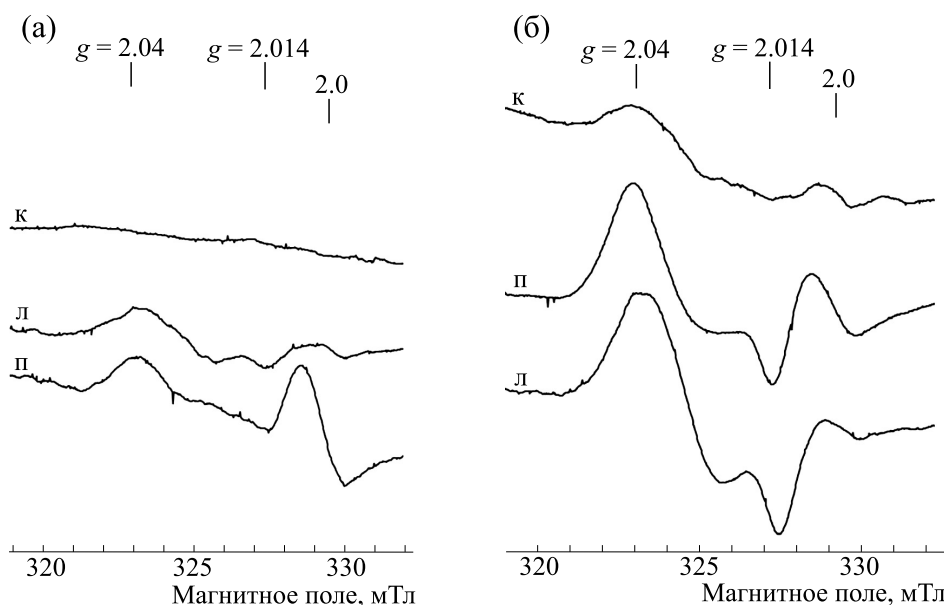


Рис. 4. Сигнал 2.03 в крови (к), легких (л) и печени (п) мышей, подвергнутых 40-минутной ингаляции 10 мМ раствором Б-ДНКЖ-GSH (а) с последующей их 40-минутной ингаляцией 50 мМ раствором ДЭТК (б). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре «РадиоПан» при 77 К, СВЧ мощности 5 мвт, амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля 0.5 мТ и одинаковом усилении радиоспектрометра.

трация М-ДНКЖ достигала 30 мкмоль/л (рис. 6а). Как и в легких, в печени сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК в «чистом виде» обнаруживался после ингаляции животных только 50 мМ раствором ДЭТК, при этом концентрация этих комплексов достигала 3.0 мкмоль/кг (рис. 6а). Как и

в легких, сигнал МНКЖ-ДЭТК в печени маскировался сигналом 2.03 после в/б введения мышам Б-ДНКЖ-GSH в дозе 100 мкмоль/кг (рис. 6а).

Заметный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК в легких и печени регистрировался в них после аэрозольного введения мышам 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-

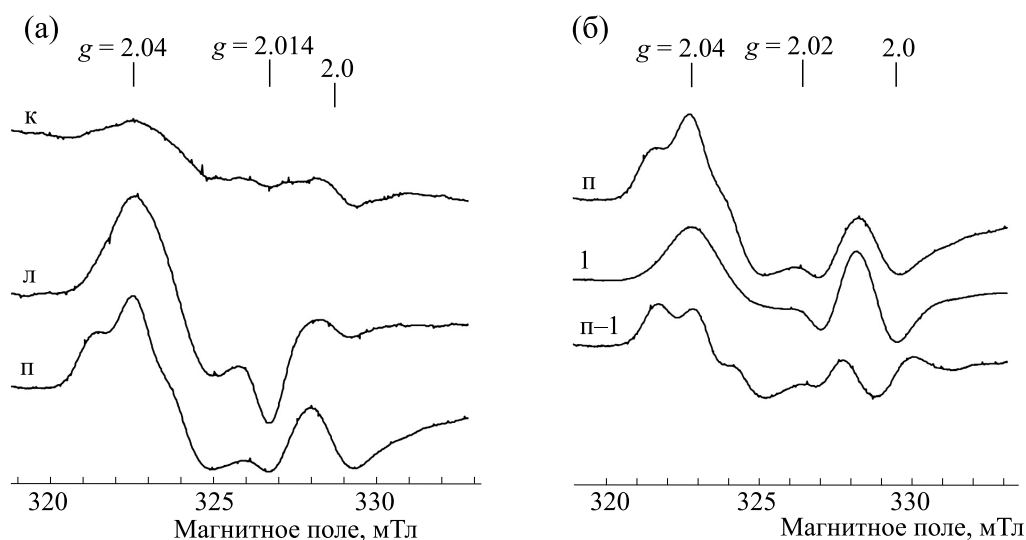


Рис. 5. (а) – Спектры ЭПР, зарегистрированные в крови (к), легких (л) и печени (п) мышей, подвергнутых 40-минутной ингаляции распыленным 50 мМ раствором ДЭТК с последующей ингаляцией этих животных 10 мМ раствором Б-ДНКЖ-GSH. (б) – Демонстрация спектра ЭПР, зарегистрированного в печени мышей (п), как суммы сигнала 2.03 (1) и сигнала МНКЖ-ДЭТК (п-1). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре «РадиоПан» при 77 К, СВЧ мощности 5 мвт, амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля 0.5 мТ и одинаковом усилении радиоспектрометра.

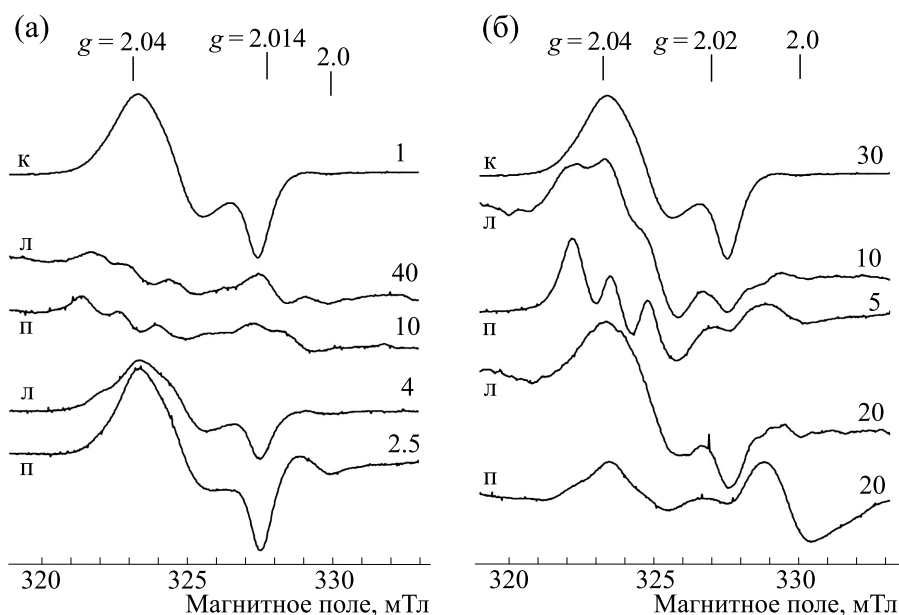


Рис. 6. Спектры ЭПР, зарегистрированные в крови (к), легких (л) и печени (п) мышей. (а) – Животные были подвергнуты в течение 40 мин ингаляции 50 мМ распыленным раствором ДЭТК (спектры 40 и 10) с последующим в/б введением этим животным Б-ДНКЖ-GSH в дозе 100 мкмоль/кг массы животных (спектры 4, 2.5 и 1). (б) – Животные были подвергнуты в течение 40 мин ингаляции 10 мМ распыленным раствором Б-ДНКЖ-GSH (спектры 30, 20 и 20) с последующим введением им ДЭТК в дозе 0.5 мМ/кг массы животных (спектры 10 и 5). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре РадиоПан при 77 К, СВЧ мощности 5 мвт и амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля 0.5 мТ. Относительное усиление радиоспектрометра указано цифрами на правой стороне спектров.

GSH с последующим в/б введением им ДЭТК в дозе 500 мкмоль/кг массы животных (рис. 6б). В легких на этот сигнал накладывался сигнал 2.03, так что суммарная концентрация МНКЖ-ДЭТК и М-ДНКЖ в этой ткани составляла 5.0 мкмоль/кг при концентрации М-ДНКЖ, возникавших после начального введения мышам Б-ДНКЖ-GSH, в 1 мкмоль/кг (рис. 6б). В печени концентрация образующихся у животных МНКЖ-ДЭТК достигала 10 мкмоль/кг ткани при концентрации М-ДНКЖ, возникавших после начального аэрозольного введения мышам Б-ДНКЖ-GSH, в 0.6 мкмоль/кг (рис. 6б). В крови образование МНКЖ-ДЭТК в аналогичных опытах не обнаружено: после в/б введения ДЭТК сохранялись М-ДНКЖ в концентрации 0.5 мкмоль/л, появившиеся в крови после ингаляции мышам Б-ДНКЖ-GSH (рис. 6б).

Значительное различие концентрации образующихся МНКЖ-ДЭТК и М-ДНКЖ в печени (как и в легких), очевидно, было обусловлено включением ДНКЖ в эти ткани преимущественно биядерной ЭПР-неактивной формы этих комплексов. Такое же заключение следует из опытов, в которых после аэрозольного введения мышам раствора Б-ДНКЖ-GSH им вводили в/б раствор N-ацетил-L-цистеина при нейтральных значениях рН в дозе 100 мкмоль/кг. Как в легких, так и в

печени животных интенсивность сигнала 2.03 после такой обработки достоверно (в соответствии со схемой 2) повышалась в два раза: включение в эти ткани N-ацетил-L-цистеина обеспечивало превращение части Б-ДНКЖ в М-ДНКЖ. Более слабый в этом отношении эффект N-ацетил-L-цистеина по сравнению с действием ДЭТК на Б-ДНКЖ определялся, по нашему мнению, высоким сродством ДЭТК к железо-мононитрозильной группе, обеспечивающим практически полное превращение Б-ДНКЖ в МНКЖ-ДЭТК.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований показано, что комбинация соединений Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК обладает выраженной противовирусной активностью в отношении вируса SARS-CoV-2. В соответствии со схемой 2 такая последовательность введения в дыхательные пути животных Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК должна приводить к накоплению в тканях дыхательных путей и легких хомячков высвобождающихся из Б-ДНКЖ катионов нитрозония, что и могло, в соответствии с высказанной в работе [16] одним из соавторов настоящей статьи гипотезой, обеспечивать подавление инфекции COVID-19.

Результаты вышеприведенных ЭПР-исследований здоровых хомячков и мышей, подвергавшихся ингаляции распыленными растворами Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК в различной их последовательности, позволяют утверждать, что, действительно, при ингаляционном введении сначала Б-ДНКЖ-GSH, а затем ДЭТК в тканях органов-мишеней вируса SARS-CoV-2 – дыхательных путей и легких может накапливаться заметное количество катионов нитрозония.

Неожиданный результат этих исследований состоит в том, что в легких при такой последовательности введения указанных соединений здоровым хомячкам не удалось (рис. 2) наблюдать образование ЭПР-активных МНКЖ-ДЭТК, как это ожидалось в соответствии со схемой 2. Единственный эффект, который обнаруживался при дополнительной ингаляции хомячкам раствора ДЭТК после ингаляции им раствора Б-ДНКЖ-GSH, состоял в значительном (трех-четырёхкратном) повышении интенсивности сигнала 2.03, регистрируемого в легких (рис. 2а,б). Если учесть, что вводившиеся животным Б-ДНКЖ-GSH-комплексы ЭПР-неактивны, а сигнал 2.03 обусловлен моноядерной формой ДНКЖ, указанное выше его усиление могло быть обусловлено (в соответствии со схемой 4) появлением в ткани легких дополнительного количества тиолов, обеспечивающих превращение ДНКЖ в М-ДНКЖ. Это означает, что при включении в эти ткани ДЭТК последний, как тиолсодержащий агент, мог повышать внутриклеточный восстановительный потенциал, обеспечивая тем самым восстановление дисульфидов до тиолов. Другой, по-видимому, более реальный механизм повышения уровня восстановительных агентов (или снижения внутриклеточного окислительного потенциала) мог состоять в следующем. ДЭТК, реагируя с ДНКЖ, действительно мог обеспечивать в соответствии со схемой 2 образование МНКЖ-ДЭТК – комплекса, который, в соответствии с результатами работы [38], мог активно связывать анионы супероксида, нейтрализуя их прооксидантное действие. Если учесть, что легкие находятся непосредственно в контакте с кислородом воздуха, следует ожидать наличие в тканях легких значительного количества супероксид-анионов, которого могло оказаться достаточным для распада МНКЖ-ДЭТК при связывании этих комплексов с анионами супероксида. Такой распад мог быть обусловлен, например, изомеризацией в нитрат пероксинитрита, образующегося при связывании супероксида с молекулой NO в лигандной сфере железа в МНКЖ-ДЭТК [38], что должно было приводить к распаду этих комплексов. Кроме того, связанный с МНКЖ-ДЭТК пероксинитрит мог при каталитическом действии железа окислять ДЭТК до его димерной дисульфидной формы (дисульфорама) что также должно было при-

водить к распаду этих комплексов. Такого рода распад МНКЖ-ДЭТК мог приводить к распаду всех этих комплексов, что и могло быть причиной того, что в наших опытах нам не удалось зафиксировать превращение Б-ДНКЖ-GSH при аэрозольном введении сирийским хомячкам раствора Б-ДНКЖ, а затем раствора ДЭТК. При этом катионы нитрозония должны были (в соответствии со схемой 2) высвободиться из Б-ДНКЖ и показывать противовирусное действие, регистрируемое по вирусной нагрузке в тканях органов-мишеней сирийских хомячков.

В результате действия аэрозольно вводимого раствора ДЭТК в легких и печени мышей обнаруживалось образование МНКЖ-ДЭТК (рис. 6а), причем в печени их концентрация была на порядок выше, чем в легких. Появление этих комплексов скорее всего было обусловлено генерацией в легких и печени эндогенного NO, образующего вместе со слабосвязанным внутриклеточным («свободным») железом и ДЭТК соответствующие МНКЖ. Поскольку в легких, контактирующих с атмосферным кислородом, очевидно должно было продуцироваться значительное количество анионов супероксида, их действие, как указывалось выше, должно было приводить, во-первых, к распаду значительной части (существенно большей, чем в печени) МНКЖ-ДЭТК и, во-вторых, могло приводить к исчезновению в легких поступающего в них ДЭТК. В результате при последующей, после ДЭТК, аэрозольной обработке животных раствором Б-ДНКЖ реакция этих комплексов с ДЭТК становилась невозможной, комплексы МНКЖ-ДЭТК не возникали и не могли обеспечить снижение уровня анионов супероксида и тем самым повышение внутриклеточного восстановительного потенциала. Это и могло приводить к тому, что не обнаруживалось, судя по сигналу 2.03, повышение количества ЭПР-активных М-ДНКЖ, как это имело место в опытах при обработке хомячков сначала распыленным раствором Б-ДНКЖ-GSH, а затем ДЭТК (рис. 2 и 3). Концентрация М-ДНКЖ, возникающих в легких в опытах с ингаляцией хомячков растворами сначала ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-GSH (рис. 3), была такой же, как в опытах с ингаляцией этих животных только раствором Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2а).

В отличие от сирийских хомячков, у которых М-ДНКЖ, определяемые в организме животных после аэрозольного введения Б-ДНКЖ-GSH, локализовались преимущественно в легких, у мышей при тех же условиях эксперимента М-ДНКЖ накапливались и в легких, и практически в той же концентрации в печени. Этот феномен, очевидно, был обусловлен ослаблением у мышей гемато-тканевого барьера, т.е. более легким проникновением различных веществ (как Б-ДНКЖ, так и ДЭТК) из клеток в кровь и обратно. Это и при-

водило к тому, что при ингаляции мышей сначала раствором ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-GSH оба этих вещества, поступаая в печень, могли образовывать ЭПР-регистрируемые в этой ткани МНКЖ-ДЭТК (рис. 5). В более значительном количестве эти комплексы появлялись в печени, если Б-ДНКЖ-GSH после аэрозольного введения ДЭТК вводили мышам внутривенно (рис. 66). Характерно, что и при таком способе введения соединений уровень образующихся в печени МНКЖ-ДЭТК был выше, чем в легких.

В заключение следует отметить, что в проведенной нами ранее работе [39] при оценке методом ЭПР локализации М-ДНКЖ в органах крыс при аэрозольном введении Б-ДНКЖ-GSH наблюдалась, как и у сирийских хомячков, преимущественная локализация М-ДНКЖ в тканях легких. Можно предполагать, что у человека (при возможном использовании схемы Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК для лечения COVID-19) появляющиеся при распаде ДНКЖ катионы нитрозония будут преимущественно локализоваться в тканях легких и дыхательных путей, оказывая местное противовирусное действие.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках выполнения государственного задания ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с соответствующими национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. О. Быкова, Н. В. Горбунов, А. П. Волгарёв и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины, **112**, 617 (1991).
2. G. Karupian and N. Harris, J. Exp. Med., **181**, 2171 (1995).
3. C. J. Lowenstein, S. L. Hill, A. Lafond-Walker, et al., Clin. Invest., **92**, 1837 (1996).
4. E. Peterhans, Biol Trace Element Res., **56**, 107 (1997).
5. C. S. Reiss and T. Kamatsu, J. Virol., **72**, 4547 (1998).
6. T. Akaike and H. Maeda, Immunology, **101**, 300 (2000).
7. S. Åkerstrom, M. Mousavi-Jazi, J. Klingstrom, et al., J. Virol., **78**, 1966 (2005).

8. J. Martel, Y.-F. Ko, J. D. Young, et al., Microbes and Infection, **22**, 168 (2020).
9. J. Wu, Nitric Oxide Biol. Chem., **102**, 39 (2020).
10. F. Sodano, E. Gazzano, R. Fruttero, et al., Molecules, **27**, 2337 (2022).
11. E. Keaerts, L. Vijgen, L. Chen, et al., Int. J. Infect. Dis., **8**, 223 (2004).
12. W. Xu, S. Zheng, R. A. Dweik, et al., Free Radic. Biol. Med., **41**, 19 (2006).
13. G. Regev-Shoshani, S. Vimalnathan, B. McMullin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **31**, 48 (2015).
14. E. U. Uehara, B. de Stefano Shida, and C. A. de Brito, Inflamm. Res., **64**, 845 (2015).
15. M. Colosanti, T. Persichini, G. Venturino, et al., IUBMB Life, **48**, 25 (1999).
16. А. Ф. Ванин, Биофизика, **65**, 818 (2020).
17. J. S. Stamler, Cell, **78**, 931 (1994).
18. K. M. Miranda, M. G. Espey, and D. A. Wink, J. Inorg. Biochem., **79**, 237 (2000).
19. T. A. Heinrich, R. S. da Silva, K. M. Miranda, et al., Br. J. Pharmacol., **169**, 1417 (2013).
20. M. Boese, P. I. Mordvintcev, A. F. Vanin, et al., J. Biol. Chem., **270**, 2924 (1995).
21. C. A. Bosworth, J. C. Toledo, J. W. Zmiewski, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **106**, 4671 (2009).
22. M. F. Foster, L. Liu, M. Zhang, et al., Biochemistry, **48**, 792 (2009).
23. A. F. Vanin, Austin J. Analyt. Pharmaceut. Chem., **5**, 1109 (2018).
24. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys., **77**, 279 (2019).
25. А. Ф. Ванин, Биофизика, **65**, 421 (2020).
26. A. F. Vanin, Appl. Magn. Res., **51**, 851 (2020).
27. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing Cambridge, UK, 2019).
28. N. Lehnert, E. Kim, H. N. Dong, et al., Chem Rev., **121**, 14682 (2021).
29. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **29**, 4 (2013).
30. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys., **79**, 93 (2021).
31. L. J. Reed and H. A. Muench, Am. J. Hyg., **27**, 493 (1938).
32. J. F. W. Chan, A. J. Zhang, S. Yuan, et al., Clin. Infect. Dis., **71**, 2428 (2020).
33. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, Nitric Oxide Biol. Chem., **1**, 191 (1997).
34. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **23**, 136 (2011).
35. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **35**, 110 (2013).
36. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004).
37. A. F. Vanin, Methods Enzymol., **301**, 269 (1999).
38. A. F. Vanin, X. Liu, A. Samouilov, et al., Biochim. Biophys. Acta, **1474**, 365 (2000).
39. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., Биофизика, **66**, 1 (2021).

Antiviral Activity of Nitrosonium Cations against SARS-CoV-2 on a Syrian Hamster Model

A.V. Shipovalov*, A.F. Vanin**, O.V. Pyankov*, E.G. Bagryanskaya***, V.D. Mikoyan**,
N.A. Tkachev**, N.A. Asanbaeva***, and V.Ya. Popkova**

*State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor of the Russian Federation,
Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

**N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

***N.N. Vorozhtsov Institute for Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. Akademika Lavrentieva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

The antiviral action of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione and diethyldithiocarbamate against SARS-CoV-2 virus was demonstrated in a Syrian hamster model after subsequent aerosol exposure of SARS-CoV-2-infected animals to the solutions of said compounds. EPR assays on intact hamsters exposed by the aerosol route to the same dose of these solutions showed that iron complexes and diethyldithiocarbamate are predominantly found in lung tissues. These results have been compared with similar measurements made on intact mice: the levels of the said reagents which were present in the lungs and liver were really in the same range. It is suggested that the release of nitrosonium cations from binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione occurs during the interaction of iron complexes towards diethyldithiocarbamate in the animal body. These cations caused S-nitrosation of host and viral cell proteases leading to suppression of SARS-CoV-2 infection.

Keywords: SARS-CoV-2, binuclear iron dinitrosyl complexes with glutathione, sodium diethyldithiocarbamate, nitrosonium cations