

ПРОТИВОВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ В ОТНОШЕНИИ SARS-CoV-2 РАСТВОРОВ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА ПРИ ИНГАЛЯЦИИ СИРИЙСКИМ ХОМЯЧКАМ В «NOSE-ONLY»-КАМЕРЕ

© 2024 г. 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. Стекленева****

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

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

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

****Институт химической кинетики и горения СО РАН, Институтская ул., 3, Новосибирск, 630090, Россия

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

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 07.10.2024 г.

Принята к публикации 16.10.2024 г.

Не обнаружено заметного изменения противовирусного эффекта ингаляции сирийским хомячкам, инфицированным вирусом SARS-CoV-2, растворов биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) и диэтилдитиокарбамата натрия (ДЭТК) при их последовательном введении животным в «nose-only»-камере или «whole-body»-камере. Ингаляция в «whole-body»-камере, приводившая к намоканию тела животных, приводила только к снижению регистрируемого методом ЭПР в легких уровня моноядерных динитрозильных комплексов железа с тиоловыми группами белков без изменения общего содержания биядерной и моноядерной формы динитрозильных комплексов железа. Предполагается, что противовирусное действие Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в отношении вируса SARS-CoV-2 было обусловлено катионами нитрозония (NO^+), высвобождающимися из Б-ДНКЖ-GSH в результате его разрушения молекулами ДЭТК. Аналогичное противовирусное действие на модели сирийских хомячков оказывал и менее стабильный, чем Б-ДНКЖ-GSH, комплекс с меркаптосукцинатом, без дополнительной аэрозольной обработки раствором животных ДЭТК.

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

DOI: 10.31857/S0006302924060176, **EDN:** NKJCHT

Ранее мы показали, что ингаляция сирийским хомячкам, инфицированным вирусом SARS-CoV-2, распыленного раствора биядерного динитрозильного комплекса железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH), в особенности с последующей ингаляцией тем же животным распыленного раствора диэтилдитиокарбамата (ДЭТК), приводит к заметному подавлению репликации вируса SARS-CoV-2 в органах-мишениях экспериментальных животных [1]. Тем самым было подтверж-

Сокращения: Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат натрия, Б-ДНКЖ-MSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с меркаптосукцинатом.

ждено ранее высказанное предположение о том, что катионы нитрозония (NO^+), высвобождающиеся в соответствии со схемой 1 под действием ДЭТК из Б-ДНКЖ-GSH, могут подавлять репликацию вирусов SARS-CoV-2 в живых организмах [2]. Предполагается, что этот эффект достигается вызванным катионами нитрозония S-нитрозированием критически важных для вируса SARS-CoV-2 тиолсодержащих белков.

Особенность использованного в нашей работе [1] способа ингаляции сирийским хомячкам распыленных растворов Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК состояла в том, что эти растворы (вместе с воздухом) подавались в камеру с находившимися в ней

животными («whole-body»-камера). За время экспозиции происходило заметное намокание тела хомячков и, как следствие этого, переохлаждение животных, которое могло инициировать активацию защитных систем организма, в том числе иммунной системы, что и могло приводить к снижению или отсутствию у сирийских хомячков про-

явлений коронавирусной инфекции. Что касается усиления этого эффекта при ингаляции животным сначала динитрозильных комплексов железа, а затем ДЭТК – оно могло быть обусловлено увеличением времени увлажнения животных и тем самым более эффективным функционированием защитных систем организма.

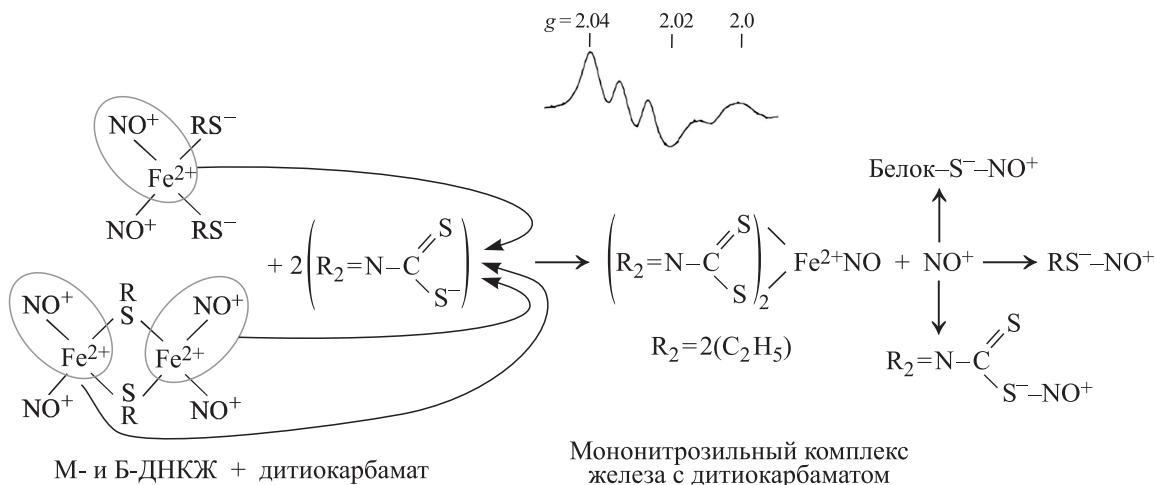


Схема 1. Высвобождение NO^+ из биядерных и моноядерных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (Б- и М-ДНКЖ) под действием производных дитиокарбамата с последующим включением катионов нитрозона в реакцию S-нитрозирования. В верхней части схемы показан зарегистрированный при 77К сигнал ЭПР мононитрозильного комплекса железа (МНКЖ) с дитиокарбаматом, возникающего при связывании дитиокарбамата с железо-мононитрозильным фрагментом, входившем в железо-динитрозильную группу ДНКЖ.

Для того, чтобы проверить, не обусловлен ли обнаруженный нами ранее эффект ослабления коронавирусной инфекции сирийских хомячков при ингаляции им растворов динитрозильных комплексов железа и ДЭТК увлажнением их тела, в настоящей работе мы проверили действие аналогичной процедуры ингаляции сирийским хомякам в режиме, не допускающем заметного увлажнения тела животных. Для этого была использована «nose-only»-камера для обработки мелких животных, сконструированная в Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН [3]. В этой установке распыленные растворы динитрозильных комплексов железа и ДЭТК могли приходить в со-прикосновение с животным только в области носа (в «nose-only»-камере) (рис. 1). Тем самым могла быть достигнута полная имитация возможной процедуры лечения пациентов аэрозольной формой растворов Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК, полученной с помощью небулайзера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы нитрит натрия (Sigma, США), ферросульфат ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fluka, Швейцария), органические компоненты – восстановленный глутатион, меркаптосукцинат и диэтилдитиокарбамат натрия (все – Sigma, США).

Культура клеток. Культура клеток *Vero E6* была получена из Коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора РФ (коллекционный шифр 221) и выращена на минимальной среде, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США), пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл, Gibco, США) при 37°C и 5%-м содержании CO_2 . После инфицирования клеток использовали аналогичную (поддерживающую) среду, только с добавлением 2% фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

Вирусы. В работе с сирийскими хомячками использовали штамм вируса SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/Vologda-171613-1208/2020, высоко гомологичный оригинальному штамму Wuhan-Hu-1

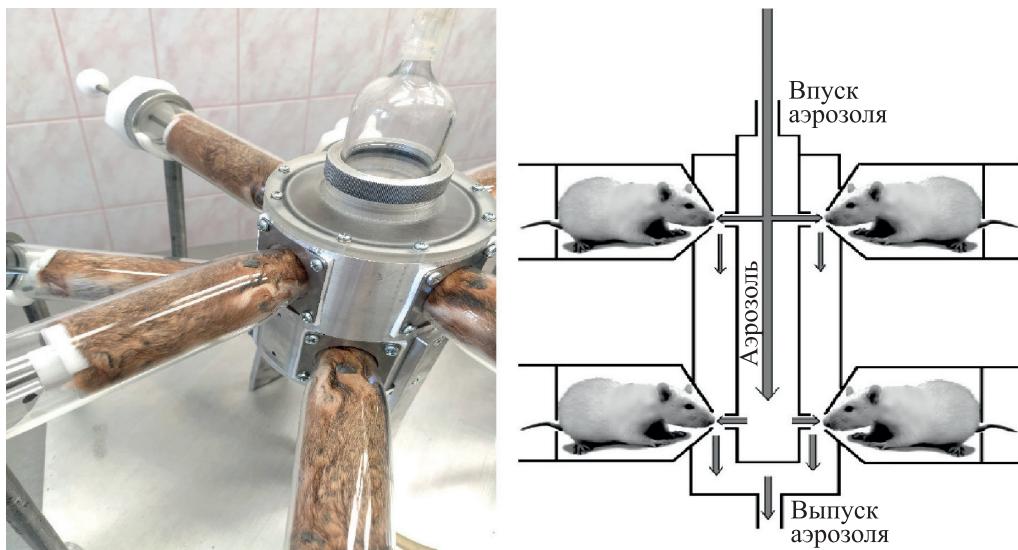


Рис. 1. Использованная в экспериментах «nose-only»-камера для обработки сирийских хомячков распыленными растворами ДНКЖ и ДЭТК, справа — общая схема аэрозольной камеры по [4].

(идентификатор GISAID: EPI_ISL_406844, линии В). Данный штамм был получен из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора РФ. Вирус культивировали в клетках *Vero E6*. Вирусные стоки хранили при температуре -80°C до начала экспериментальных исследований.

Титрование вируса. Инфекционную активность вируса определяли методом конечных разведений на клетках *Vero E6* по методу Рида и Менча (значения указаны в единицах 50%-й тканевой цитопатогенной дозы $T\text{ЦД}_{50}/\text{мл}$).

Клетки *Vero E6* высевали за 24 ч до заражения в 96-луночные планшеты с посевной дозой $1.5 \cdot 10^4$ кл/лунку. В день эксперимента были сделаны последовательные 10-кратные разведения вируса, в общей сложности от шести до восьми лунок были заражены каждым разведением вируса. После 72-часовой инкубации клетки фиксировали 4%-м раствором пара формальдегида с последующим окрашиванием 0.1% кристаллическим фиолетовым. Инфекционный титр был рассчитан по формуле: $\lg(T\text{ЦД}_{50}) = \lg(d_0) + + \lg(R) \cdot (f + 1)$, где d_0 — наибольшее разведение, дающее цитопатическое действие во всех лунках, f — число, полученное из числа положительных лунок, рассчитанных как среднее арифметическое, а R — коэффициент разведения.

Тестируемые соединения. Биядерные динитроильные комплексы железа (Б-ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами были синтезированы в Федеральном исследовательском центре химической физики им. Н.Н. Семенова РАН и Новоси-

бирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН по методике, использованной в работе [4]. В исследовании была оценена противовирусная активность трех соединений: Б-ДНКЖ-GSH — динитроильный комплекс железа с глутатионовым лигандом и Б-ДНКЖ-MSH — динитроильный комплекс железа с меркаптоуксуснатом в качестве тиолсодержащего лиганда; а также ДЭТК, вводившийся животным после Б-ДНКЖ-GSH.

Модельные животные. В экспериментах использовали самцов аутбредных сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) с массой тела 80–100 г и самцов инбредной линии мышей BALB/c (*Mus musculus strain BALB/c*) с массой тела 18–20 г. Животные были получены из Питомника лабораторных животных ИЦИГ СО РАН. Акклиматизация к условиям эксперимента была проведена в течение 7 суток до заражения. Во время экспериментов температура в клетках поддерживали температуру 22–24°С и относительную влажность 40–55%, животные имели неограниченный доступ к пище и воде.

Исследование противовирусной активности соединений на животных. В эксперименте использовали 4 группы животных (3 опытных и 1 контрольная) по 8 сирийских хомячков в каждой. Под внутримышечным наркозом Zoletil 100 (Virbac, Франция) всем животным была проведена интраназальная инокуляция в оба носовых хода по 50 мкл среды, содержащей суммарно 30–50 ИД_{50} (50% инфицирующих доз) вируса SARS-CoV-2.

Через 120 ч после заражения сирийских хомячков подвергали эвтаназии внутривенным введением 500 мкл долетала (200 мг/мл пентобарбитала натрия, Vétoquinol SA). Ткани легких и носовых раковин забирали с соблюдением правил асептики. Из образцов тканей с помощью гомогенизатора FastPrep-24 (MP Biomedicals, США) подготавливали 10%-е гомогенаты на среде MEM, осветляли путем центрифугирования (MiniSpin plus, Eppendorf, Германия), после чего проводили отбор аликвот от каждого образца для ПЦР-анализа и определения инфекционного титра вируса в пробах (вирусной нагрузки) на культуре клеток *Vero E6*. Затем гомогенаты подвергали немедленной заморозке и хранению при температуре –70°C.

Противовирусную эффективность соединений оценивали по снижению вирусной нагрузки в тканях носовой полости и легких животных из экспериментальной группы по отношению к аналогичным показателям животных из контрольной группы.

Определение РНК вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для выделения РНК использовали набор «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Синтез кДНК из выделенной РНК проводили реагентами для реакции обратной транскрипции «Реверта-L» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Набор реагентов «Вектор-ПЦРРВ-COVID19-RG» (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) использовали для amplификации фрагментов кДНК вируса SARS-CoV-2. Вирусная нагрузка была определена по значениям порога цикла (Ct). В качестве стандарта использованы серийные разведения стандартизированного положительного контроля, поставляемого с набором реагентов для ПЦР.

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 $1.5 \cdot 10^4$ кл/лунку. В день эксперимента были сделаны последовательные 10-кратные разведения вируса в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 2% эмбриональной 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%-м кристаллическим фиолетовым. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали как цитопатическое действие. Расчет титра вируса проводили по формуле Рида–Менча и выражали в Ig TЦД₅₀/мл.

Введение соединений/препаратов. Аэрозольное введение соединений проводили в «nose-only» камере в течение 20 мин. Рабочий расход воздуха через камеру составлял 10 л/мин. В стаканы-держатели камеры одновременно помещали 8 хомячков. Диспергирование проводили распылителем «Омрон» с расходом воздуха 6 л/мин. В распылитель заливали 10 мл 10 мМ водного раствора препаратов. Отбиаемый аэрозоль улавливали с помощью пробоотборника (МЦ-2), соединяемого с выходным штуцером камеры. Объемная скорость отбора проб аэрозоля в пробоотборнике составляла 10 ± 0.5 л/мин, объем сорбирующей жидкости (дистиллированная вода) – 10 мл.

Измерение спектров ЭПР изолированных тканей нативных (незараженных) животных. После аэрозольной обработки нативных (незараженных) животных (сирийских хомячков и мышей) растворами Б-ДНКЖ-GSH, ДЭТК или Б-ДНКЖ-MSH проводили эвтаназию методом трансцервикальной дислокации для последующего определения методом ЭПР концентрации парамагнитной моноядерной формы динитрозильных комплексов железа (М-ДНКЖ) и МНКЖ-ДЭТК в изолированных образцах крови, легких и печени. Эти образцы помещали в пластмассовые трубочки диаметром 4 мм и замораживали их в жидким азоте. Для последующих ЭПР-измерений препаратов замороженных тканей трубочки с замороженными в них тканями извлекали из жидкого азота и постепенно, нагревая в руках, поршнем выдавливали ткани из трубочек в жидким азоте в палец кварцевого сосуда Дьюара соответствующей формы. ЭПР-измерения проводили на ЭПР-радиоспектрометре фирмы Bruker (Германия) при следующих параметрах: центр поля 3280 Гц, мощность 2 мВт, амплитуда модуляции 5 Гц, частота модуляции 100 кГц. В качестве эталонного образца (стандарта) при определении концентрации М-ДНКЖ, возникающих в тканях животных, использовали замороженный раствор М-ДНКЖ-GSH с известной концентрацией. Поскольку плотность ткани легких в два раза меньше плотности воды, после оценки в соответствии со стандартом содержания М-ДНКЖ в этой ткани полученную величину удваивали.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica v13.0. Достоверность различий между группами оценивали при помощи непараметрических методов сравнения. Для сравнения межгрупповых различий использован *H*-критерий Краскела–Уоллиса. При выявлении статистической неоднородности значений, полученных для животных экспериментальных групп по сравнению с группой контроля, применяли критерий Данна и *U*-критерий Манна–Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

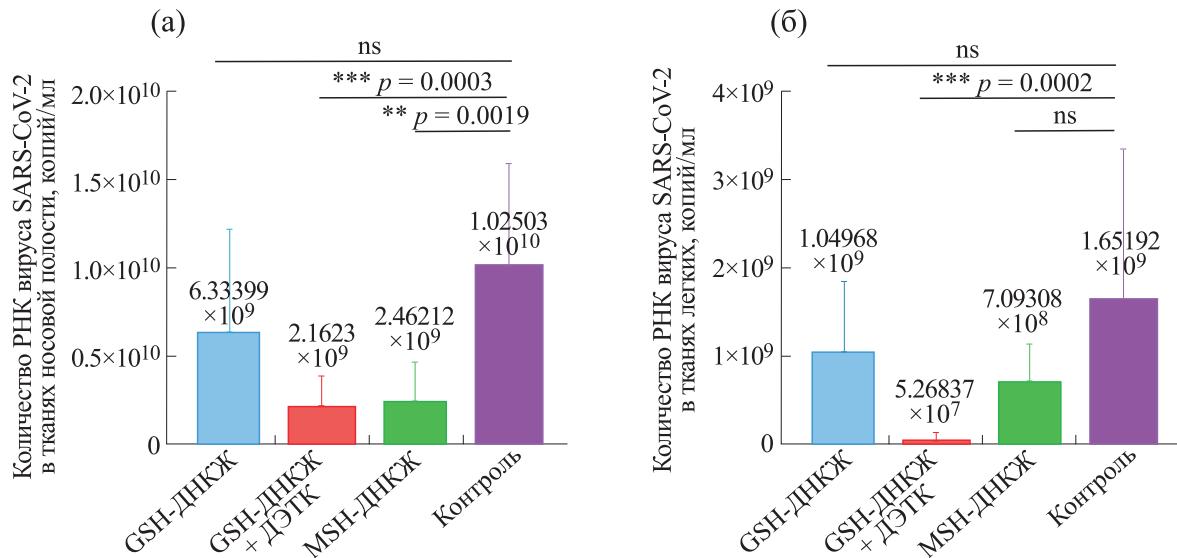


Рис. 2. Вирусная нагрузка в тканях полости носа и легких сирийских хомячков после интраназального заражения SARS-CoV-2. Гистограммы медианных значений пороговых циклов (C_t) в гомогенатах тканей носовой полости (а) и легких (б), в которых вершиной гистограммы представлены медианы, вертикальной линией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

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Противовирусное действие растворов Б-ДНКЖ-GSH, Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК и Б-ДНКЖ-MSH в отношении вируса SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка (ингаляция в камере «nose-only»). Противовирусную активность исследовали по степени снижения вирусной нагрузки в тканях органов-мишеней (полость носа и легкие) животных групп лечения относительно группы контроля. Сравнение вирусной нагрузки осуществляли по значениям порогового цикла (C_t) реакции ОТ-ПЦР реального времени с мишенью на ген *1ab* вируса SARS-CoV-2.

На рис. 2 приведены результаты оценки противовирусной активности Б-ДНКЖ-GSH самого по себе и при последующем действии на животных ДЭТК, а также одного Б-ДНКЖ-MSH в отношении вируса SARS-CoV-2 в тканях легких и полости носа.

Для всех групп лечения наблюдало снижение количества РНК в тканях носовой полости. Межгрупповые сопоставления по критерию Краскела—Уоллиса выявили статистическую неоднородность ($p = 0.0064$). Тест Данна показал достоверное различие значений вирусной нагрузки в группе GSH-ДНКЖ+ДЭТК ($p = 0.0109$) в сравнении с группой контроля. В тесте Манна—Уитни для групп Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0003$) и Б-ДНКЖ-MSH ($p = 0.0019$) различия носили достоверный характер, концентрация вирусной РНК снижалась в 9,11 и 8,35 раз соответственно.

В тканях легких также регистрировали снижение концентрации вирусной РНК для всех групп лечения. По критерию Краскела—Уоллиса были выявлены статистически значимые различия между группами ($p = 0.0008$). В teste множественных сравнений Данна значения, полученные для группы GSH-ДНКЖ+ДЭТК, достоверно отличались ($p = 0.0009$) от контроля.

При межгрупповом сравнении с использованием *U*-критерия Манна—Уитни в группе Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0002$) значения вирусной нагрузки в легких были достоверно ниже контроля в 183,46 раза.

Инфекционный титр вируса в гомогенатах тканей полости носа (рис. 3а) и легких (рис. 3б) определяли методом титрования на культуре клеток *Vero E6*. Межгрупповые сопоставления значений титра вируса в тканях носовой полости по критерию Краскела—Уоллиса выявили статистическую неоднородность групп ($p = 0.0079$).

Тестом Данна показаны достоверные различия значений вирусной нагрузки в группах Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0231$) и Б-ДНКЖ-MSH ($p = 0.0167$) по сравнению с группой контроля в сторону снижения вирусной нагрузки в полости носа у животных групп лечения.

Значения инфекционного титра, определенные в тканях носовой полости сирийских хомячков, для животных групп Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0059$, тест Манна—Уитни) и ДНКЖ-MSH ($p = 0.0053$, тест Манна—Уитни) достоверно отличались.

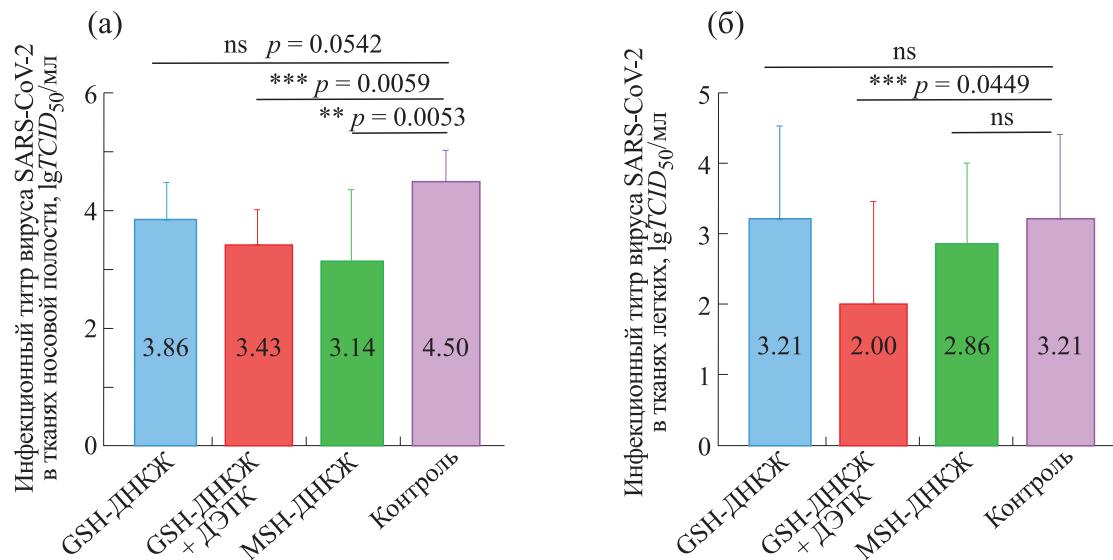


Рис. 3. Инфекционный титр в тканях полости носа и легких сирийских хомячков после интраназального заражения SARS-CoV-2. Гистограммы медианных значений инфекционных титров ($\lg T\text{ЦД}_{50}/\text{мл}$) в гомогенатах тканей носовой полости (а) и легких (б), в которых вершиной гистограммы представлены медианы, вертикальной линией – 95% доверительный интервал. Сокращения: * – статистически значимо при $p < 0.05$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ** – статистически значимо при $p < 0.01$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ns – (not significant) незначимые различия.

чались от контроля на 1.07 и 1.36 $\lg T\text{ЦД}_{50}/\text{мл}$ соответственно. В группе Б-ДНКЖ-GSH также наблюдали снижение концентрации инфекционного вируса на 0.64 $\lg T\text{ЦД}_{50}/\text{мл}$, но с низким уровнем достоверности ($p = 0.0542$, тест Манна–Уитни).

Достоверное снижение инфекционного титра в тканях легких на 1.21 $\lg T\text{ЦД}_{50}/\text{мл}$ по сравнению с данными, полученными для животных контрольной группы, регистрировали только в группе Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0449$, тест Манна–Уитни).

Таким образом, эксперименты на сирийских хомячках с ингаляцией в «nose-only» камере показали, что сочетанное действие Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК приводит к ингибированию репликации коронавируса SARS-CoV-2, что выражается в достоверном снижении количества РНК в тканях носовой полости и легких, уменьшению значений инфекционного титра в тканях носовой полости и тенденции к снижению количества коронавируса в тканях легких сирийского хомячка.

Полученные нами результаты полностью снимают высказанное выше предположение о том, что обнаруженный нами ранее в работе [1] противовирусный эффект обработки сирийских хомячков раствором Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в «whole-body»-камере мог быть обусловлен увлажнением тела животных. Поскольку такого увлажнения не

было в режиме ингаляции «nose-only», можно уверенно утверждать, что в обоих режимах ингаляции обнаруженный нами на сирийских хомячках противовирусный эффект был обусловлен катионами нитрозония высвобождающимися как из Б-ДНКЖ-GSH, так и из Б-ДНКЖ-MSH.

Определение концентрации динитрозильных комплексов железа в органах сирийских хомячков, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH, Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК и Б-ДНКЖ-MSH в «nose-only»-камере методом ЭПР. Как и в экспериментах с ингаляцией в «whole-body»-камере [1], в аналогичных опытах с ингаляцией тем же животным распыленных растворов динитрозильных комплексов с глутатионом или меркаптосукцинатом в режиме «nose-only» только в легких регистрировался интенсивный сигнал ЭПР с $g_{\text{cp}} = 2.03$ (сигнал 2.03 с $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$), характерный для М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [5]. В крови и печени этот сигнал не обнаруживался. В печени регистрировался только симметричный сигнал ЭПР эндогенных свободных радикалов при $g = 2.0$.

Появление в легких М-ДНКЖ, характеризующихся сигналом 2.03, было обусловлено переходом железо-динитрозильных групп из Б-ДНКЖ-GSH или Б-ДНКЖ-MSH на тиоловые группы белков. О белковой природе этих комплексов свидетельствовало сохранение формы сигнала

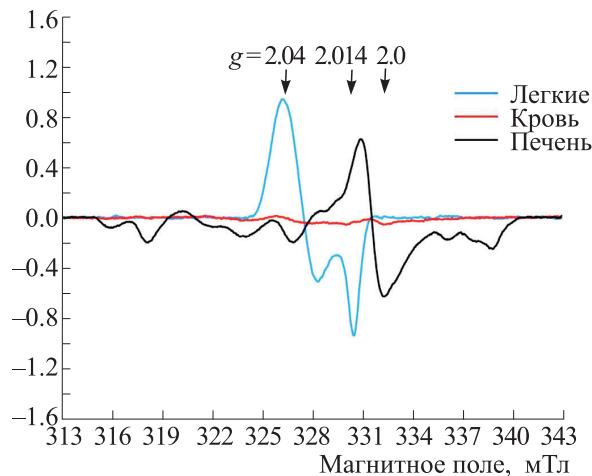


Рис. 4. Спектры ЭПР легких, печени и крови сирийских хомячков после ингаляции распыленными растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в режиме «nose-only». Регистрацию спектров проводили при 77 К и одинаковом усилении радиоспектрометра.

2.03 при повышении температуры его регистрации от 77 К до комнатной температуры. При этой температуре подвижность белков была недостаточной для усреднения анизотропии g -фактора, что приводило бы к сужению и симметризации сигнала 2.03, как это имело бы место для низкомолекулярных М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, как например, для М-ДНКЖ-GSH [6].

Судя по интенсивности сигнала 2.03 в тканях легких концентрация М-ДНКЖ в этой ткани достигала 40 мкмоль/кг, т. е. того же уровня, полученного в работе [1] для ткани легких сирийских хомячков, обработанных только растворами Б-ДНКЖ-GSH в «whole-body»-камере. При последующей ингаляции сирийским хомячкам раствора ДЭТК, судя по интенсивности сигнала 2.03, в легких наблюдалось небольшое снижение в 1.5–2.0 раза концентрации М-ДНКЖ, что резко контрастировало с 3-4-кратным увеличением концентрации этих комплексов в аналогичных опытах в «whole-body»-камере [1]. В крови и печени хомячков, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в «nose-only»-камере сигнал 2.03 не регистрировался. Как сказано выше, он наблюдался у этих животных только в легких (рис. 4).

Как и в работе [1], в настоящем исследовании не удалось зарегистрировать в легких приведенный на схеме 1 триплетный сигнал ЭПР, обусловленный мононитрозильными комплексами железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК). В соответствии со схемой 1, обнаружение этих комплексов могло бы служить однозначным свидетельством того, что в легких действительно появляются катионы нитрозонания, вызывающие подавление репликации вируса SARS-CoV-2 в легких. Как и в нашей

предыдущей работе [1], мы полагаем, что приведенные на схеме 1 превращения в легких действительно имели место, однако зарегистрировать появление МНКЖ-ДЭТК в легких оказалось невозможным из-за быстрого исчезновения этих комплексов в результате обнаруженного в работе [7] губительного действия на них анионов супероксида. Последнее представляется вполне вероятным, поскольку в легких из-за их контакта с атмосферным кислородом уровень анионов супероксида мог существенно превышать содержание этих анионов в тканях других органов животных, в которых методом ЭПР в работах удалось зарегистрировать появление МНКЖ-ДЭТК при воздействии ДЭТК *in vivo* и *in vitro* как на Б-, так и на М-ДНКЖ [8, 9].

При ингаляции в «nose-only»-камере распыленными растворами Б-ДНКЖ-MSH (без ДЭТК) количество М-ДНКЖ, появлявшихся в легких животных, было на порядок ниже, чем при ингаляции растворов Б-ДНКЖ-GSH без ДЭТК. Это различие, очевидно, было обусловлено низкой стабильностью Б-ДНКЖ-MSH [10], быстро расходившихся в ходе их прохождения по дыхательным путям. Тем не менее, благодаря способности этих комплексов высвобождать при распаде катионы нитрозонания, они обнаруживали более заметное снижение как вирусной нагрузки, так и титра вируса в носовой полости хомячков, чем это имело место при обработке животных Б-ДНКЖ-GSH (без ДЭТК) (рис. 2а и 3а).

В легких это различие было менее выраженным, что, очевидно, было обусловлено тем, что до легких из-за низкой стабильности Б-ДНКЖ-MSH доходило лишь небольшое количество этих комплексов (рис. 2б и 3б). Более того, даже при

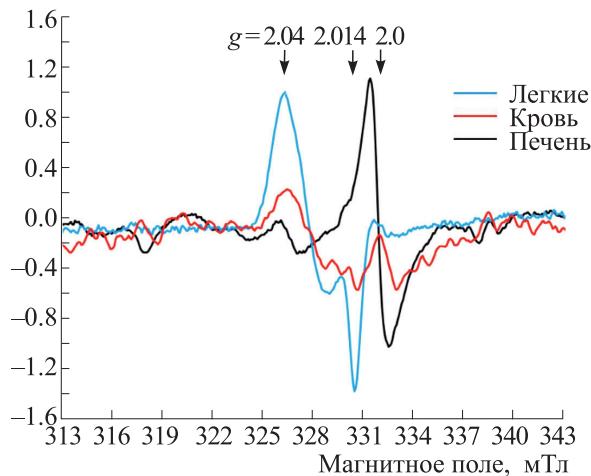


Рис. 5. Спектры ЭПР легких, печени и крови мышей, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в «nose-only»-камере. Регистрацию спектров проводили при 77 К и одинаковом усилении радиоспектрометра.

дополнительной после Б-ДНКЖ-GSH ингаляции хомякам раствора ДЭТК, разрушавшего Б-ДНКЖ-GSH с выделением из них значительного количества катионов нитрозония, вирусная нагрузка и титр вируса в носовой полости у этих животных были не ниже, чем у хомячков, обработанных раствором Б-ДНКЖ-MSH (без ДЭТК) (рис. 2а и 3а). И только в легких при ингаляции растворов Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК противовирусный эффект был более выраженным, чем при ингаляции раствора Б-ДНКЖ-MSH (без ДЭТК) (рис. 2б и 3б).

Определение концентрации динитрозильных комплексов железа в органах мышей, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH в «nose-only»-камере методом ЭПР. При ингаляции мышам растворов Б-ДНКЖ-GSH с ДЭТК и без ДЭТК, как и в аналогичных опытах на сирийских хомячках, обнаружено лишь одно отличие от результатов таких же опытов в «whole-body»-камере. В этом случае дополнительная ингаляция мышам раствора ДЭТК не приводила к заметному повышению уровня М-ДНКЖ, возникающих в легких. При ингаляции в «nose-only»-камере комплексы М-ДНКЖ также появлялись в крови и печени, но их уровень после ингаляции раствора ДЭТК не повышался, как в режиме ингаляции «whole-body» [1], а снижался. Спектры ЭПР легких, печени и крови мышей, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК, приведены на рис. 5.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной результат проведенных исследований состоит в том, что они полностью снимают предположение о том, что полученные нами ра-

нее данные о противовирусном действии в опытах на сирийских хомячках, последовательно обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК, могут определяться увлажнением тела животных. Мы не обнаружили достоверных различий в снижении вирусной нагрузки в тканях органов мишени животных при ингаляционном введении им растворов Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в «nose-only»-камере, не приводящем к увлажнению поверхности тела животных, и в «whole-body»-камере, приводившем к такому увлажнению. В связи с этим есть основание утверждать что причиной противовирусного действия Б-ДНКЖ-GSH + + ДЭТК действительно является высвобождение из Б-ДНКЖ-GSH соответствии со схемой 1 катионов нитрозония, которые и подавляют репликацию коронавируса SARS-CoV-2.

Более того, оказалось, что существенно менее стабильные, чем Б-ДНКЖ-GSH, их аналоги, содержащие в качестве тиоловых лигандов меркаптосукцинат, способны оказывать противовирусное действие на хомячков без дополнительной их обработки раствором ДЭТК. Концентрация катионов нитрозония, образовавшихся в результате самопроизвольного распада Б-ДНКЖ-MSH, оказалось достаточной для появления, особенно в верхних дыхательных путях – носовой полости – противовирусного эффекта, даже более значительного, чем аналогичное действие Б-ДНКЖ-GSH с дополнительной ингаляцией раствора ДЭТК (рис. 2а и 3а).

Что касается легких, то подавление в них репликации вируса SARS-CoV-2 было наиболее

резко выраженным только при обработке животным растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК (рис.2б и 3б). При этом оно практически не проявлялось при обработке хомячков в камере «nose-only» как раствором Б-ДНКЖ-MSH, так и раствором Б-ДНКЖ-GSH без ДЭТК (рис. 2б и 3б). Очевидно, причиной такого ослабления в первом случае было снижение количества Б-ДНКЖ-MSH из-за распада этих комплексов на пути к легким, а во втором случае, наоборот, – из-за высокой стабильности Б-ДНКЖ-GSH, распад которых с высвобождением из этих комплексов значительного количества достигался только при действии на них ДЭТК.

Это предположение полностью согласуется с фактом резкого различия в интенсивности сигнала 2.03 при обработке животных растворами этих комплексов: она была существенно выше при ингаляции хомячкам раствора Б-ДНКЖ-GSH.

Тем не менее Б-ДНКЖ-MSH (без ДЭТК), как и Б-ДНКЖ-GSH, но уже в комбинации с ДЭТК, могут в перспективе явиться основой для разработки лекарств для купирования COVID-19 у человека.

В настоящее время получены данные, позволяющие предполагать, что репликация коронавируса SARS-CoV-2 в организме животных и человека может подавляться также в результате ингаляции потока газообразного NO с концентрацией 1000 ppm и выше [11]. Дело в том, что при такой ингаляции нейтральные молекулы, попадая через легкие в кровь, практически полностью трансформируются в ней в катионы нитрозония, которые, как мы полагаем, исходя из полученных в нашей настоящей и предыдущей [1] работах, могут вызвать подавление репликации коронавируса SARS-CoV-2.

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

Не исключено, что оба эти способа могут явиться основой для создания метода лечения COVID-19, а возможно и других респираторных

вирусных инфекций, а также такого социально опасного заболевания, как туберкулез.

В заключение остановимся на факте резкого повышения уровня М-ДНКЖ в легких, крови и печени хомячков и мышей при дополнительной (после Б-ДНКЖ-GSH) обработке животных в «whole-body»-камере раствором ДЭТК. Наиболее вероятной причиной этого повышения могло быть повышение в тканях этих животных уровня тиолов, обеспечивающих в соответствии с характерным для моно- и биядерных динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами химическим равновесием между этими формами динитрозильных комплексов превращение диамагнитных, ЭПР-неактивных биядерных комплексов в парамагнитные, ЭПР-активные моноядерные [5]. Спрашивается, почему дополнительная ингаляция раствора ДЭТК могла приводить к повышению уровня тиолов в легких, крови и печени, которые были выбраны нами для ЭПР измерений? Вероятнее всего, этот эффект мог быть обусловлен антиоксидантной активностью возникающих при взаимодействии динитрозильных комплексов железа с ДЭТК МНКЖ-ДЭТК, конкретно, их способностью связывать анионы супероксида [7]. Есть все основания полагать, что увлажнение – намокание тела животных при их обработке в «whole-body»-камере, приводившее к их охлаждению, должно было инициировать у животных окислительный стресс, как способ нагрева тела животных. Это стресс и мог вызывать снижение уровня тиолов в организме животных, которое блокировалось в результате антиоксидантного действия МНКЖ-ДЭТК на этих животных.

Длительный окислительный стресс, вызванный переохлаждением животных при ингаляции в «whole-body»-камере мог инициировать и распад обеих форм динитрозильных комплексов, в результате, как это было показано в [12], атаки анионов супероксида не только на МНКЖ-ДЭТК, но и на М- и Б-ДНКЖ. Только более слабое средство последних к анионам супероксида не приводило к заметному снижению динитрозильных комплексов в тканях хомячков и мышей, подвергавшихся в течение суммарно часа увлажнению действию ингаляции. Не исключено, что при большей длительности этой процедуры она могла приводить к снижению содержания динитрозильных комплексов железа в тканях животных, и тем самым к ослаблению их противовирусного действия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00009) и в рамках выполнения Государственного задания ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ ПРИ РАБОТЕ С ЖИВОТНЫМИ.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Пьянков О. В., Багрянская Е. Г., Микоян В. Д., Ткачев Н. А., Асанбаева Н. А. и Попкова В. Я. Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка. *Биофизика*, **67**, 969–981 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050167
- Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами как доноры катиона нитрозония могут подавлять вирусные инфекции (гипотеза). *Биофизика*, **65**, 818–823 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920040250
- Onischuk A. A., Tolstikova T. G., Sorokina I. V., Zhukova N. A., Baklanov A. M., Karasev V. V., Borovkova O. V., Dultseva G. G., Boldyrev V. V., and Fomin V. M. Analgesic effect from Ibuprofen nanoparticles inhaled by male mice. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, **22** (3), 245–254 (2009). DOI: 10.1089/jamp.2008.0721
- Borodulin R. R., Kubrina L. N., Shvydkiy V. O., Lakomkin V. L., and Vanin A. F. A simple protocol for the synthesis of dinitrosyl iron complexes with glutathione: EPR, optical, chromatographic and biological characterization of reaction products. *Nitric Oxide*, **35**, 110–115 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2013.08.007
- Vanin A. F., Poltorakov A. P., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., and Burbae D. S. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide*, **23**, 136–149 (2010). DOI: 10.1016/j.niox.2010.05.285
- Vanin A. F., Serezhenkov V. A., Mikoyan V. D., and Genkin M. V. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*, **2**, 224–234 (1998). DOI: 10.1006/niox.1998.0180
- Vanin A. F., Huisman A., Stroes E. S., de Ruijter-Heijstek F. C., Rabelink T. J., and van Faassen E. E. Antioxidant capacity of mononitrosyl-iron-dithiocarbamate complexes: implications for NO trapping. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 813–824 (2001). DOI: 10.1016/s0891-5849(01)00466-x
- Ванин А. Ф., Микоян В. Д., Кубрина Л. Н., Бородулин Р. Р. и Бургова Е. Н. Моно- и биядерные динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами в различных биосистемах. *Биофизика*, **60**, 735–747 (2015).
- Mikoyan V. D., Burgova E. N., Borodulin R. R., and Vanin A. F. The binuclear form of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in animal tissues. *Nitric Oxide*, **62**, 1–10 (2017). DOI: 10.1016/j.niox.2016.10.007
- Ванин А. Ф. и Ткачев Н. А. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами как источник универсальных цитотоксинов – катионов нитрозония. *Биофизика*, **68**, 421–434 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923030018
- Ванин А. Ф., Абрамов А. А., Вагапов А. Б., Тимошин А. А., Пекшев А. В., Лакомкин В. Л. и Рууге Э. К. Почему вдыхание газообразного оксида азота не влияет на системное артериальное давление у человека и животных. *Биофизика*, **68**, 1259–1264 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923060170
- Shumaev K. B., Gubkin A. A., Serezhenkov V. A., Lobysheva I. I., Kosmachevskaia O. V., Ruuge E. K., Lankin V. Z., Topunov A. F., and Vanin A. F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide*, **18**, 37–46 (2008). DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.085

Antiviral Activity of the Solutions of Dinitrosyl Iron Complex Delivered to SARS-CoV-2-Infected Syrian Hamsters Placed in a Nose-Only Inhalation Exposure Chamber

A.V. Shipovalov*, A.F. Vanin**, N.A. Tkachev**, O.V. Pyankov*, N.B. Asanbaeva***, S.V. An'kov***,
E.G. Bagryanskaya***, A.M. Baklanov****, S.V. Valiulin****, and M.E. Stekleneva****

*State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Rospotrebnadzor of the Russian Federation,
Koltsovo, Novosibirsk 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

****V.V. Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Novosibirsk, 630090 Russia

No differences were found in antiviral action of the solutions of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione (B-DNIC-GSH) and sodium diethyldithiocarbamate (DETC) delivered sequentially to SARS-CoV-2-infected Syrian hamsters in nose-only (the present study) inhalation or whole-body exposure chambers. In a whole-body exposure chamber, the animal became wet and it led only to a decrease in the level of mononuclear DNIC (M-DNIC) with thiol-containing proteins in lungs resulting in diminished EPR signal while the total B- and M-DNIC pool remained unchanged. It is suggested that antiviral activity of D-DNIC-GSH + DETC against SARS-CoV-2 virus is due to nitrosonium cations released from B-DNIC-GSH in its decomposition induced by DETC. Without additional aerosol inhalation delivery of the solutions of DETC to animals, complex with mercaptosuccinate that is less stable than B-DNIC-GSH exerted similar antiviral effect on Syrian hamster model.

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