

КАТИОН НИТРОЗОНИЯ КАК КОМПОНЕНТ НИТРОПРУССИДА, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ЕГО ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

© 2025 г. А.Ф. Ванин*, #, В.А. Тронов*, Н.Е. Трифонова*, Е.И. Некрасова**,
В.Д. Микоян*, Н.А. Ткачев*

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

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

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

Поступила в редакцию 27.06.2024 г.

После доработки 27.06.2024 г.

Принята к публикации 04.08.2024 г.

Показано, что превращение катиона нитрозония (NO^+) в молекулу NO в составе нитропруссида натрия под действием сильного восстановителя – дитионита натрия не подавляет полностью цитотоксического действия раствора нитропруссида натрия как NO^+ донора на культуру опухолевых клеток MCF-7. Дело в том, что высвобождающиеся из нитропруссида в этих условиях молекулы NO и ионы Fe^{2+} образуют вместе с тиолсодержащими лигандами (тиосульфатом как продуктом распада дитионита натрия или тиоловыми группами белков) динитрозильные комплексы железа, в которых половина нитрозильных лигандов представлена в форме цитотоксических катионов нитрозония. Более чем в 3 раза меньшее количество образующихся при этом динитрозильных комплексов железа по сравнению с исходным уровнем нитропруссида натрия и является основной причиной ослабления цитотоксического действия раствора нитропруссида натрия на клеточную культуру.

Ключевые слова: нитропруссид, катион нитрозония, динитрозильные комплексы железа, цитотоксоз.

DOI: 10.31857/S0006302925010142, EDN: LUWCAG

В настоящее время установлено, что во всех представителях живого мира – человеке и животных, растениях и бактериях непрерывно ферментативным путем продуцируется простейшее химическое соединение – монооксид (или оксид) азота (NO), функционирующее в живых организмах в качестве универсального регулятора разнообразных биологических процессов. Кроме регуляторного действия, NO в организме человека и животных выступает в качестве одного из эффекторов системы клеточного иммунитета, оказывая на клетки и ткани цитотоксическое действие [1].

По мнению большинства исследователей, цитотоксическое действие оказывает не сам молекулярный оксид азота, а продукт его реакции с анионом супероксида – пероксинитрит (ONOO^-) [2, 3]. Протонирование этого агента при физиологических значениях pH приводит к образованию соответствующей неустойчивой кислоты (HONO_2), распадаю-

щейся на диоксид азота (NO_2) и свободный радикал гидроксила (OH^\cdot) – чрезвычайно сильный окиситель, определяющий цитотоксическое действие пероксинитрита [2, 3].

Имеется и другая точка зрения на природу агента, ответственного за цитотоксическое действие NO. В качестве такого агента может выступать продукт одноэлектронного окисления NO – катион нитрозония (NO^+) [4–6]. Есть основание полагать, что негативное действие последнего на живые организмы определяется способностью связываться с тиоловыми группами критически важных для метаболизма тиолсодержащих белков. Результирующее S-нитрозирование этих белков приводит к нарушению их функционирования и снижению жизнеспособности клеток [4–6].

Цитотоксическое действие катионов нитрозония на клетки впервые было продемонстрировано в работе [4], в которой в качестве донора этих катионов были использованы анионы нитропруссида, характеризующиеся резонансной структурой $[(\text{CN})_5\text{Fe}^{2+}-\text{NO}^+]^{2-}$. В концентрации

Сокращения: SNP – нитропруссид натрия, SDT – дитионит натрия, ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ – моноядерные динитрозильные комплексы железа.

1 мМ эти ионы при добавлении к культуре 3T3 фибробластов уже через 2 ч вызывали гибель клеток. Менее эффективное действие в той же концентрации оказывали молекулярный оксид азота и донор NO S-нитрозоглутатион (GS-NO). Они уничтожали клетки фибробластов лишь через 24 ч после их введения в клеточную культуру. Исходя из этого, был сделан вывод, что цитотоксическое действие нитропруссида определяется в основном его способностью высвобождать в клетках катионы нитрозония [4].

Как было показано в работах [7, 8], нитропруссид может выступать и в качестве донора нейтральных молекул NO. Благодаря этому свойству он широко используется в клинике как средство, понижающее артериальное давление [9], для профилактики и терапии острой сердечной недостаточности [10], при шизофрении [11]. Способность продуцировать NO нитропруссид приобретает после одноэлектронного восстановления, в результате чего его резонансная структура вместо вышеописанной трансформируется в $[(CN)_5 Fe^{2+} - NO]^{3-}$. В связи с этим можно было ожидать, что после такой трансформации, в результате которой NO^+ в молекуле нитропруссида превращается в NO, его цитотоксическая активность может существенно ослабляться. Эта возможность была проверена в настоящей работе на культуре клеток adenокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 при восстановлении нитропруссида одним из сильнейших восстановителей – дитионитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Сухие препараты нитропруссида натрия и дитионита натрия (соответственно sodium nitroprusside (SNP) и sodium dithionite (SDT), Sigma-Aldrich, США) хранили при -20°C и растворяли *ex tempore* в инкубационной среде.

Клетки adenокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 культивировали в атмосфере 5% CO_2 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).

Цитотоксичность оценивали по снижению метаболической активности клеток с помощью MTT-теста, основанного на определении активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ [12].

Целостность клеточной мембрany. В качестве дополнительного показателя цитотоксического действия SNP на клетки использовалось изменение целостности (интактности) клеточных мембран, оцениваемое по стандартной методике двойного окрашивания клеток флуоресцирующими красителями [13]. К тестируемой клеточ-

ной суспензии в фосфатно-солевом буфере + 10% сыворотки добавляли смесь красителей акридинового оранжевого и иодистого пропидия до конечной концентрации в суспензии 5 мкг/мл каждого. Суспензию (35 мкл) наносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом (24×24 мм), которое по периметру окружали лаком, 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. При синем фильтре возбуждения иодистый пропидий флуоресцирует в зеленой области, акридиновый оранжевый – в красной области. Пока мембрана клетки не повреждена, иодистый пропидий не проникает в клетку, цитоплазма и ядро остаются зелеными. Нарушение клеточной мембранны сдвигает окраску цитоплазмы и ядра в оранжевую/красную сторону. Подсчет клеток и анализ морфологических изменений в клетках проводили по микрофотографиям, получаемым с объективом $\times 40$.

ЭПР-измерения. Спектры ЭПР растворов SNP, обработанных SDT, регистрировали на модифицированном радиоспектрометре фирмы RadioPan (Польша) при температуре жидкого азота (77 К) и комнатной температуре. Концентрацию возникающих при этом парамагнитного SNP и динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиоловыми группами альбумина или тиосульфатом оценивали методом двойного интегрирования, используя в качестве стандартного образца моноядерную форму ДНКЖ с глутатионом с известной концентрацией этих комплексов, полученную, как описано в работе [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическая активность нитропруссида натрия и влияние на нее сильного восстановителя – дитионита натрия. На рис. 1а приводятся результаты оценки выживаемости MCF-7 клеток по MTT-тесту в зависимости от концентрации SNP в культуральной среде при инкубации клеток в ней в течение 24 или 48 ч. Цитотоксическое действие SNP усиливалось по мере повышения концентрации этого агента, причем эта зависимость не изменялась при двухкратном увеличении времени инкубации клеток с SNP. Этот результат свидетельствует о быстром цитотоксическом повреждении клеток под действием SNP, протекавшем в течение первых суток. Что касается цитотоксической активности SDT, она оказалась незначительной: при концентрации SDT, равной 1 мМ, погибало не более 5% клеток MCF-7.

Как и ожидалось, SDT, как сильный восстановитель, резко ослаблял цитотоксическое действие SNP при его введении в культуральную среду в концентрации, в два раза превышавшей

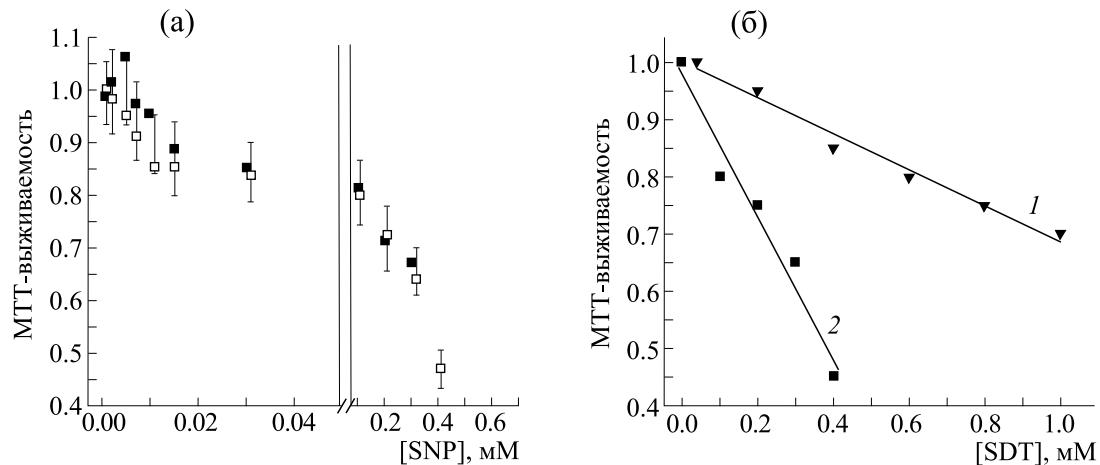


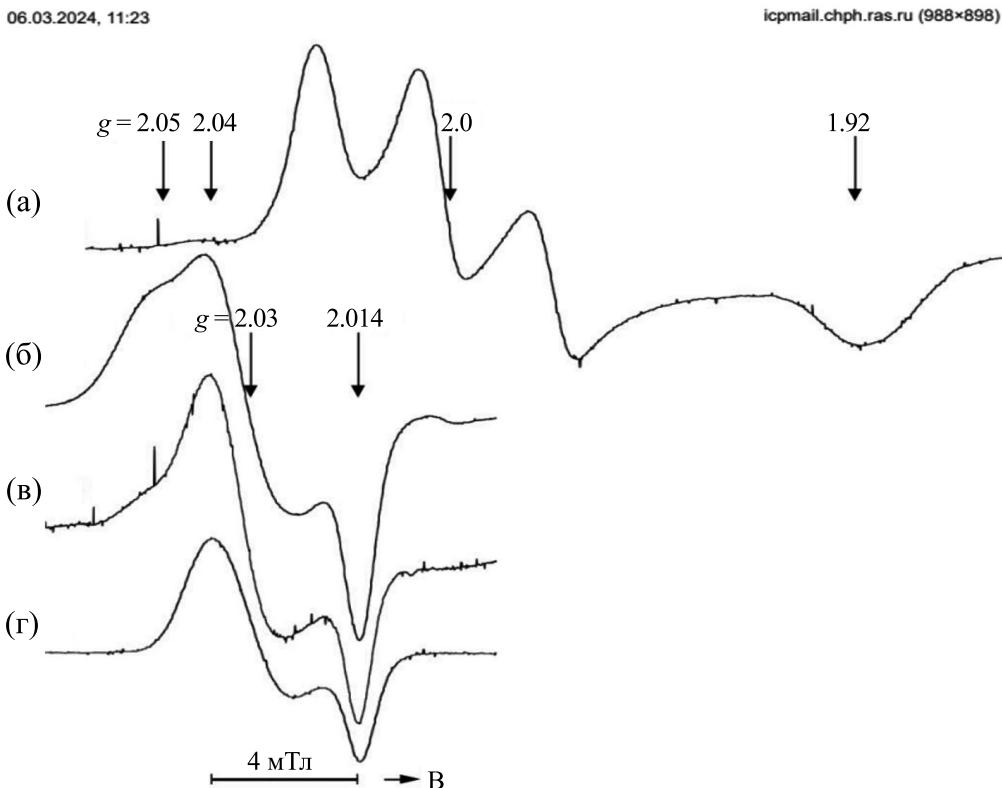
Рис. 1. (а) – Снижение выживаемости клеток MCF-7 по МТТ-тесту в зависимости от концентрации нитропруссида (SNP) в культуральной среде при инкубации клеток в течение одного и двух суток. (б) – Кривая 1: изменение выживаемости клеток по МТТ-тесту при одновременном введении в среду инкубации SNP и SDT при соотношении их концентраций 1 : 2. По оси абсцисс – концентрация дитионита (SDT), соответственно, концентрация нитропруссида в два раза ниже. Кривая 2: рассчитанная выживаемость клеток при одновременном действии на них SNP и SDT при отсутствии взаимодействия между ними.

концентрацию SNP (рис. 1б, кривая 1). На кривой 2 (рис. 1б) приводится рассчитанная выживаемость при одновременном действии на клетки SNP и SDT при отсутствии взаимодействия между ними: соответствующую им выживаемость определяли как произведение измеряемой в эксперименте выживаемости клеток при действии на них только SNP или только SDT.

Как следует из этого графика, взаимодействие SNP и SDT в среде инкубации клеток приводило к заметному повышению выживаемости клеток (рис. 1б). Тем не менее, цитотоксическое действие SNP, несмотря на предполагаемое превращение нитрозония в его составе в NO, сохранялось. Почему? Ответ на этот вопрос был получен при изучении методом ЭПР последствий взаимодействия SNP с SDT. Оказалось, что, действительно, SNP под действием SDT при $\text{pH} > 7$ полностью переходил из диамагнитного (ЭПР-неактивного) состояния в парамагнитное состояние, характеризующееся триплетным сигналом ЭПР, приведенным на рис. 2а. По форме и расположению (значениям g -фактора) он был идентичен описанному в литературе сигналу ЭПР от SNP, восстановленного различными восстановителями в щелочной среде [14]. Оценка концентрации восстановленного SNP, ответственного за сигнал, приведенный на рис. 2а, показала, что она в точности равна 1 mM этого соединения, растворенного в воде при $\text{pH} 9.0$. Если же нитропруссид в концентрации 0.5 mM растворяли в среде инкубации клеток при $\text{pH} 6.8$, то при введении в нее 1 mM дитионита вместо сигнала, приведенного на рис. 2а, регистрировался сигнал ЭПР моноядерных ДНКЖ (М-ДНКЖ) с тиоловыми группами

белков (типа альбумина), присутствующих в среде инкубации (рис. 2б). Сигнал характеризовался тремя значениями g -фактора (2.05, 2.03 и 2.014) и был идентичен сигналу ЭПР М-ДНКЖ с сывороточным альбумином, приведенным в работе [15]. Концентрация этих центров, определенная методом двойного интегрирования их сигнала ЭПР, составила 0.15 mM. Если же аналогичную процедуру проводили с раствором SNP в дистиллированной воде при $\text{pH} 6.5$, то регистрировался сигнал ЭПР М-ДНКЖ с тиосульфатом (также тиол-содержащим соединением), характеризующийся двумя значениями g -фактора (аналогичный приведенному в работе [16]) (рис. 2в), соответствующий концентрации М-ДНКЖ, равной 0.1 mM.

Об идентификации сигналов, приведенных на рис. 2б и 2в, как обусловленных соответственно М-ДНКЖ с белком и М-ДНКЖ с тиосульфатом, свидетельствовали также следующие факты – при комнатной температуре их регистрации первый сохранял ту же форму, что и при 77 K, а второй сужался и давал 5-компонентную сверхтонкую структуру в полном соответствии с литературными данными. Сохранение формы сигнала ЭПР при повышении температуры регистрации свидетельствовало о связи М-ДНКЖ с крупными молекулами – белками, подвижность которых при комнатной температуре была недостаточной для усреднения анизотропии g -фактора этого сигнала. Такое усреднение имело место для сигнала ЭПР М-ДНКЖ с небольшими по размерам лигандами – молекулами тиосульфата, что и обеспечивало сужение этого сигнала при повышении температуры его регистрации до комнатной.



https://icpmail.chph.ras.ru/?_task=mail&_framed=1&_frame=1&_mbox=INBOX&_uid=23620&_part=1&_action=get&_extwin=1

Рис. 2. Форма сигналов ЭПР: (а) – 1 мМ раствора нитропруссида (SNP) при pH 8.0 при введении в него 2 мМ дитионита; (б) – 0.5 мМ раствора SNP в среде инкубации при pH 6.8 после добавления в нее 1 мМ SDT; (в) – 0.5 мМ раствора SNP в дистиллированной воде (pH 6.5) после добавления в нее 1 мМ SDT; (г) – сигнал ЭПР 0.3 мМ раствора М-ДНКЖ с глутатионом, использованного в качестве эталона при определении концентрации парамагнитных центров, ответственных за вышеупомянутые сигналы ЭПР. Запись при 77 К.

Сигнал, приведенный на рис. 2г и обусловленный М-ДНКЖ с глутатионом, использовался в ходе оценки концентрации парамагнитных центров, сигналы ЭПР которых приведены на рис. 2а–в, методом их двойного интегрирования. Концентрация ДНКЖ с глутатионом составляла 0.3 мМ.

Таким образом, обработка SNP дитионитом при $\text{pH} < 7.0$, приводившая к его восстановлению, сопровождалась распадом SNP и образованием М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами – тиосульфатом или тиоловыми группами белков. Как будет сказано в разделе «Обсуждение», эти комплексы могут выступать как донорами NO , так и донорами NO^+ – последнее и определяет показанное на рис. 1б частичное сохранение цитотоксичности раствора SNP после его обработки дитионитом.

На рис. 3а представлены результаты оценки выживаемости клеток по сохранению целостности их мембранны при действии на клетки смеси (Mix) SNP (0.3 Мм) и SDT (0.6 мМ) и рассчитан-

ной для этих клеток выживаемости при одновременном действии на клетки SNP и SDT в тех же концентрациях при отсутствии взаимодействия между этими соединениями (Sum SNP-SDT). Как следует из методической части, целостность мембранны как показатель выживаемости клеток оценивалась по количеству клеток, окрашенных в зеленый цвет (сохранивших целостность мембранны) (рис. 3а). Эти оценки показали, что количество зеленых (выживших) клеток при одновременном введении в клеточную культуру SNP и SDT оказалось заметно выше, чем это имело место при рассчитанном количестве этих клеток при отсутствии взаимодействия между SNP и SDT (рис. 3б). Этот факт находится в полном согласии с результатами вышеописанных экспериментов с использованием MTT-теста.

ОБСУЖДЕНИЕ

Распад SNP в водном растворе при $\text{pH} < 7$ под действием SDT, приводящий к образованию ЭПР-активного М-ДНКЖ с тиосульфатом как

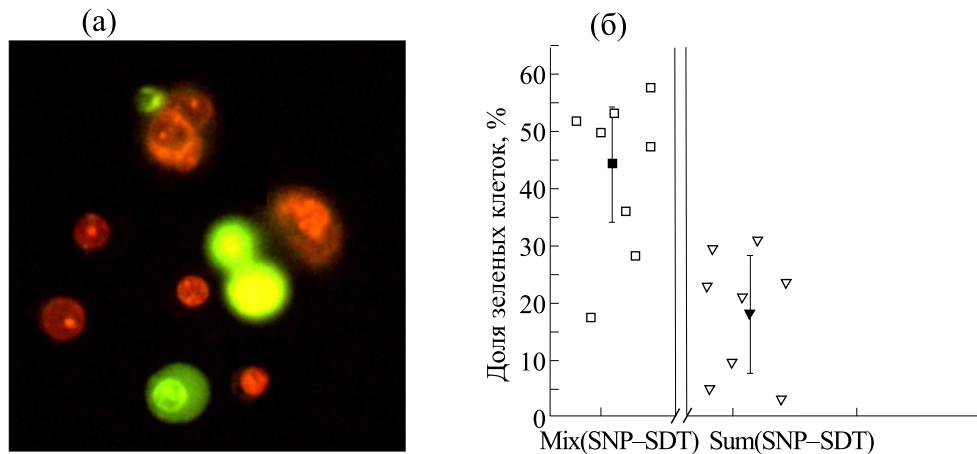


Рис. 3. (а) – Микрофотография культуры клеток MCF-7, окрашенных смесью акридинового оранжевого и иодистого пропидия. (б) – Цитотоксичность смеси SNP + SDT (квадраты) и рассчитанная суммарная цитотоксичность SNP и SDT без учета их взаимодействия (треугольники).

тиолсодержащим лигандом, впервые был обнаружен и изучен в 1960-е годы [16]. Было показано, что такое превращение происходит только в водной фазе. В полярных органических растворителях, например в диметилформамиде или диметильтсульфиде, SNP при контакте с SDT восстанавливается, сохраняя свою целостность, с переходом в парамагнитное состояние, сигнал ЭПР для которого отличается от приведенного на рис. 2а. Он характеризуется значениями g -фактора с $g_{\perp} = 2.031$, $g_{\parallel} = 2.006$ и триплетной сверхтонкой структурой при g_{\perp} [14].

В соответствии с предлагаемым нами механизмом образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лиандами [17, 18], приведенным на схеме 1, возникновение М-ДНКЖ с тиосульфатом или тиоловыми группами белков при взаимодействии SNP с SDT осуществляется в результате реакции диспропорционирования молекул NO, высвободившихся из SNP и связавшихся попарно с ионом двухвалентного железа, также высвобождающегося из SNP, с последующим включением в этот комплекс тиолсодержащих лигандов (RS^-) – молекул тиосульфата или тиоловых групп белков:

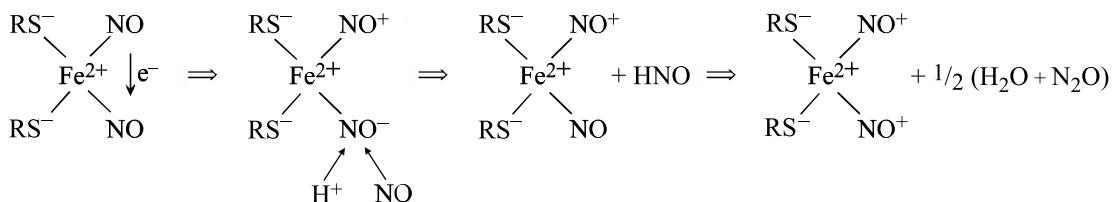


Схема 1. Предлагаемый механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лиандами.

Диспропорционирование молекул NO приводит к появлению в лигандной сфере железа катиона нитрозония (NO^+) и аниона нитроксила (NO^-). Последний, присоединяя протон, превращается в молекулу нитроксила, выходящую из комплекса с последующим превращением в закись азота и воду. Освободившееся в лигандном окружении железа место занимает третья молекула NO с образованием ЭПР-активного М-ДНКЖ, характеризующегося резонансной структурой $[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]^+$. Что касается сохранения в этой структуре одного из нитрозильных лигандов в форме катиона нитрозо-

ния, оно обеспечивается переносом электронной плотности с атомов тиоловой серы на этот катион. Это приводит к нейтрализации положительного заряда на этом лиганде, в результате блокируется его взаимодействие с анионом гидроксила и тем самым реализуется приводимая резонансная структура М-ДНКЖ. Ее реализация обеспечивает способность этих комплексов равнозависимо выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO, так и катионов нитрозония – агентов, ответственных за цитотоксическое действие М-ДНКЖ, образующихся в реакции SNP с SDT.

Как следует из схемы 1, на образование одного М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами расходуется три молекулы NO, т. е. используется не менее трех молекул SNP, высвобождающих NO после одноэлектронного восстановления, что полностью согласуется с результатами ЭПР-оценок уровня М-ДНКЖ с тиосульфатом или тиоловыми группами белков, образующихся после обработки SNP дитионитом соответственно в воде или среде культивации клеток MCF-7. В результате, в соответствии с указанной выше резонансной структурой образующихся М-ДНКЖ как доноров NO и NO⁺, уровень катионов нитрозония в растворе по сравнению с исходной концентрацией SNP снижается как минимум в 3 раза, что и приводит к тому, что цитотоксическое действие этого раствора SNP на клетки MCF-7 после добавления в этот раствор SDT ослабляется не менее чем в 3 раза. Более высокая степень такого ослабления, демонстрируемая на рис. 1б, могла быть обусловлена менее эффективным высвобождением NO⁺ из М-ДНКЖ с тиосульфатом или тиоловыми группами белков по сравнению с аналогичным процессом, характерным для SNP.

Таким образом, оказалось невозможным полностью снять цитотоксическое действие на клеточную культуру MCF-7 (по-видимому, и на другие клетки и ткани) катиона нитрозония, входящего в состав SNP, путем его одноэлектронного восстановления до NO из-за способности живых организмов образовывать при участии ионов Fe²⁺ и молекул NO, высвобождающихся из SNP, ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, всегда присутствующими в этих организмах. Как и не-восстановленные комплексы SNP, образующиеся ДНКЖ характеризуются наличием в них цитотоксических компонентов – катионов нитрозония.

О цитотоксическом действии на клеточные культуры именно NO⁺, а не нейтральных молекул NO, входящих в состав М-ДНКЖ с тиосульфатом, свидетельствуют результаты опытов немецких и российских исследователей, в которых было показано, что обработка этих комплексов одним из производных дитиокарбамата – N-метил-D-глюкаминдиокарбаматом (МГД) усиливала цитотоксическую активность раствора М-ДНКЖ [5]. Это усиление было обусловлено распадом М-ДНКЖ под действием N-метил-D-глюкаминдиокарбамата, приводившим к высвобождению NO⁺ из М-ДНКЖ, которые и оказывали токсическое действие на клеточные культуры. Что касается нейтральных молекул NO, входящих в состав М-ДНКЖ, они «выходили из игры», включаясь в образующиеся стабильные мононитрозильные комплексы железа с N-метил-D-глю-

каминдиокарбаматом, неспособные высвобождать молекулы NO [19].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ignarro L. *Nitric oxide biology and pharmacology* (Acad. Press, Zurich, Switzerland, 2000).
2. Ascenzi P., di Masi A., Sciore A. C., and Clementi E., Peroxynitrite – as ugly biofactor? *Biofactors*, **36** (4), 264–273 (2010). DOI: 10.1002/biof.103
3. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115** (23), 5839–5848 (2018). DOI: 10.1073/pnas.1804932115
4. Khan S., Kayahara M., Joashi U., Mazarakis N. D., Sarraf C., Edwards A. D., Hughes M. N., and Mehmet H., Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitroxide and the nitrosonium cation. *J. Cell Sci.*, **110** (18), 2315–2322 (1997). DOI: 10.1242/jcs.110.18.2315
5. Kleschyov A. L., Stand S., Schmitt S., Gottfried D., Skatchkov V., Sjakste N., Daiber M., Umansky V., and Münz T. Dinitrosyl-iron triggers apoptosis in Jurkat cells despite overexpression of Bcl-2. *Free Radic. Biol. Med.*, **40** (8), 1340–1348 (2006). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.001
6. Ванин А. Ф. и Ткачев Н. А. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как источники универсальных цитотоксиков – катионов нитрозония. *Биофизика*, **68** (3), 329–340 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923030018
7. Bates J. N., Baker M. T., Guerra R. Jr., and Harrison D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem. Pharmacol.*, **42** (Suppl.), S156–S165 (1991). DOI: 10.1016/0006-2952(91)90406-u
8. Hilleger W. B., Dean N. A., Rhinehart R. G., and Myers P. D. Treatment of non-reflow and impaired flow with nitric oxide donor nitroprusside following per cutaneous coronary intervention initial human clinical experience. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **37**, 1335–1347 (2001).
9. Lee M. A., Joo K. R., Kim H. K., Kim B. D., and Ahn C. K. The effect of sodium nitroprusside on mean ar-

- terial pressure and heart rate in anesthetized patients. *Korean J. Anesthesiol.*, **13** (4), 366–380 (1980). DOI: 10.4097/kjae.1980.13.4.366
10. Garatti L. and Frea S. Sodium nitroprusside in acute heart failure: A multicenter historic cohort study. *Int. J. Cardiol.*, **369**, 37–44 (2022). DOI: 10.1016/j.ijcard.2022.08.009
 11. Zoupa E. and Pitsikas N. The nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) and its potential for the schizophrenia therapy: Lights and shadows. *Molecules*, **26** (11), 3196–3207 (2021). DOI: 10.3390/molecules26113196
 12. Chandna S. Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death. *Cytometry A*, **61** (2), 127–133 (2004). DOI: 10.1002/cyto.a.20071
 13. Atale N., Gupta S., Yadaev U., and Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and non-fluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J. Microscopy*, **255** (1), 7–19 (2014). DOI: 10.1111/jmi.12133
 14. van Voorst J. D. W. and Hemmerich P. Electron spin resonance of $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}^{2-}$ and $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NOH}^{2-}$. *J. Chem. Phys.*, **45** (11), 3914–3920 (1966). DOI: 10.1063/1.1727437
 15. 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 Biol. Chem.*, **2** (4), 224–234 (1998). DOI: 10.1006/niox.1998.0180
 16. Бурбаев Д. Ш., Ванин А. Ф., Блюменфельд Л. А. Электронная и пространственная структура парамагнитных динитрозильных комплексов железа. *Журн. структ. химии*, **12**, 252–256 (1971).
 17. Vanin A. F., Malenkova I. V., and Serezhenkov V. A. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and EPR studies. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1** (3), 191–203 (1997). DOI: 10.1006/niox.1997.0122
 18. Vanin A. F. and Burbayev D. Sh. Electronic and spatial structures of water-soluble dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands underlying their activity to act as nitric oxide and nitrosonium ions donors. *Biophys. J.*, **14**, 878236 (2011). DOI: 10.1155/2011/878236
 19. Vanin A. F., Tronov V. A., and Borodulin R. R. Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF-7 human breast cancer cell culture). *Cell Biochem. Biophys.*, **79** (1), 93–102 (2021). DOI: 10.1007/s12013-020-00962-x

Nitrosonium Cation as a Nitroprusside Constituent Determining Its Cytotoxicity

A.F. Vanin*, V.A. Tronov*, N.E. Trifonova*, E.I. Nekrasova, V.D. Mikoyan*, and N.A. Tkachev***

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

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

It has been demonstrated that nitrosonium cation (NO^+) transformation as a constituent of sodium nitroprusside into NO molecule under action of sodium dithionite as a strong reducer did not result in full suppression of cytotoxic activity of nitroprusside solution as NO^+ donor on the culture of MCF-7 tumour cells. As a matter of fact, NO molecules and Fe^{2+} ions released from SNP at this conditions formed dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (thiol-containing proteins or thiosulphate anions appeared from decomposed dithionite). The half of nitrosyl ligands in the complexes represented also as in nitroprusside in cytotoxic NO^+ form. Nevertheless because the amount of dinitrosyl iron complexes was three times less than that of initial nitroprusside the cytotoxic effect of nitroprusside solution as NO^+ donors sharply decreased under action of dithionite on nitroprusside.

Keywords: nitroprusside, nitrosonium cation, dinitrosyl iron complexes, cytotoxicosis