

УДК 542.957:547.7:547.854:547.857:615.27.3

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С МЕРКАПТОСУКЦИНАТОМ НА МОДЕЛЯХ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ

© 2019 г. А.Ф. Ванин*, **, Л.А. Островская***, Д.Б. Корман***, Н.В. Блюхтерова***, В.А. Рыкова***, М.М. Фомина***

*Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

**Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, 119991, Москва, Трубецкая ул. 8

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

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

Поступила в редакцию 25.07.2019 г.

После доработки 25.07.2019 г.

Принята к публикации 07.09.2019 г.

Проведено изучение противоопухолевого действия биядерной формы динитрозильных комплексов железа с меркаптосукцинатом на моделях солидных опухолей мышечной ткани — карциноме легких Льюис и аденокарциноме Акатол — при внутривенном введении препарата. Максимальный эффект — торможение роста опухоли (карцинома Льюис) на 65% по сравнению с контролем — наблюдается при внутривенном введении препарата в суточной дозе 2,5 мкМ/кг шестикратно с интервалом в двое-трое суток в период с первых по семнадцатые сутки после перевивки опухоли.

Ключевые слова: оксид азота, динитрозильные комплексы железа, модели солидных опухолей мышечной ткани (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол), внутривенное введение.

DOI: 10.1134/S0006302919060218

Ранее нами было обнаружено противоопухолевое действие биядерной формы динитрозильных комплексов железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-Г) на модели солидной опухоли мышечной ткани — карциноме легких Льюис. Противоопухолевый эффект этих комплексов имел дозо-зависимый характер и проявлялся при внутрибрюшинном десятикратном введении препарата в разовых дозах 25; 50; 125 и 200 мкМ/кг. В диапазоне указанных доз противоопухолевая активность комплексов железа выражалась в торможении роста опухоли на 60–80% по сравнению с контролем, изменяясь в зависимости от дозы препарата и сроков оценки эффекта. Ингибирование роста карциномы Льюис под влиянием динитрозильных комплексов железа наблюдалось в период введения препарата на протяжении семи-десяти суток. В более поздние сроки, после окончания курса введения препарата, скорости роста опухолей у леченых и контрольных животных практически совпадали, в результате чего размеры опухолей у леченых животных к 20 суткам достигали

того же уровня, что и в контроле. Ростингибирующий эффект препаратов повышался с увеличением дозы Б-ДНКЖ-Г и был наиболее выраженным (80%) при применении препарата в дозе 200 мкМ/кг (в пересчете на один Fe(NO)₂-фрагмент в этих комплексах) [1–3].

В дальнейшем при исследовании зависимости противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-Г от дозы, пути и режима введения соединения нами была обнаружена значительная противоопухолевая активность препарата при внутривенном введении в существенно меньших дозах, чем при внутрибрюшинном введении комплекса. Так, максимальный эффект — торможение роста карциномы Льюис на 90% по сравнению с контролем — достигался при внутривенном применении Б-ДНКЖ-Г в суточной дозе 2 мкМ/кг, пятикратно, с интервалами в двое-трое суток, в период с первых по четырнадцатые сутки после перевивки опухоли [4].

Аналогичный эффект был описан в статье группы исследователей, возглавляемой профессором W.-F. Liaw (Тайвань), при изучении водорастворимых моноядерных динитрозильных комплексов железа, включающих в себя два тиол-содержащих лиганда — (S-(CH)₂OH) и (S(CH)₂NH₃) и один же-

Сокращения: Б-ДНКЖ-Г — биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, Б-ДНКЖ-С — биядерные динитрозильные комплексы железа с меркаптосукцинатом, ТРО — коэффициент торможения роста опухоли.

лезо-динитрозильный $(\text{Fe}(\text{NO})_2)$ -фрагмент [5]. В цитируемой работе сообщается о значительном противоопухолевом эффекте этих комплексов на модели ксенографтов рака простаты человека у мышей. Указанные комплексы при внутривенном введении в суточной дозе 0,73 мкМ/кг каждые три дня в течение 21 суток вызывали торможение роста опухолей на 60 и 95% по сравнению с контролем на седьмые и двадцать первые сутки развития опухоли соответственно. Было показано, что ингибирование роста опухолей под влиянием испытанных веществ обусловлено апоптотической гибелью опухолевых клеток, инициированной высвобождением из моноядерных динитрозильных комплексов железа монооксида азота (NO) [5].

В развитие данного направления исследований нами проведено изучение противоопухолевого действия нового препарата – биядерной формы динитрозильных комплексов железа с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-С) на моделях солидных опухолей мышей – карциноме легких Льюис и аденокарциноме Акатол при внутривенном введении препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ферросульфат железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Fluka, Швейцария), меркаптосукцинат и нитрит натрия (Sigma, США). Газообразный NO получали в реакции ферросульфата железа с нитритом натрия в 0,1 М растворе HCl с последующим разделением NO и примесного диоксида азота (NO_2) методом низкотемпературной сублимации жидкой смеси этих газов в вакуумированной системе, как это описано в работе [6].

Синтез биядерной формы динитрозильных комплексов железа с меркаптосукцинатом. Б-ДНКЖ-С синтезировали обработкой газообразным NO (при давлении 150 мм рт. ст.) 1 мл раствора ферросульфата в дистиллированной воде и 4 мл 15 мМ раствора меркаптосукцината в 15 мМ HEPES-буфере (рН 7,4), помещенных соответственно в верхнюю и нижнюю части аппарата Тунберга, с последующим смешиванием этих растворов в присутствии NO, как это описано в работе [6]. Концентрация ферросульфата в этой смеси составляла 5 мМ. После пятиминутного встряхивания смеси, приводившей к включению всего двухвалентного железа в Б-ДНКЖ-С, NO удаляли из аппарата откачкой, раствор полученного Б-ДНКЖ-С замораживали и использовали (после разморозки) в экспериментах на животных.

Концентрацию Б-ДНКЖ-С оценивали по интенсивности полосы его оптического поглощения на длине волны 360 нм с коэффициентом экстинкции (в пересчете на один атом железа в биядерном динитрозильном комплексе), равным $6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Биологический эксперимент. Эксперименты проведены на 50 инбредных мышках линии BDF₁ и Valb/c, самках с массой тела 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России».

В качестве опухолевых тест-систем служили солидные опухоли мышей – карцинома легких Льюис и аденокарцинома Акатол, перевиваемые подкожно в соответствии со стандартной методикой [7].

Водный раствор Б-ДНКЖ-С вводили мышам внутривенно в хвостовую вену в суточных дозах 2,5 и 5 мкМ/кг шестикратно на 1, 4, 7, 10, 14, 17 сутки после перевивки карциномы легких Льюис и с первых по шестые сутки – животным с аденокарциномой Акатол.

Оценка противоопухолевой активности. Показателем ростиингибирующего эффекта препарата служили различия в кинетике роста опухолей (коэффициент торможения роста опухоли – ТРО). ТРО определяли из соотношения: $\text{ТРО} = (P_C - P_T)/P_C$ (%), где P_C и P_T – объем (или масса) опухоли в группах контрольных (С) и леченых (Т) животных соответственно. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как $V = ab^2/2$, где a – длина, b – ширина и высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли использовали значение плотности опухолевой ткани, равное 1 г/см^3 . Показатель изменения средней продолжительности жизни мышей ($\Delta\tau$, %) определяли как $\Delta\tau = (\tau_C - \tau_T)/\tau_C$ (%), где τ_C и τ_T – средняя продолжительность жизни контрольных и леченых животных [7].

Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из шести-восьми мышей при восьми-десяти животных в контроле. Наблюдение за животными продолжалось в течение всего периода развития опухоли, вплоть до гибели животных.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка оценок размеров опухолей (массы опухолей) у животных проведена с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0. Оценка достоверности различий между средними значениями, характеризующими массу опухоли в группах контрольных и леченых животных, проведена с помощью t -критерия Стьюдента. Различия между лечеными и контрольными группами животных признаются достоверными при условии, что вычисленные значения t превышают значения критерия Стьюдента для определенных уровней значимости при заданном числе степеней свободы f [7].

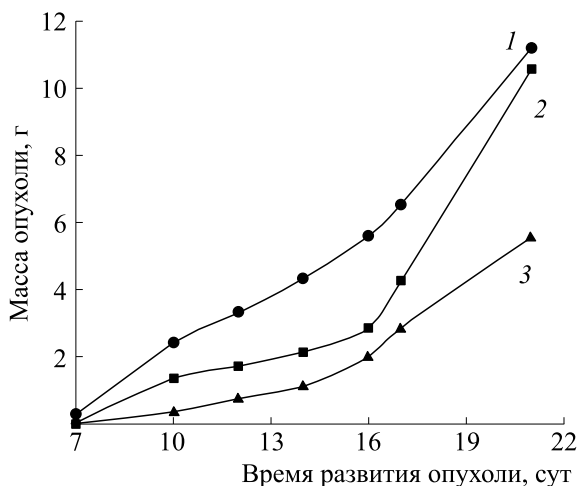


Рис. 1. Влияние препарата Б-ДНКЖ-С на развитие карциномы легких Льюис: 1 — контроль; 2 — Б-ДНКЖ-С, доза 5 мкМ/кг в сутки; 3 — Б-ДНКЖ-С, доза 2,5 мкМ/кг в сутки. Введение внутривенно на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е, 14-е, 17-е сутки после перевивки опухоли.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Противоопухолевое действие Б-ДНКЖ-С на модели солидной карциномы легких Льюис. При введении мышам Б-ДНКЖ-С в суточных дозах 2,5 и 5 мкМ/кг шестикратно в течение 17 суток с интервалом в двое-трое суток между инъекциями развитие карциномы легких Льюис подавлялось на 65 и 50% по сравнению с контролем соответственно. При этом противоопухолевый эффект,

как видно из представленных данных, усиливался при снижении дозы препарата (рис. 1, табл. 1).

Противоопухолевое действие Б-ДНКЖ-С на модели солидной аденокарциномы Акатол. Применение комплекса Б-ДНКЖ-С в суточной дозе 2,5 мкМ/кг внутривенно ежедневно, шестикратно вызывало торможение роста аденокарциномы Акатол мышей — на 30% по сравнению с контролем (рис. 2, табл. 2).

В условиях проведенных экспериментов препарат Б-ДНКЖ-С не оказывает влияния на продолжительность жизни животных с изученными солидными опухолями.

Представленные данные свидетельствуют о том, что имеются существенные различия в выраженности противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-С в отношении двух моделей солидных опухолей — карциномы легких Льюис (65%) и аденокарциномы Акатол (30%) — при внутривенном применении препарата в одинаковой суточной дозе 2,5 мкМ/кг. Наблюдаемые различия в эффективности препарата могут быть обусловлены как различиями в чувствительности разных штаммов опухолей к изучаемому соединению, так и влиянием отличий в использованных режимах введения Б-ДНКЖ-С на его активность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты подтверждают обнаруженный нами ранее факт резкого усиления противоопухолевого действия биядерного динитрозильного комплекса железа с глутатионом не при повышении их дозы, как это имело место при внутрибрюшинном введении этих комплек-

Таблица 1. Противоопухолевый эффект (Б-ДНКЖ-С) при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис (введение препарата на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е, 14-е и 17-е сутки после перевивки опухоли)

Группа	Суточная доза, мкМ/кг	Средняя масса опухоли, г	ТРО, % (16 сутки)	τ , сутки	$\Delta\tau$, %	Критерий Стьюдента t
Б-ДНКЖ-С	2,5	2,00 ± 0,15	65	36,2 ± 3,1	8	3,45 > $t_{0,01} = 3,05$ $f = 12$
Б-ДНКЖ-С	5,0	2,85 ± 0,35	50	35,5 ± 2,3	6	2,69 > $t_{0,05} = 2,22$ $f = 10$
Контроль	—	5,61 ± 0,25	—	33,5 ± 5,4	—	—

Таблица 2. Противоопухолевый эффект комплекса Б-ДНКЖ-С при внутривенном введении на модели аденокарциномы Акатол (введение шестикратно с 1-х по 6-е сутки после перевивки опухоли)

Группа	Суточная доза, мкМ/кг	Средняя масса опухоли, г	ТРО, % (16 сутки)	τ , сутки	$\Delta\tau$, %	Критерий Стьюдента t
Б-ДНКЖ-С	2,5	3,04 ± 0,25	30	38,7 ± 2,1	6	3,45 > $t_{0,01} = 3,05$ $f = 12$
Контроль	—	4,31 ± 0,35	—	36,3 ± 5,3	—	—

сов до 200 мкМ/кг [1–3], а наоборот, при пониженных дозах Б-ДНКЖ-Г до 2 мкМ/кг при внутривенном введении соединения мышам-опухоленосителям [4].

Как отмечалось нами ранее, высокая эффективность противоопухолевого действия других биядерных динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами (производными этилмеркаптана) при низких дозах этих препаратов была впервые продемонстрирована группой тайваньских исследователей под руководством профессора W.-F. Liaw. Согласно результатам этой работы монопядерные динитрозильные комплексы железа с указанными лигандами при внутривенном введении в разовой дозе 0,73 мкМ/кг ингибировали развитие ксенографтов рака простаты человека на 90% по сравнению с контролем (21 сутки развития опухоли) [5].

Встает вопрос, связанный с необходимостью объяснения обнаруженного нами в настоящей и предыдущей работах феномена резкого повышения противоопухолевого действия ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами при понижении их дозы? Наиболее правдоподобным ответом на этот вопрос нам представляется предположение о том, что указанные комплексы эффективно взаимодействуют не с опухолевыми, а с иммунокомпетентными клетками, в первую очередь с макрофагами.

Установлено, что макрофаги способны эффективно поглощать ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, появляющиеся в окружающей их среде [8]. В результате при накоплении в этих клетках значительного количества ДНКЖ высвобождающиеся из введенных препаратов молекулы NO или ионы нитрозония могут снижать биологическую активность макрофагов, приводя тем самым к ослаблению иммунитета и контроля над пролиферацией опухолевых клеток [9].

Действительно, как было показано нами в предыдущей работе, внутривенное введение Б-ДНКЖ-Г в разовой дозе 100 мкМ/кг приводит к стимуляции роста опухоли (карцинома Льюис) [4].

Иная ситуация имеет место при снижении дозы комплексов Б-ДНКЖ-Г. В этом случае ДНКЖ, поступающие в иммунокомпетентные клетки в существенно меньших дозах, вероятно, не оказывают заметного токсического влияния на биологическую активность этих клеток. Весьма возможно, что в этих условиях иммунокомпетентные клетки сохраняют способность находить опухолевые клетки и, контактируя с ними, оказывать на них цитотоксическое действие путем «обстреливания» опухолевых клеток как эндогенными, так и экзогенными (поступившими из окружающей среды) ДНКЖ.

Таким образом, проведенные нами исследования дают основание предполагать, что дальнейшее изучение противоопухолевого эффекта экзогенных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при

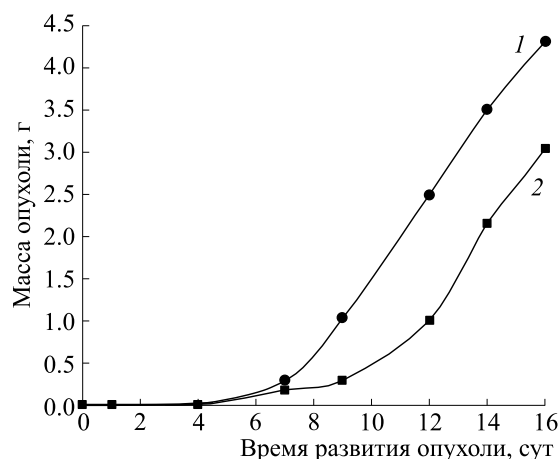


Рис. 2. Влияние препарата Б-ДНКЖ-С на развитие аденокарциномы Акатол мышей: 1 — контроль; 2 — Б-ДНКЖ-С, доза 2,5 мкМ/кг в сутки. Введение внутривенно, шестикратно, с 1-х по 6-е сутки.

применении препаратов в пониженных (по отношению к тестируемым) дозах, возможно, позволят обнаружить более эффективное ростингибирующее и цитотоксическое действие этих комплексов на злокачественные опухоли.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **59**, 508 (2014).
2. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **60**, 152 (2015).
3. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **60**, 1157 (2015).
4. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **62**, 591 (2017).
5. S.-H. Wu, C.-Y. Lu, Y.-L. Chen, et al., *Inorg. Chem.* **55**, 9384 (2016).
6. A. F. Vanin, R. R. Borodulin, and V. D. Mikoyan, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **66**, 1 (2017).
7. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), Часть 1, сс. 642–657.
8. H. Lewandowska, T. M. Stepkowski, S. Merczynska-Wielgosz, et al., *J. Inorg. Biochem.* **188**, 29 (2018).
9. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmaceut. Chem.* **5**, 1109 (2018).

The Antitumor Activity of Dinitrosyl Iron Complexes with Mercaptosuccinate in Murine Solid-Tumor Models

A.F Vanin^{*, **}, L.A. Ostrovskaya^{***}, D.B. Korman^{***}, N.V. Bluchterova^{***},
V.A. Rykova^{***}, and M.M. Fomina^{***}

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

***Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University,*

ul. Trubetskaya 8, Moscow, 119991 Russia

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

The antitumor activity of the binuclear form of dinitrosyl iron complexes with mercaptosuccinate was studied when the drug was injected intravenously in murine models of solid tumors – Lewis lung carcinoma and Acatol adenocarcinoma. The maximum antitumor effect – a reduction in tumor growth by 65% compared to control – was observed after intravenous administration of the drug in a daily dose of 2.5 $\mu\text{M}/\text{kg}$, six times beyond 2 to 3 days in the period of 1–17 days after tumor transplantation.

Keywords: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, murine solid tumor models, Lewis lung carcinoma, Acatol adenocarcinoma, intravenous administration