

УДК 542.957:547.7:547.854:547.857:615.27.3

## ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ И S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2020 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 04.09.2019 г.

После доработки 04.09.2019 г.

Принята к публикации 05.09.2019 г.

Изучена противоопухолевая активность S-нитрозоглутатиона, би- и моноядерной форм динитрозильных комплексов железа с различными тиолсодержащими лигандами — глутатионом, меркаптосукцином, тиосульфатом — на моделях солидных перевиваемых опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол и Са-755). Наибольшую противоопухолевую активность, выразившуюся в торможении роста опухоли на 90%, проявили препараты комплексов железа с глутатионом при внутривенном введении (карцинома легких Льюис) и S-нитрозоглутатиона при внутрибрюшинном введении животным (аденокарцинома Са-755). Исходя из этих и ранее полученных нами данных о противоопухолевой активности такого рода соединений, а также принимая во внимание результаты других авторов в той же области исследований, сделано предположение о том, что противоопухолевый эффект вышеперечисленных препаратов определяется в основном их способностью выступать в качестве доноров ионов нитрозония. Инициированное ионами нитрозония S-нитрозирование тиолсодержащих белков, локализованных на поверхности опухолевых клеток, приводит к повышению внутриклеточного окислительного потенциала и тем самым к развитию апоптоза и гибели этих клеток.

*Ключевые слова:* динитрозильные комплексы железа, S-нитрозотиолы, противоопухолевая активность, солидные опухоли мышей.

DOI: 10.31857/S0006302920010068

Ранее нами было обнаружено, что генерирующие оксид азота соединения, такие как биядерные формы динитрозильных комплексов железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) и меркаптосукцином (Б-ДНКЖ-MS), а также S-нитрозоглутатион (GS-NO) обладают способностью ингибировать развитие ряда солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол и Са-755). Противоопухолевый эффект изученных препаратов проявлялся при их введении как внутрибрюшинно, так и внутривен-

но, и колебался в пределах от 60 до 90%, изменяясь в зависимости от дозового режима, схемы применения, времени оценки эффекта и природы опухолевого штамма [1–6].

В 2016 г. группой исследователей, возглавляемой профессором W.-F. Liaw (Тайвань), была обнаружена также высокая противоопухолевая активность водорастворимых моноядерных динитрозильных комплексов железа с этилмеркаптаном при их внутривенном введении на модели ксенографтов рака предстательной железы человека [7].

В продолжение данного направления работ нами с целью выявления оптимальных подходов для дальнейшего исследования доноров оксида азота в качестве противоопухолевых агентов проведено изучение противоопухолевых свойств ряда соединений, представляющих собой би-

*Сокращения:* Б-ДНКЖ-GSH — биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, Б-ДНКЖ-MS — биядерные динитрозильные комплексы железа с меркаптосукцином, GS-NO — S-нитрозоглутатион, М-ДНКЖ-TS — моноядерные динитрозильные комплексы железа с тиосульфатом, ТРО — коэффициент торможения роста опухоли, СПЖ — средняя продолжительность жизни.

ядерную форму динитрозильных комплексов железа с глутатионом, меркаптосукцинатом, моноядерную форму динитрозильных комплексов железа с тиосульфатом, а также препарата S-нитрозоглутатиона.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В экспериментах использовали ферросульфат железа ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, тиосульфат, 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 ( $\text{NO}_2$ ) методом низкотемпературной сублимации жидкой смеси этих газов в вакуумированной системе, как это описано в работах [1, 8].

**Синтез биядерной формы динитрозильных комплексов железа с глутатионом.** Б-ДНКЖ-GSH синтезировали согласно описанному ранее «простейшему» методу синтеза ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [1, 9]. В соответствии с этим методом синтез 5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH с глутатионом проводили следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на воздухе добавляли 62 мг глутатиона (20 мМ), вызывавшего подкисление раствора до 4,0, с последующим введением в него 28 мг (10 мМ) сернокислого железа, приводившего к дальнейшему снижению pH до 3.8. После этого в раствор добавляли 6.9 мг (10 мМ) нитрита натрия, что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленного образованием S-нитрозоглутатиона. Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерного для GS-NO, реакция заканчивалась через 1.5 ч с образованием 10 мМ этого соединения. После этого pH раствора повышали до 7.2, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся процессом образования Б-ДНКЖ-GSH в растворе при участии GS-NO,  $\text{Fe}^{2+}$  и глутатиона [9]. Для полного превращения GS-NO в Б-ДНКЖ-GS-GSH требовалось несколько часов. После удаления образовавшегося за это время осадка гидроокиси трехвалентного железа путем фильтрования раствора через фильтровальную бумагу полученный раствор замораживали в жидком азоте и использовали (после разморозки) в экспериментах на животных. Оценку полученного количества Б-ДНКЖ-GSH (молекулярная масса 846 Да) проводили оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм, характеризующихся коэффициентами экстинкции, равными соответственно 9200 и 7400  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [1]. Согласно этой оценке, концентрация Б-ДНКЖ в растворе составляла

~2.5 мМ (5 мМ в пересчете на один железа в комплексе).

**Синтез биядерной формы динитрозильных комплексов железа с меркаптосукцинатом.** Б-ДНКЖ-MS синтезировали с помощью обработки 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 (pH 7.4), помещенных соответственно в верхнюю и нижнюю части аппарата Тунберга, с последующим смешиванием этих растворов в присутствии NO, как это описано в работе [8]. Концентрация ферросульфата в этой смеси составляла 5 мМ. После пятиминутного встряхивания смеси, приводившей к включению всего двухвалентного железа в Б-ДНКЖ-MS, NO удаляли из аппарата откачкой, раствор полученного Б-ДНКЖ-MS замораживали и использовали (после разморозки) в экспериментах на животных. Концентрацию препарата Б-ДНКЖ-MS оценивали по интенсивности полосы его оптического поглощения на 360 нм с коэффициентом экстинкции, равным 6000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ).

**Синтез моноядерной формы динитрозильных комплексов железа с тиосульфатом.** М-ДНКЖ-TS синтезировали аналогичным образом в аппарате Тунберга с использованием газообразного NO. Концентрация ферросульфата и тиосульфата натрия в смеси, обрабатываемой NO, составляла соответственно 5 и 20 мМ. Концентрацию полученного препарата М-ДНКЖ-TS оценивали методом ЭПР по интенсивности характерного для этого комплекса сигнала ЭПР с  $g_{\perp} = 2.042$  и  $g_{\parallel} = 2.014$  с использованием соответствующего ЭПР-стандартного образца [10].

**Синтез S-нитрозоглутатиона.** GS-NO в виде 5 мМ раствора в 15 мМ HEPES-буфере (pH 7.4) получали, понижая pH смеси 5.5 мМ глутатиона и 5 мМ нитрита натрия до значения, равного 3.0–3.5, добавлением в раствор соляной кислоты, что приводило к розовому окрашиванию раствора. После одночасовой инкубации на воздухе pH раствора повышали до нейтральных значений. Концентрацию полученного GS-NO оценивали оптическим методом по интенсивности характерной для него полосы поглощения на 334 нм с коэффициентом экстинкции, равным 0.904  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [11].

**Биологический эксперимент.** Эксперименты были проведены на 75 инбредных мышах-самках линий BDF<sub>1</sub> и Balb/c, с массой тела 18–20 г, разведения питомника «Фиалил «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России».

В качестве опухолевых тест-систем служили солидные опухоли мышей – карцинома легких Льюис, аденокарциномы Акатол и Ca-755, пере-

виваемые подкожно в соответствии со стандартной методикой [12].

Исследовавшиеся препараты вводили животным в виде водных растворов внутривенно в хвостовую вену либо внутрибрюшинно при использовании различных дозовых режимов и схем применения.

Б-ДНКЖ-GSH вводили внутривенно мышам с карциномой легких Льюис в суточных дозах 20, 10, 2, 1 и 0,5 мкмоль/кг шестикратно на 1-е, 4-е, 7-е, 11-е и 14-е сутки после перевивки опухоли; животным с аденокарциномой Акатол – в суточной дозе 10 мкМ/кг на 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки.

М-ДНКЖ-TS вводили внутривенно мышам с аденокарциномой Акатол в суточной дозе 10 мкмоль/кг на 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки развития опухоли.

Б-ДНКЖ-MS вводили внутривенно в суточных дозах 2,5 и 5 мкМ/кг шестикратно на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е, 14-е и 17-е сутки после перевивки опухоли мышам с карциномой легких Льюис и с первых по шестые сутки – животным с аденокарциномой Акатол.

GS-NO вводили мышам с аденокарциномой Ca-577 внутрибрюшинно в суточных дозах 50, 100, 200 и 400 мкМ/кг с первых по десятые сутки, мышам с карциномой легких Льюис – внутривенно в суточных дозах 10 и 20 мкМ/кг на 1-е, 4-е, 8-е, 12-е и 15-е сутки, животным с аденокарциномой Акатол – внутривенно в суточных дозах 10 мкМ/кг на 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки после перевивки опухоли.

**Оценка противоопухолевой активности.** Показателем ростиингибирующего эффекта препарата служили различия в кинетике роста опухолей (коэффициент торможения роста опухоли ТРО, %). Коэффициент торможения роста опухоли определяли из соотношения:  $TPO = [(P_C - P_T)/P_C] \cdot 100\%$ , 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 опухоли. 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 величину плотности опухолевой ткани, равную  $1 \text{ г/см}^3$ . Показатель изменения средней продолжительности жизни мышей (СПЖ) определяли как  $\Delta\tau = [(\tau_C - \tau_T)/\tau_C] \cdot 100\%$ , где  $\tau_C$  и  $\tau_T$  – средняя продолжительность жизни контрольных и леченых животных [12].

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.

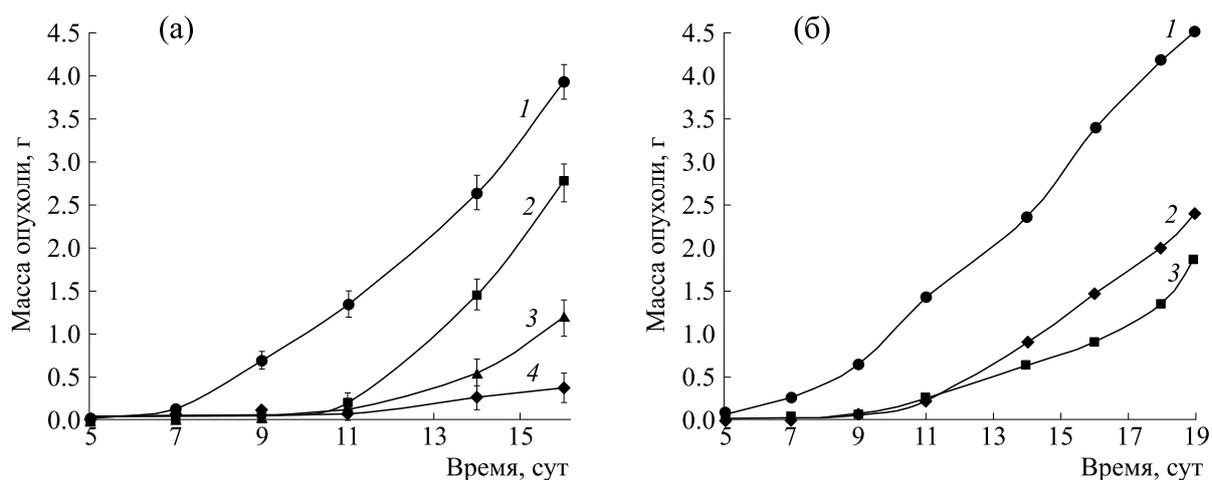
## РЕЗУЛЬТАТЫ

В представленной работе обобщены результаты экспериментального изучения зависимости противоопухолевого эффекта от дозы для препаратов Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO (при их внутрибрюшинном и внутривенном введении), оценки активности сочетанного применения Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO (внутрибрюшинное введение), определения влияния природы лиганда на ростиингибирующий эффект таких динитрозильных комплексов железа, как Б-ДНКЖ-GSH, Б-ДНКЖ-MS и М-ДНКЖ-TS (внутривенное введение) на моделях солидных опухолей мышей.

**Противоопухолевая активность биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом на модели карциномы легких Льюис.** Ранее нами была установлена значительная противоопухолевая активность Б-ДНКЖ-GSH при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис [4]. Как было показано в этой работе, эффективность торможения роста опухоли увеличивалась по мере уменьшения дозы препарата в диапазоне суточных доз 20, 10 и 2 мкмоль/кг и составляла 30, 70 и 90% соответственно (рис. 1а, табл. 1). В дополнение к этим данным и для проверки отмеченного парадоксального эффекта увеличения активности препарата с уменьшением его дозы нами исследован эффект Б-ДНКЖ-GSH в разовых дозах 1 и 0,5 мкмоль/кг при той же схеме внутривенного введения (пятикратно с интервалом в трое суток) на модели карциномы легких Льюис (рис. 1б, табл. 1).

Анализ результатов, полученных при введении препарата в суточных дозах 1,0 и 0,5 мкмоль/кг, свидетельствует о том, что эти малые дозы Б-ДНКЖ-GSH обладают примерно одинаковой эффективностью и тормозят развитие опухоли на 50 и 60% соответственно (рис. 1б, табл. 1).

Сопоставление противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-GSH во всем диапазоне изученных суточных доз (от 20 до 0,5 мкмоль/кг) при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис свидетельствует о нелинейном характере зависимости эффекта от дозы, при которой максимальная активность препарата – 90% торможения роста опухоли по сравнению с контролем –



**Рис. 1.** Противоопухолевая активность Б-ДНКЖ-GSH при внутривенном введении различных доз препарата на модели карциномы легких Льюис: (а) – 1 – контроль, 2–4 – Б-ДНКЖ-GSH в суточных дозах 20, 10 и 2 мкмоль/кг соответственно; (б) – 1 – контроль, 2 и 3 – Б-ДНКЖ-GSH в суточных дозах 1 и 0,5 мкМ/кг соответственно. Дозы Б-ДНКЖ-GSH приводятся в пересчете на один Fe(NO)2-фрагмент. Введение препарата внутривенно, пятикратно, на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после перевивки опухоли.

наблюдается при его введении в разовой дозе 2 мкмоль/кг (рис. 2, табл. 1).

Таким образом, исследование противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-GSH в широком диапазоне доз (от 20 до 0,5 мкмоль/кг в сутки) позволило установить, что оптимальным режимом применения препарата, вызывающим ингибирование роста опухоли (карцинома легких Льюис) на 90%, является его внутривенное введение в суточной дозе 2 мкмоль/кг, пятикратно с интервалом в трое суток.

Следует отметить, что Б-ДНКЖ-GSH сохраняет определенную противоопухолевую активность, выразившуюся в торможении роста опухоли на 50%, даже при позднем начале применения препарата – на седьмые сутки развития опухоли (табл. 1).

Рассматривая вопросы оптимизации применения Б-ДНКЖ-GSH в качестве противоопухолевого агента, мы представляли целесообразным оценить толерантность животных опухоленосителей к введению высоких доз препарата внутрибрюшинно.

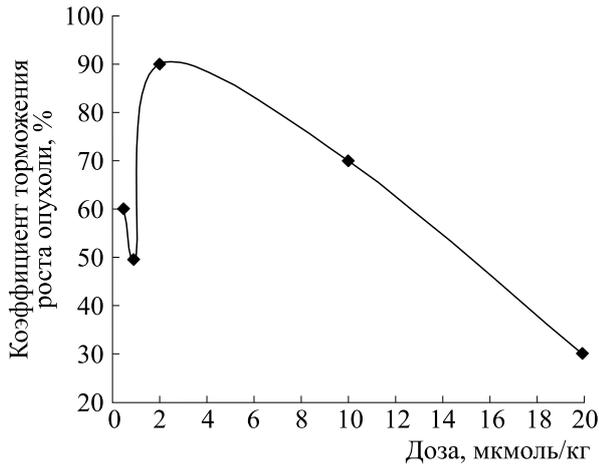
С этой целью проведено сравнительное изучение активности Б-ДНКЖ-GSH при внутрибрюшинном введении в относительно высоких дозах (100 и 200 мкмоль/кг), причем более высокая доза препарата вводилась дробно, по 100 мкмоль/кг два раза в сутки (карцинома легких Льюис).

Как видно из данных, приведенных на рис. 3 и в табл. 2, торможение роста опухоли под влиянием внутрибрюшинного введения Б-ДНКЖ-GSH возрастало с увеличением дозы. Ингибирование роста опухоли при оценке эффекта на 12-е сутки

**Таблица 1.** Противоопухолевый эффект Б-ДНКЖ-GSH в ряде доз при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис

Серия опыта	Группа	Суточная доза, мкмоль/кг	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	Торможение роста опухоли, %
1	Б-ДНКЖ-GSH	20	16	2.76 ± 0.54	30
1	Б-ДНКЖ-GSH	10	16	1.19 ± 0.14	70
1	Б-ДНКЖ-GSH	2	16	0.37 ± 0.08	90
1	Б-ДНКЖ-GSH*	2*	16*	1.96 ± 0.07*	50*
1	Контроль	–	16	3.93 ± 0.65	–
2	Б-ДНКЖ-GSH	1.0	19	3.22? ± 0.24	50
2	Б-ДНКЖ-GSH	0.5	19	2.50 ± 0.13	60
2	Контроль	–	19	6.05 ± 0.45	–

Примечание. Препарат вводили на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после перевивки опухоли. \* – Препарат вводили на 7-е, 9-е, 11-е и 14-е сутки после перевивки опухоли.



**Рис. 2.** Зависимость противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-GSH от дозы при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис.

после перевивки составило 49 и 62% для доз 100 и 200 мкмоль/кг соответственно, по сравнению с контролем. СПЖ животных практически не отличалась от контроля (рис.3, табл.2).

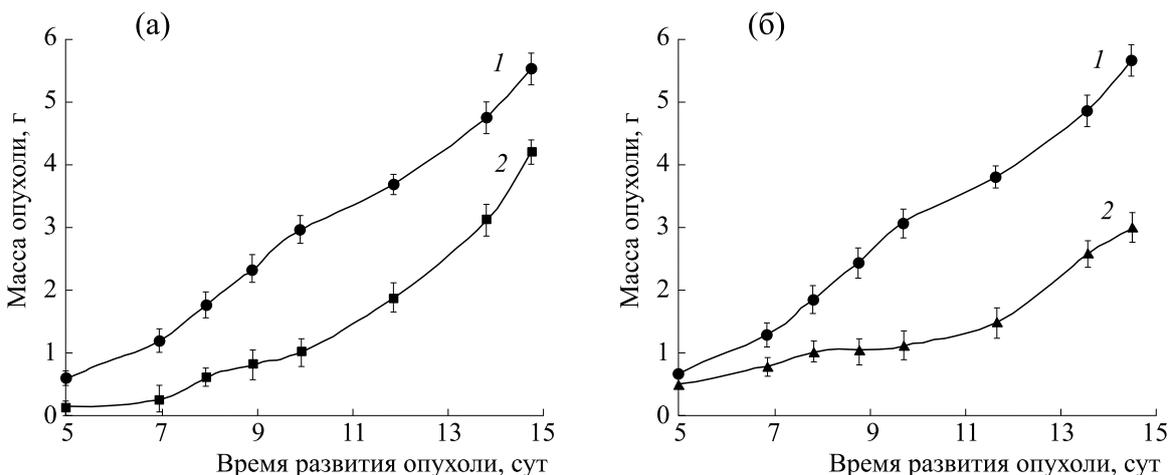
Таким образом, показано, что животные способны переносить сублетальную для мышей дозу Б-ДНКЖ-GSH, составляющую 200 мкмоль/кг, при условии ее внутрибрюшинного дробного введения, по 100 мкмоль/кг дважды в сутки. Такое применение препарата приводило к более значительному ингибированию роста опухоли, чем его введение в дозе 100 мкмоль/кг один раз в сутки.

В целом сопоставление эффекта Б-ДНКЖ-GSH при внутривенном и внутрибрюшинном введении свидетельствует о том, что путь введе-

ния препарата играет весьма существенную роль в реализации его противоопухолевой активности. Так, внутривенное применение Б-ДНКЖ-GSH в дозе 2 мкмоль/кг приводит к торможению роста опухоли на 90%, в то время как внутрибрюшинное введение препарата в дозе, на два порядка более высокой и составляющей 200 мкмоль/кг, вызывает торможение роста опухоли на 60 % (табл. 1 и 2).

**Противоопухолевая активность S-нитрозоглутатиона на моделях аденокарциномы Ca-755 и карциномы легких Льюис.** Ранее нами была установлена значительная противоопухолевая активность препарата GS-NO на двух моделях солидных опухолей мышей – карциноме легких Льюис и аденокарциноме Ca-755. Торможение роста опухолей при применении препарата внутривенно, десятикратно, ежедневно, в суточных дозах 200 и 400 мкмоль/кг составляло 70 и 60% при введении мышам с карциномой легких Льюис, а на модели аденокарциномы Ca-755 – 90 и 50% соответственно. При этом было показано, что GS-NO проявляет более высокую эффективность при применении в меньшей дозе 200 мкмоль/кг по сравнению с дозой 400 мкмоль/кг. Такая парадоксальная дозовая зависимость была отмечена в отношении обоих штаммов опухолей, но особенно четко выражена на модели аденокарциномы Ca-755, что требовало специального объяснения [3].

С этой целью нами на модели аденокарциномы Ca-755 проведено изучение зависимости эффекта от дозы GS-NO в диапазоне доз от 50 до 400 мкмоль/кг, при внутрибрюшинном десятикратном введении препарата.



**Рис. 3.** Противоопухолевая активность Б-ДНКЖ-GSH в высоких дозах при внутрибрюшинном введении на модели карциномы легких Льюис: (а) – 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-GSH, 100 мкмоль/кг/сутки; (б) – 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-GSH, 200 мкмоль/кг/сутки, дробно, два раза в сутки по 100 мкмоль/кг. Введение препарата внутрибрюшинно с первых по четвертые и с восьмых по одиннадцатые сутки.

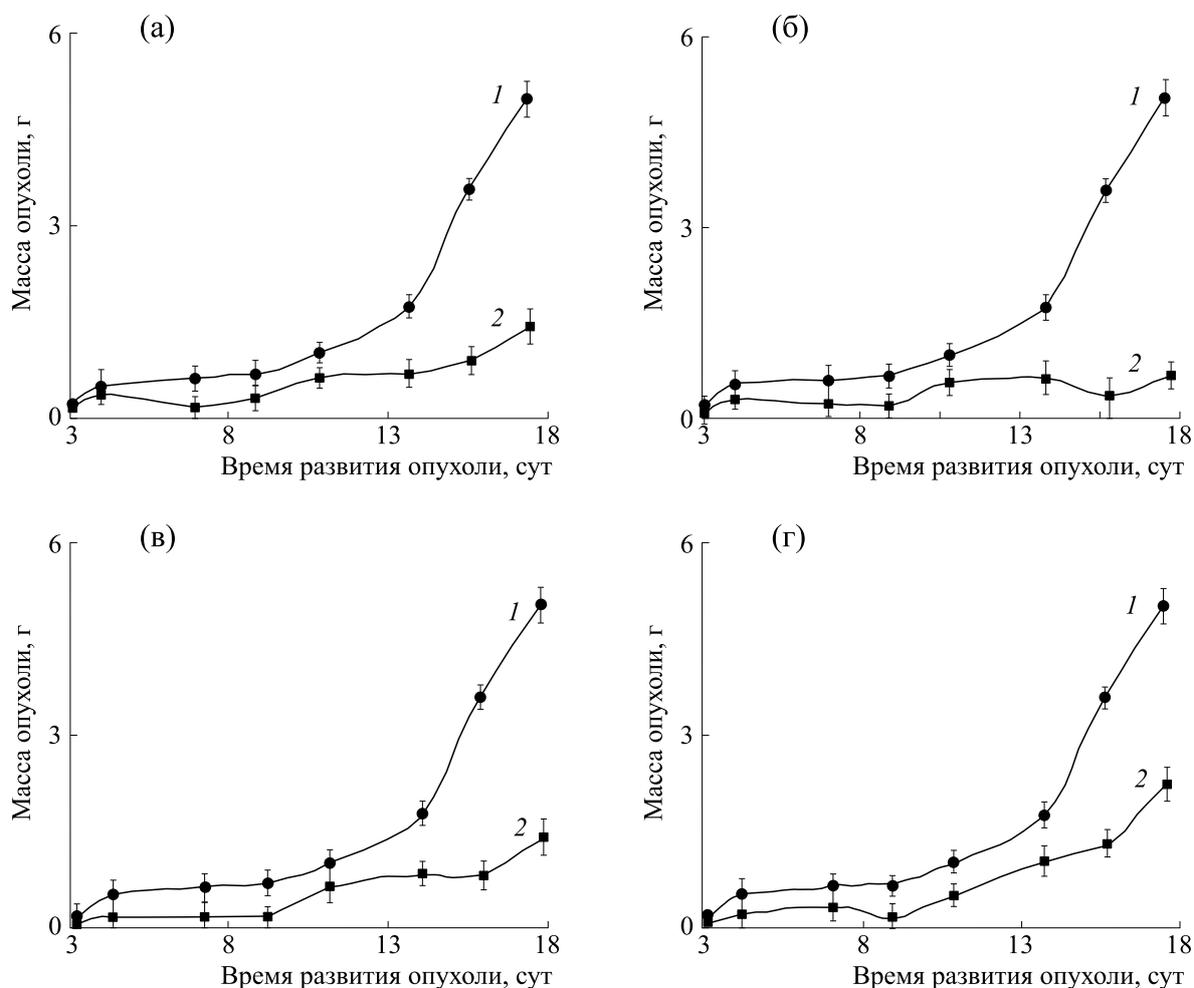
**Таблица 2.** Противоопухолевый эффект Б-ДНКЖ-GSH в высоких дозах при внутрибрюшинном введении на модели карциномы легких Льюис

Суточная доза, мкмоль/кг	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %	СПЖ $\tau$ , сутки	$\Delta\tau$ , %
100	12	2.2	<b>49</b>	31.0 ± 4.8	1
200 (по 100 мкмоль/кг), 2 раза в сутки	12	1.5	<b>62</b>	27.5 ± 5.6	-7
Контроль	12	3.9	—	29.6 ± 9.0	—

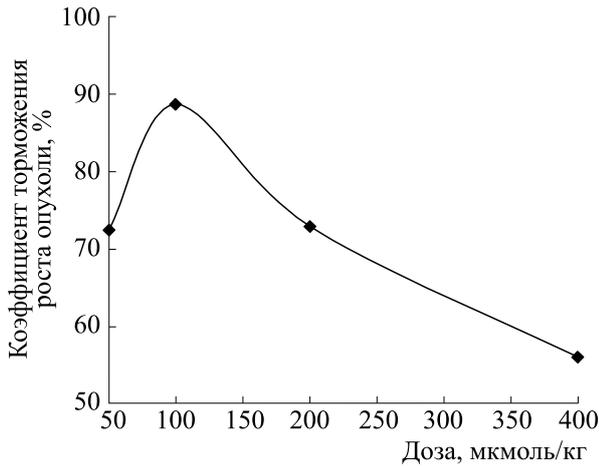
Примечание. Препарат вводили с первых по одиннадцатые сутки внутрибрюшинно, восьмикратно.

Как видно из данных, представленных на рис. 4 и 5, а также в табл. 3, GS-NO тормозит развитие аденокарциномы Ca-755 на 56–88% по сравнению с контролем. СПЖ животных увеличивается под влиянием GS-NO на 14–24% по

сравнению с контролем. При этом наибольший эффект GS-NO – 88% торможения роста опухоли и увеличение средней продолжительности жизни животных на 24% – наблюдается при применении препарата в суточной дозе 100 мкмоль/кг.



**Рис. 4.** Противоопухолевая активность GS-NO при внутрибрюшинном введении на модели аденокарциномы Ca-755: (а) – GS-NO, 50 мкмоль/кг/сутки; (б) – GS-NO, 100 мкмоль/кг/сутки, (в) – GS-NO, 200 мкмоль/кг/сутки; (г) – GS-NO, 400 мкмоль/кг/сутки. Кривая 1 – контроль, кривая 2 – GS-NO.

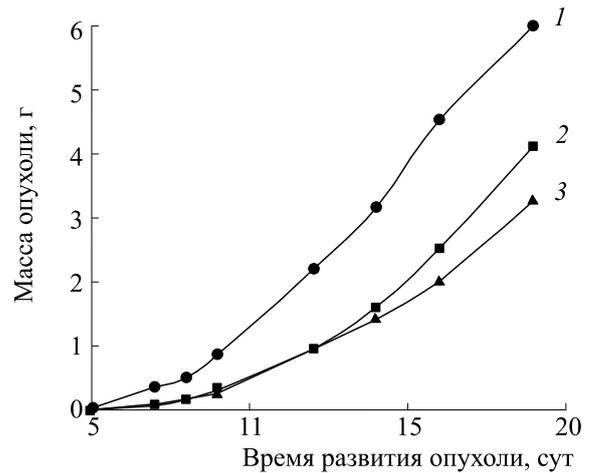


**Рис. 5.** Зависимость противоопухолевого эффекта GS-NO от дозы при внутрибрюшинном введении на модели аденокарциномы Са-755.

Таким образом, исследование противоопухолевого эффекта GS-NO в широком диапазоне доз (50–400 мкмоль/кг) при внутрибрюшинном введении на модели аденокарциномы Са-755 позволило обнаружить нелинейный характер зависимости эффекта от дозы и выявить оптимальный режим применения препарата – введение в разовой дозе 100 мкмоль/кг, десятикратно, ежедневно, внутрибрюшинно, обеспечивающий торможение роста опухоли на 90% и увеличение средней продолжительности жизни животных на 24% по сравнению с контролем (рис. 4 и 5, табл. 3).

Тенденция к некоторому повышению активности с уменьшением дозы препарата сохраняется и при внутривенном применении GS-NO. Так, введение GS-NO внутривенно, пятикратно (с интервалом в трое суток) в разовых дозах 10 и 20 мкмоль/кг приводит к ингибированию роста карциномы легких Льюис мышей на 45 и 32% по сравнению с контролем (рис. 6, табл. 4).

#### Противоопухолевая эффективность сочетанного применения Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO на модели



**Рис. 6.** Влияние ряда доз GS-NO при внутривенном введении на кинетику развития карциномы легких Льюис мышей: 1 – контроль; 2 – GS-NO, 20 мкмоль/кг/сутки; 3 – GS-NO, 10 мкмоль/кг/сутки. Препарат вводился внутривенно, пятикратно – на 1-е, 4-е, 8-е, 12-е и 15-е сутки после перевивки опухоли.

**карциномы легких Льюис.** Определенный интерес представляет изучение возможности усиления противоопухолевого эффекта соединений, генерирующих оксид азота, путем сочетанного применения двух разных по химическому строению веществ.

С этой целью исследована эффективность совместного применения Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO на модели карциномы Льюис при внутрибрюшинном введении.

Как видно из данных, представленных на рис. 7 и в табл. 5, торможение роста опухоли при индивидуальном применении Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO в дозах 100 и 200 мкмоль/кг/сутки в данном опыте не превышает 40 и 20% соответственно, при оценке эффекта на 16-е сутки после перевивки опухоли (рис. 7а, б).

Ингибирование роста опухоли при совместном применении в половинных дозах (рис. 7в) со-

**Таблица 3.** Противоопухолевый эффект Б-ДНКЖ-GSH в высоких дозах при внутрибрюшинном введении на модели карциномы легких Льюис

Суточная доза, мкмоль/кг	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %	СПЖ $\tau$ , сутки	$\Delta\tau$ , %
50	18	1.28 ± 0.40	<b>72</b>	30.3 ± 7.4	23
100	18	0.57 ± 0.30	<b>88</b>	30.7 ± 4.8	24
200	18	1.26 ± 0.40	<b>73</b>	29.2 ± 7.6	19
40	18	2.05 ± 0.50	<b>56</b>	28.0 ± 6.7	14
Контроль	18	4.67 ± 0.80	–	24.6 ± 2.3	–

Примечание. Препарат вводили с первых по десятые сутки внутрибрюшинно.

**Таблица 4.** Противоопухолевый эффект GS-NO в ряде доз при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис

Суточная доза, мкмоль/кг	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
20	19	4.1 ± 0.4	<b>32</b>
10	19	3.3 ± 0.3	<b>45</b>
Контроль	19	6.0 ± 0.8	—

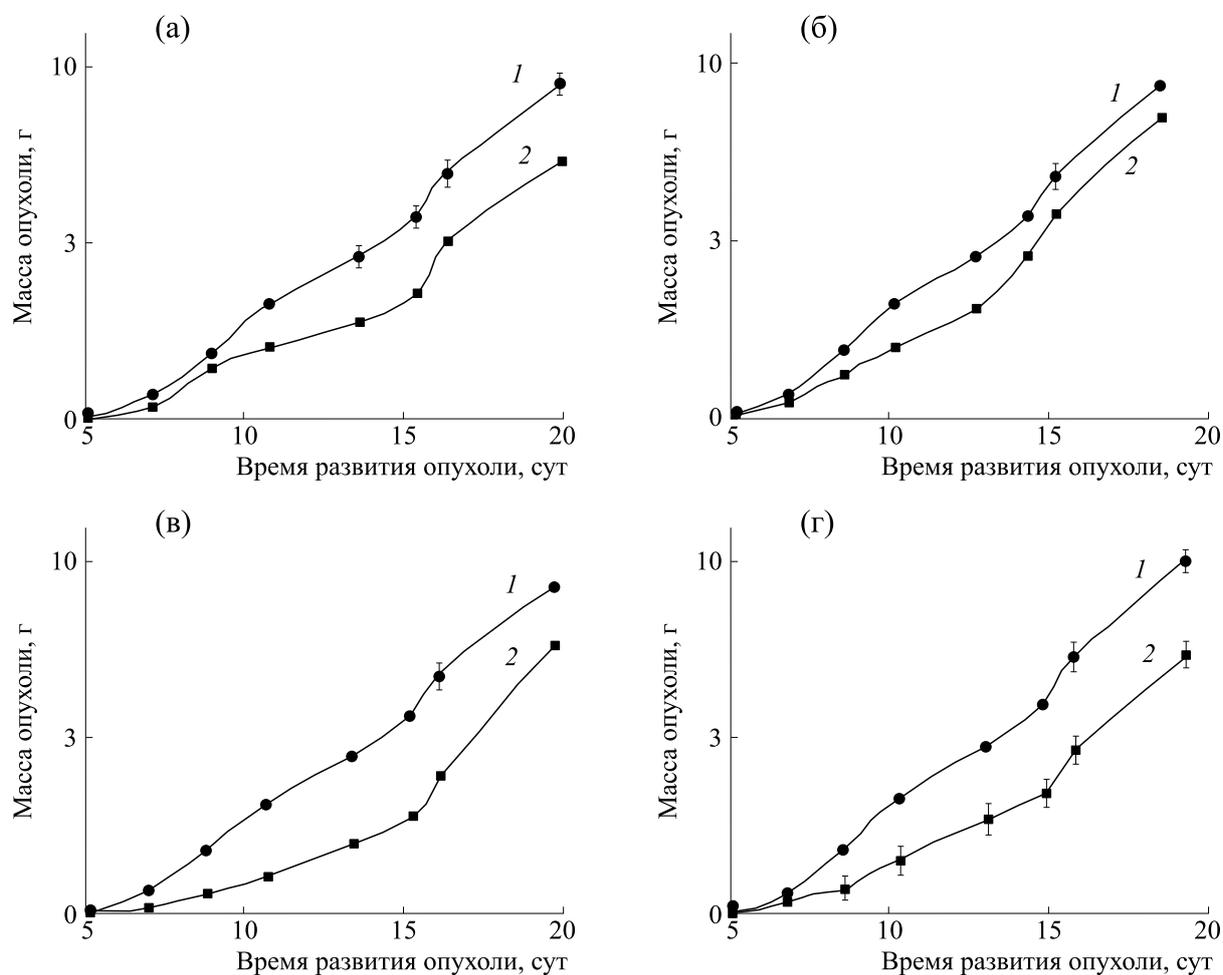
Примечание. Препарат вводили на 1-е, 4-е, 8-е, 12-е и 15-е сутки внутривенно.

ставило 55%, а при применении в полных дозах (рис. 7г) – 45% по сравнению с контролем.

Таким образом, очевидно, что наибольший эффект наблюдается при комбинации препаратов в половинных дозах и составляет 55% торможения на 16-е сутки развития опухоли (рис. 7,

табл. 5). Средняя продолжительность жизни у всех леченых животных на 4–12% ниже, чем в контроле (табл. 5).

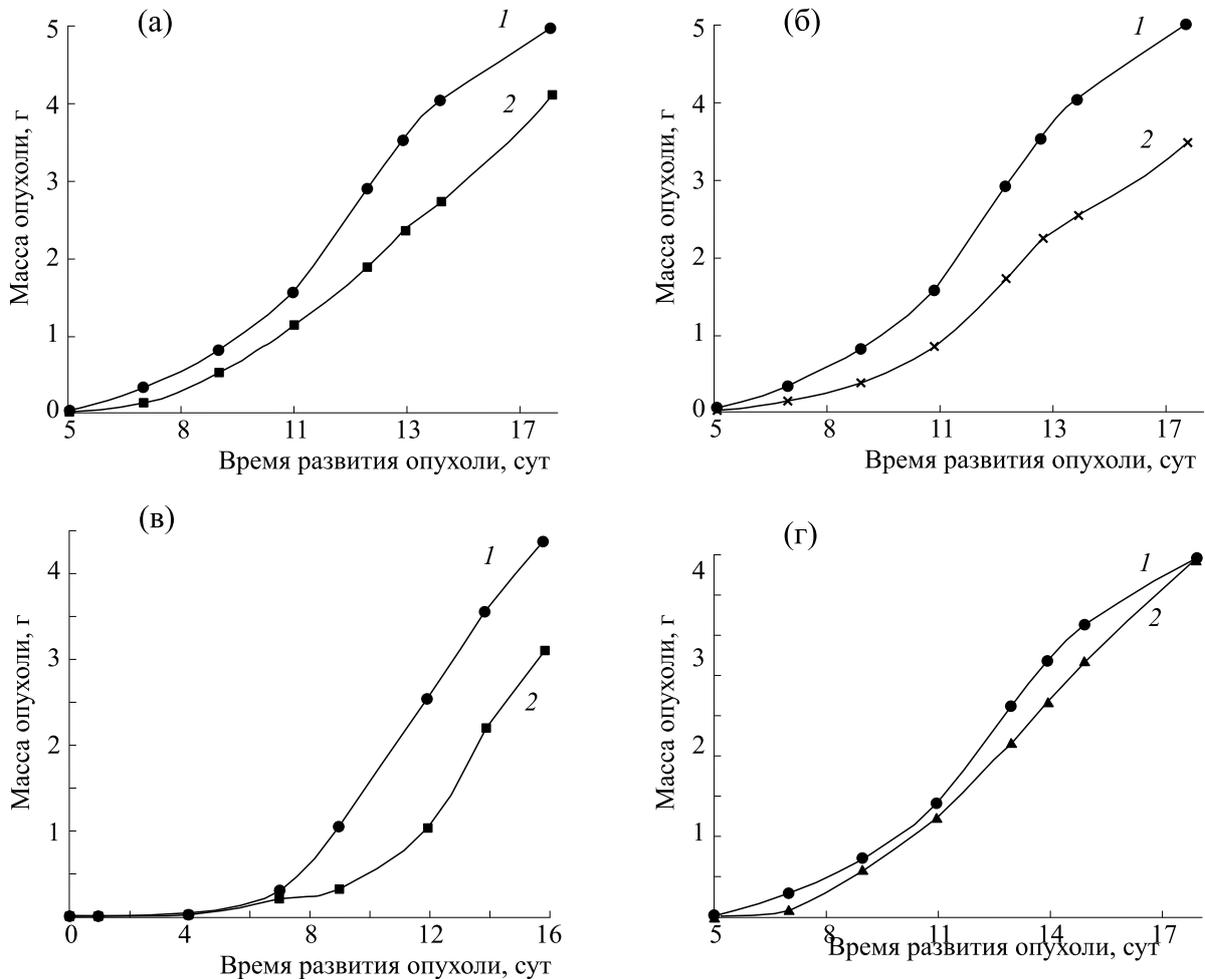
Представленные данные по оценке эффективности совместного внутрибрюшинного применения Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO свидетельствуют о



**Рис. 7.** Влияние Б-ДНКЖ-GSH, GS-NO и комбинации этих препаратов при внутрибрюшинном введении на развитие карциномы легких Льюис: (а) – 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-GSH, 100 мкмоль/кг/сутки; (б) – 1 – контроль; 2 – GS-NO, 200 мкмоль/кг/сутки; (в) – 1 – контроль; 2 – комбинация в половинных дозах: Б-ДНКЖ-GSH, 50 мкмоль/кг/сутки + GS-NO, 100 мкмоль/кг/сутки; (г) – 1 – контроль; 2 – комбинация в полных дозах: Б-ДНКЖ-GSH, 100 мкмоль/кг/сутки + GS-NO, 200 мкмоль/кг/сутки. Введение препаратов с первых по десятые сутки, внутрибрюшинно.

**Таблица 5.** Противоопухолевая активность препаратов Б-ДНКЖ-GSH, GS-NO и их комбинации при внутрибрюшинном введении на модели карциномы легких Льюис

Препарат	Суточная доза (мкмоль/кг) и схема введения препарата	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %	СПЖ мышей $\tau$ , сутки	$\Delta\tau$ , %
ДНКЖ-GSH	100 1–10 сутки	16	$3.4 \pm 0.3$	40	$31.2 \pm 4.0$	9.5
GS-NO	200 1–10 сутки	16	$4.5 \pm 0.3$	20	$31.5 \pm 3.1$	–9.0
ДНКЖ-GSH + GS-NO	50 + 100 1–10 сутки	16	$2.6 \pm 0.4$	55	$30.2 \pm 5.2$	–12.0
ДНКЖ-GSH + GS-NO	100 + 200 1–10 сутки	16	$3.2 \pm 0.2$	45	$33.2 \pm 3.0$	–3.8
Контроль		16	$5.6 \pm 0.3$	–	$34.5 \pm 3.2$	–



**Рис. 8.** Противоопухолевая активность ряда доноров оксида азота при внутривенном введении на модели аденокарциномы Акатол: (а) – Б-ДНКЖ-GSH, 10 мкмоль/кг; 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки; (б) – М-ДНКЖ-TS, 10 мкмоль/кг; 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки; (в) – Б-ДНКЖ-MS, 2,5 мкмоль/кг, с первых по шестые сутки; (г) – GS-NO, 10 мкмоль/кг; 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки. 1 – Контроль, 2 – препарат.

**Таблица 6.** Противоопухолевый эффект ряда доноров оксида азота при внутривенном введении на модели аденокарциномы Акатол

Группа	Суточная доза (мкмоль/кг)	Режим введения (сутки)	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-GSH	10	1, 4, 6, 8,11	18	4.04 ± 0.27	18
М-ДНКЖ-TS	10	1, 4, 6, 8,11	18	3.43 ± 0.26	30
GS-NO	10	1, 4, 6, 8,11	18	4.88 ± 0.32	0
Контроль				4.92 ± 0.37	–
Б-ДНКЖ-MS	2.5	1–6	16	3.04 ± 0.25	30
Контроль				4.31 ± 0.35	–

Примечание. \* – Контроль в эксперименте с препаратом Б-ДНКЖ-MS.

**Таблица 7.** Максимальный противоопухолевый эффект препаратов Б-ДНКЖ-GSH, М-ДНКЖ-TS, Б-ДНКЖ-MS и GS-NO на моделях солидных опухолей мышей

Препарат	ТРО, %	Штамм опухоли	Суточная доза, режим введения
Б-ДНКЖ-GSH	90	Карцинома легких Льюис	2 мкмоль/кг, внутривенно на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки
М-ДНКЖ-TS	30	Аденокарцинома Акатол	10 мкмоль/кг, внутривенно на 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки
Б-ДНКЖ-MS	30	Аденокарцинома Акатол	2,5 мкмоль/кг, внутривенно на 1-е, 4-е, 6-е, 8-е и 11-е сутки
GS-NO	90	Аденокарцинома Са-755	100 мкмоль/кг, внутривенно на первые-десятые сутки
	45	Карцинома легких Льюис	10 мкмоль/кг, внутривенно на 1-е, 4-е, 8-е, 12-е и 15-е сутки

тенденции к некоторому увеличению противоопухолевой активности препаратов (с 40 до 55%) при их комбинированном использовании (карцинома легких Льюис).

**Сравнительная оценка противоопухолевой активности ряда доноров оксида азота на модели аденокарциномы Акатол.** С целью определения среди доноров оксида азота препарата, обладающего наибольшей противоопухолевой активностью, проведено сравнительное изучение соединений Б-ДНКЖ-GSH, М-ДНКЖ-TS, Б-ДНКЖ-MS и GS-NO при внутривенном введении на модели аденокарциномы Акатол (рис. 8, табл. 6).

Как видно из представленных данных, аденокарцинома Акатол обладает весьма слабой чувствительностью к действию изученных препаратов, уступая в этом отношении таким моделям солидных опухолей, как аденокарцинома Са-755 и карцинома легких Льюис. Максимальное ингибирование роста аденокарциномы Акатол под влиянием протестированных препаратов не превышает 30% по сравнению с контролем и наблюдается под влиянием таких соединений, как М-ДНКЖ-TS и Б-ДНКЖ-MS (рис. 8, табл. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Обобщая результаты проведенных исследований, отметим, что изученные препараты, обладающие способностью генерировать оксид азота, проявляют определенную ростиингибирующую активность в отношении солидных опухолей мышей.

Выраженность противоопухолевого эффекта зависит от природы соединения, режима его применения и чувствительности опухолевого штамма. Наибольшую противоопухолевую активность, выразившуюся в торможении роста опухоли на 90%, проявили препараты Б-ДНКЖ-GSH при внутривенном введении мышам с карциномой легких Льюис и GS-NO при внутривенном введении животным с аденокарциномой Са-755 (табл. 7).

Особенностью действия протестированных препаратов является нелинейный характер зависимости противоопухолевого эффекта от дозы, которая проходит через максимум (рис. 2 и 5). Такой характер зависимости «доза–эффект» является нетипичным для действия большинства из-

вестных цитостатиков и, возможно, отражает определенные особенности фармакологического механизма действия генерирующих оксид азота препаратов.

При рассмотрении приведенных выше данных, а также результатов, полученных нами ранее в работах [1–6] при изучении противоопухолевого действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и GS-NO, возникает ряд вопросов, на которые мы попытаемся ответить.

1. При сопоставлении противоопухолевого действия всех изученных соединений при их внутрибрюшинном и внутривенном введении обнаруживается четкое различие в отношении их доз, при которых достигался оптимальный эффект. При внутрибрюшинном введении он имел место при наиболее высокой дозе препаратов, тогда как при внутривенном введении наблюдалась обратная картина. Исходя из результатов работы [13], в которой было изучено влияние способов введения Б-ДНКЖ-GSH крысам на гипотензивное действие этих комплексов, есть основание предполагать, что при внутрибрюшинном введении использованных ДНКЖ и GS-NO только незначительная часть этих соединений достигает циркулирующей крови. Другими словами, даже при их наибольшей дозе (100–200 мкмоль/кг веса животных) при внутрибрюшинном введении в кровь попадает менее 1 мкмоль/кг этих соединений.

2. Здесь же возникает вопрос, почему при внутривенном введении препаратов их противоопухолевое действие снижается при повышении их дозы? Ответить на этот вопрос можно, если учесть, что, согласно работе [14], вводимые в кровь ДНКЖ и, по-видимому, S-нитрозотиолы поглощаются иммунокомпетентными клетками — в первую очередь макрофагами, включение в которые большого количества доноров NO может оказаться для этих клеток губительным [15]. Естественно, что погибшие макрофаги, включившие в себя значительное количество доноров NO, не могут обеспечить транспорт этих доноров к опухолям, как это могли бы осуществить интактные иммунокомпетентные клетки. Такую доставку макрофаги могли осуществить только при включении в них небольшого количества доноров NO, например, при внутривенном введении в кровь мышей Б-ДНКЖ-GSH в дозе не более 2 мкмоль/кг.

3. Возникает также вопрос, почему во всех наших опытах нам не удалось достичь оптимального результата — полного подавления роста злокачественных опухолей, подобно тому, как это было показано в работе китайских исследователей [7].

Прежде чем сделать какое-либо предположение в ответ на этот вопрос, следует отметить, что

кроме молекул NO, которые могут высвободиться как из ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, так и из S-нитрозотиолов, оба типа этих нитрозосоединений могут выступать еще и в качестве доноров иона нитрозония ( $\text{NO}^+$ ) — продукта одноэлектронного окисления NO [16]. Есть основание предполагать, что и этот катион способен, как и нейтральные молекулы NO, инициировать гибель опухолевых клеток, вызывая S-нитрозирование белков, локализованных на клеточной поверхности, и тем самым провоцируя развитие апоптоза клеток, обусловленного повышением внутриклеточного окислительного потенциала [17].

Что касается губительного действия на эти клетки молекул NO, то его обычно связывают с превращением NO в реакции с супероксидом в пероксинитрит. Последний оказывает на клетки мощное токсическое действие, высвобождая в клеточную среду после протонирования свободные радикалы гидроксила [18].

Какой из этих агентов — NO или  $\text{NO}^+$  — мог оказывать в наших опытах решающее цитотоксическое действие на опухоли? Есть основание предполагать, что в качестве такого агента могли выступать ионы нитрозония. Об этом четко свидетельствуют результаты упомянутой выше работы [17], в которой было показано, что обработка М-ДНКЖ-TS одним из производных дитиокарбамата, способным перехватывать на себя из ДНКЖ группу Fe-NO с сопутствующим высвобождением из этих комплексов ионов  $\text{NO}^+$ , никоим образом не влияла на эффективность цитотоксического действия М-ДНКЖ-TS.

Что касается NO, то опухолевые клетки могли выработать защиту от его действия, как это «делает» ряд патогенных бактерий [19]. Как и бактерии, злокачественные клетки могли экспрессировать синтез гемсодержащих белков, способных или окислять, или восстанавливать молекулы NO, удаляя тем самым NO из внутриклеточной среды. Вот почему в начале при контакте опухолей с использованными нитрозосоединениями, когда злокачественные клетки начинали вырабатывать защиту от NO, наблюдалась задержка в развитии опухолей, которая затем, после создания этой защиты, сменялась быстрым развитием опухолей.

Что касается способности злокачественных клеток вырабатывать защиту против катионов нитрозония, появление такого качества у этих клеток представляется маловероятным. В пользу этого предположения свидетельствует факт 90%-го ингибирования роста аденокарциномы Ca-755 при внутрибрюшинном введении мышам GS-NO (рис. 46). Последний, как типичный представитель S-нитрозотиолов, мог по ме-

ханизму S-транс-нитрозирования [11] передавать катионы  $\text{NO}^+$  на тиоловые группы поверхностных белков злокачественных клеток и тем самым подавлять, в соответствии с данными работы [17], пролиферацию клеток аденокарциномы Ca-755 в организме мышей.

Почему китайским исследователям в работе [7] удалось полностью подавить пролиферацию клеток рака простаты человека под действием моноядерных динитрозильных комплексов железа с этилмеркаптаном в качестве тиолсодержащего лиганда, способного, как и все ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, выступать в качестве доноров  $\text{NO}$  и  $\text{NO}^+$ ? Не исключено, что этот успех был обусловлен тем, что молекулы этилмеркаптана из-за своих небольших размеров гораздо слабее, чем молекулы глутатиона, могли противостоять переходу катионов нитрозония на тиоловые группы белков в злокачественных клетках, то есть препятствовать S-нитрозированию этих белков, что и могло приводить к гибели опухолевых клеток. Другими словами, успех китайских исследователей мог быть обусловлен существенно меньшей устойчивостью S-нитрозоэтилмеркаптана и в соответствии с этим меньшей устойчивостью моноядерных динитрозильных комплексов железа с этилмеркаптаном по сравнению с устойчивостью тех же соединений глутатиона, использовавшихся в наших опытах [8, 20, 21].

Нами предполагается проверка высказанных соображений в последующих исследованиях на опухолях, которые будут подвергаться действию ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами с меньшими, чем глутатион, размерами молекул. Для ответа на вопрос, какой из компонентов ДНКЖ —  $\text{NO}$  или  $\text{NO}^+$  — может быть ответственен за противоопухолевую активность ДНКЖ, предполагается изучить влияние на эту активность производных дитиокарбамата, как это было сделано в работе [17]. В том случае, если производные дитиокарбамата не будут проявлять противоопухолевый эффект, это будет означать, что противоопухолевая активность ДНКЖ и соответствующих S-нитрозоэтиолов обусловлена высвобождающимися из них катионами нитрозония.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00059а).

#### 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** (3), 508 (2014).
2. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **60** (1), 152 (2015).
3. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **60** (6), 1157 (2015).
4. A. F. Vanin, L. A. Ostrovskaya, and D. B. Korman, *Austin J. Reprod. Medicine & Infertility* **2**, 1109 (2015).
5. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **62** (3), 591 (2017).
6. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **64** (5), 1216 (2019).
7. S.-H. Wu, C.-Y. Lu, Y.-L. Chen, et al., *Inorg. Chem.* **55**, 9384 (2016).
8. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 1236 (2010).
9. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 110 (2013).
10. D. Sh. Burbaev, A. F. Vanin, and L. A. Blumenfeld, *Zhurn. Strukt. Khimii* **2**, 252 (1971).
11. D. L. H. Williams, in *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004), p. 35.
12. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в кн. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), сс. 642–657.
13. A. A. Timoshin, V. L. Lakomkin, A. A. Abramov, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **705**, 525 (2015).
14. H. Levandovska, T. M. Stepkowski, S. Meczynska-Wielgosz, et al., *J. Inorg. Biochem.* **188**, 29 (2018).
15. J. Mier-Carbrera, S. Gonzalez-Gallardo, and C. Hernandez-Guerrero, *Reprod. Sci.* **20**, 1332 (2013).
16. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmac. Chem.* **5**, 1104 (2018).
17. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1340 (2006).
18. J. Scicinski, B. Oronskya, S. Ning, et al., *Redox Biol.* **6**, 1 (2015).
19. J. Green, M. D. Rolfe, and L. J. Smith, *Virulence* **5**, 1 (2013).
20. A. F. Vanin, R. A. Stukan, and E. B. Manukhina, *Biochim. Biophys. Acta* **1295**, 5 (1996).
21. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1 (2009).

## **Antitumour Properties of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands and S-Nitrosoglutathione in the Experiment**

**A.F. Vanin<sup>\*, \*\*</sup>, L.A. Ostrovskaya<sup>\*\*\*</sup>, D.B. Korman<sup>\*\*\*</sup>, V.A. Rykova<sup>\*\*\*</sup>,  
N.V. Bluchterova<sup>\*\*\*</sup>, and M.M. Fomina<sup>\*\*\*</sup>**

*\*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 S-nitrosoglutathione, bi- and mononuclear dinitrosyl iron complexes with different thiol-containing ligands such as glutathione, mercaptosuccinate, thiosulfate against murine transplantable solid tumors (Lewis lung carcinoma, Acatol adenocarcinoma and Ca-755 adenocarcinoma) was studied. Preparations of dinitrosyl iron complexes with glutathione after intravenous injection (Lewis lung carcinoma) and S-nitrosoglutathione after intraperitoneal injection (Ca-755 adenocarcinoma) in animals exhibited the highest antitumor activity. They caused 90% tumor cell growth inhibition. The results obtained, in conjunction with our earlier data concerning the antitumor activity of this type of compounds as well as the results of other researchers in this field of study, suggest that the antitumor effect of the above mentioned compounds is due to the ability of these preparations to act as donors of nitrosonium ions. Nitrosonium ion-induced S-nitrosylation of thiol-containing proteins localized to tumor cell surfaces leads to the enhancement of the intracellular oxidative capacity thereby promoting apoptosis and death of tumor cells.

*Keywords: dinitrosyl iron complexes, S-nitrosothiols, antitumor activity, murine solid tumor models*