

УДК 577.3

ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА – ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ БИЯДЕРНОГО ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ

© 2021 г. А.Ф. Ванин*, **, Л.А. Островская***, Д.Б. Корман***, Е.И. Некрасова***, О.О. Рябая****, Н.В. Блюхтерова***, В.А. Рыкова***, М.М. Фомина***

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

**Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8/2

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

****Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 05.08.2021 г.

После доработки 16.09.2021 г.

Принята к публикации 17.09.2021 г.

Исследована противоопухолевая активность и цитотоксический эффект биядерных динитрозильных комплексов железа с N-ацетилцистеином в условиях *in vivo* и *in vitro* на модели солидной опухоли мышей (аденокарцинома Акатол), на моделях клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549) и нормальных клеток человека (фибробласты кожи линии WI-26). Установлено, что препарат, содержащий эти комплексы, ингибирует развитие опухоли Акатол на 60% по сравнению с контролем как при внутривенном, так и при внутривентральном введении. Препарат обладает слабо выраженным цитотоксическим эффектом как в отношении опухолевых, так и нормальных клеток. Показатель IK_{50} составляет 0.12 и 0.44 мкМ/мл для опухолевых клеток MCF-7 и A549 соответственно, а для фибробластов кожи человека – 0.28 мкМ/мл. Предполагается, что противоопухолевый эффект препаратов на основе биядерных динитрозильных комплексов железа обусловлен не только их прямым цитотоксическим воздействием на опухолевые клетки, но и опосредованным влиянием доноров оксида азота на развитие опухоли, связанным с их способностью включаться в иммунокомпетентные клетки организма, обеспечивающие направленную доставку комплексов к опухолям.

Ключевые слова: биядерный динитрозильный комплекс железа с N-ацетилцистеином, противоопухолевая активность, цитотоксический эффект.

DOI: 10.31857/S0006302921060193

Ранее нами было установлен противоопухолевый эффект ряда генерирующих оксид азота соединений, таких как моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа (Б-ДНКЖ), содержащих различные лиганды, а также S-нитрозоглутатиона, в отношении ряда солидных опухолей мышей (карциномы легких Льюис, аденокарциномы Акатол и Са-755). Противоопухолевый эффект изученных препаратов колебался в пределах от 60 до 90% торможения роста опухоли,

изменяясь в зависимости от дозового режима, схемы применения, времени оценки эффекта и природы опухолевого штамма [1–7].

С целью исследования роли лиганда в проявлении ростиногибирующей и цитотоксической активности комплексов было проведено сравнительное изучение в условиях *in vivo* и *in vitro* двух соединений Б-ДНКЖ – содержащих глутатион (Б-ДНКЖ-Г) и меркаптосукцинат (Б-ДНКЖ-МС). Было обнаружено отсутствие корреляции между выраженностью противоопухолевого и цитотоксического эффектов препаратов. Так, Б-ДНКЖ-Г обладает преимущественной по сравнению с Б-ДНКЖ-МС активностью *in vivo*, что выражается в ингибировании развития солидной опухоли (карцинома легких Льюис) на 90 и 65% по сравнению с контролем соответственно.

Сокращения: Б-ДНКЖ-Г – биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие глутатион, Б-ДНКЖ-МС – биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие меркаптосукцинат, Б-ДНКЖ-АЦЦ – биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие N-ацетилцистеин.

Наряду с этим Б-ДНКЖ-МС обладает более выраженным, чем Б-ДНКЖ-Г, цитотоксическим эффектом *in vitro* — значения $ИК_{50}$ составляют 0.8 и 2.0 мкмоль/мл соответственно (культура клеток опухоли человека МСF7).

Интерпретируя эти данные, можно предположить, что ростингибирующее действие препаратов на основе биядерных динитрозильных комплексов железа обусловлено не только их прямым цитотоксическим воздействием на опухолевые клетки, но и опосредованным влиянием доноров оксида азота на развитие опухоли, связанным с их способностью включаться в иммунокомпетентные клетки организма, обеспечивающие направленную доставку комплексов к опухолям [8].

В продолжение исследований, направленных на выяснение роли природы лиганда в реализации противоопухолевого действия доноров оксида азота, нами в данной работе проведено изучение ростингибирующего и цитотоксического эффекта нового биядерного динитрозильного комплекса железа, содержащего N-ацетилцистеин (Б-ДНКЖ-АЦЦ). Противоопухолевая активность и цитотоксический эффект Б-ДНКЖ-АЦЦ исследованы в условиях *in vivo* и *in vitro* на модели солидной опухоли мышей (аденокарцинома Акатол), на моделях клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы МСF-7, рак легкого А549) и на нормальных клетках человека (фибробласты кожи линии WI-26).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. В экспериментах использовали ферросульфат железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Fluka, Швейцария), N-ацетилцистеин 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 было описано ранее [9–11].

Биядерная форма динитрозильных комплексов железа с N-ацетилцистеином. Синтез Б-ДНКЖ-АЦЦ проводили путем обработки газообразным NO (при давлении 150 мм рт. ст.) 1 мл раствора ферросульфата в дистиллированной воде и ацетилцистеина 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 ранее [8]. Концентрация ферросульфата в этой смеси составляла 5 мМ. После 5-минутного встряхивания смеси, приводившего к включению всего двухвалентного железа в ДНКЖ-АЦЦ, NO удаляли из аппарата откачкой, раствор полученного Б-ДНКЖ-АЦЦ замораживали и исполь-

зовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Концентрацию препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ оценивали по интенсивности полосы его оптического поглощения на 360 нм, принимая $\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ).

Противоопухолевая активность *in vivo*. Эксперименты проведены на 40 инбредных мышах линии Balb/c, самках с массой тела 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России».

В качестве опухолевой тест-системы служила солидная опухоль мышей — аденокарцинома толстого кишечника Акатол, перевиваемая подкожно в соответствии со стандартной методикой [12].

Исследуемый препарат Б-ДНКЖ-АЦЦ вводили животным в виде водного раствора внутривенно в хвостовую вену мышей и внутрибрюшинно в суточной дозе 10 мкг/кг десятикратно с первых по десять сутки после перевивки опухоли.

Оценка противоопухолевой активности препаратов проведена при сопоставлении кинетики роста опухолей в группах контрольных и леченых животных. Показателем ростингибирующего эффекта препарата служил коэффициент торможения роста опухоли (TPO , %), который определяли из соотношения: $TPO = (P_C - P_T)/P_C$, где P_C и P_T — объем (или масса) опухоли в группах контрольных и леченых 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 величину плотности опухолевой ткани, равную 1 г/см^3 [12].

Каждая группа животных состояла из восьмидесяти мышей. Наблюдение за животными продолжали в течение всего периода развития опухоли, вплоть до гибели животных.

Статистическая обработка данных проведена путем оценки размеров опухолей (массы опухолей) у контрольных и леченых животных с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0.

Цитотоксический эффект *in vitro*. Изучение цитотоксичности Б-ДНКЖ-АЦЦ проведено на моделях клеточных культур опухолей человека (карцинома молочной железы МСF-7, эпителиоидный рак легкого А549) и на нормальных клетках человека (фибробласты кожи WI-26), полученных из банка опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

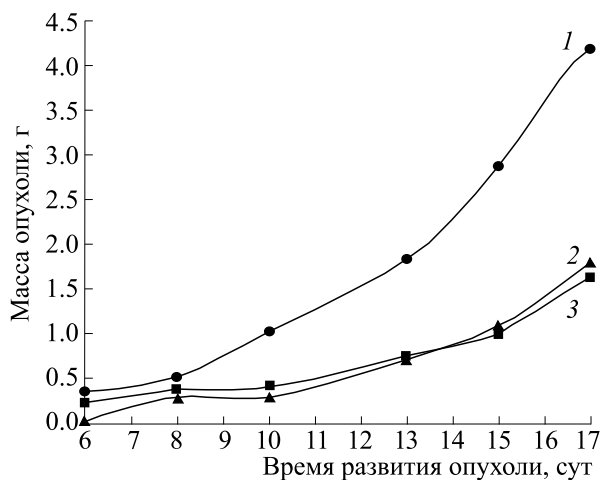


Рис. 1. Противоопухолевая активность препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ на модели аденокарциномы Акатол: 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-АЦЦ, 10 мкМ/кг, внутривенно; 3 – Б-ДНКЖ-АЦЦ, 10 мкМ/кг, внутрибрюшинно. Введение препарата с первых по десятые сутки после перевивки опухоли.

Действие препарата *in vitro* исследовано в широком диапазоне концентраций – от 0.001 до 0.5 мкмоль/мл.

Оценку цитотоксического эффекта осуществляли путем определения доли выживших клеток по отношению к контролю с использованием стандартного МТТ-теста. Выживаемость клеток в культуре оценивали спектрофотометрически по окрашиванию жизнеспособных клеток [8, 13].

Клетки ($8 \cdot 10^4$ клеток/лунку) вносили в 96-луночный планшет в полной среде DMEM (арт. 41965039, Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин («ПанЭко», Россия) и 10 Ед/мл пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия), в конечном объеме 200 мкл на лунку и помещали в CO₂-инкубатор.

Через 24 ч проводили замену среды, после чего добавляли исследуемый препарат в указанных концентрациях. В контрольную группу клеток

препарат не вносили. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 48 ч, затем добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ-реагента (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5 дифенил тетразолия бромид, AppliChem, Германия) в конечной концентрации 0.5 мг/мл. Клетки инкубировали в течение 3 ч, затем среду отбирали и добавляли к ним по 200 мкл диметилсульфоксида до растворения кристаллов формазана (37°C, 10 мин при встряхивании).

Оптическую плотность раствора формазана определяли спектрофотометрически при длине волны 570 нм на анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США), выживаемость клеток высчитывали по формуле: (ОП экспериментальной группы/ОП контрольной группы) 100%, где ОП – оптическая плотность раствора.

Результаты экспериментов представлены в виде зависимостей «доза–эффект», характеризующих цитотоксическое действие препарата и позволяющих определить показатель цитотоксичности Б-ДНКЖ-АЦЦ *ИК*₅₀ (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток) в отношении изучавшихся культур опухолевых клеток.

Статистическая обработка результатов проведена с помощью пакетов программ Statistica и Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено исследование противоопухолевой активности и цитотоксического эффекта препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ в условиях *in vivo* и *in vitro* на модели солидной опухоли мышей (аденокарцинома Акатол), на моделях клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549) и на фибробластах человека (линия WI-26).

Противоопухолевая активность *in vivo* биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих N-ацетилцистеин. Влияние Б-ДНКЖ-АЦЦ на развитие аденокарциномы Акатол характеризуют данные, представленные на рис. 1 и в табл. 1.

Как видно, препарат Б-ДНКЖ-АЦЦ проявляет определенную противоопухолевую активность

Таблица 1. Противоопухолевая активность препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ на модели аденокарциномы Акатол

Группа	Суточная доза, мкМ/кг, способ введения препарата	Средняя масса опухоли, г	Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %)
Б-ДНКЖ-АЦЦ	10 мкМ/кг, внутривенно	1.66 ± 0.2	60
Б-ДНКЖ-АЦЦ	10 мкМ/кг, внутрибрюшинно	1.79 ± 0.3	57
Контроль	–	4.18 ± 0.4	–

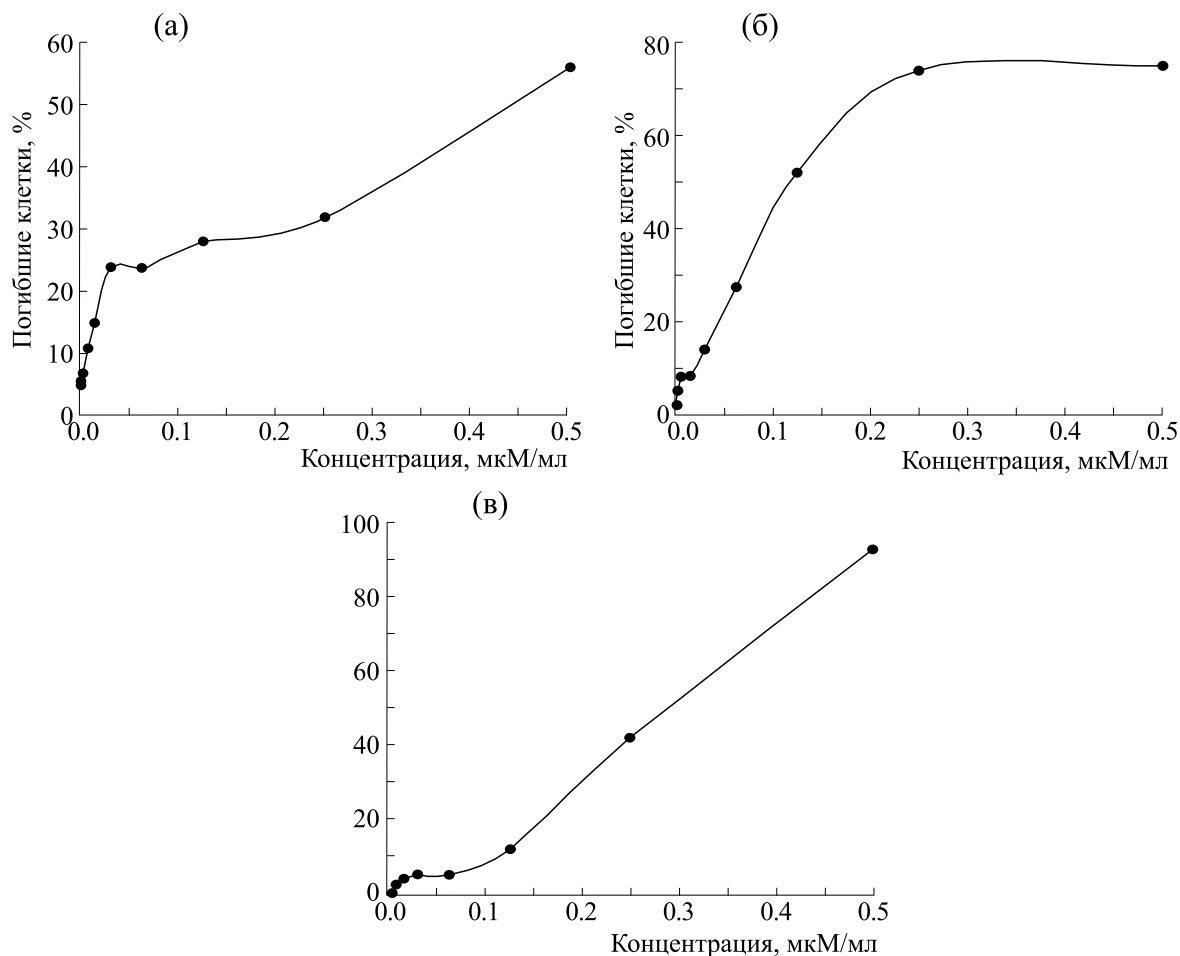


Рис. 2. Концентрационные зависимости цитотоксического эффекта препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ в отношении опухолевых и нормальных клеток человека: (а) – культура клеток рака молочной железы МСF-7, (б) – культура клеток рака легкого А 549, (в) – культура клеток фибробластов WI-26.

в отношении данной солидной опухоли, ингибируя ее развитие на 60% по сравнению с контролем как при внутривенном, так и при внутривенном введении.

Цитотоксический эффект *in vitro* биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих N-ацетилцистеин. Исследование эффектов Б-ДНКЖ-АЦЦ в условиях *in vitro* включало сравнительную оценку цитотоксического эффекта препарата в отношении клеток опухолей человека различного генеза (рак молочной железы МСF-7, рак легкого А549), а также изучение его влияния на нормальные клетки кожи человека (фибробласты линии WI-26).

Выживаемость опухолевых клеток в зависимости от концентрации Б-ДНКЖ-АЦЦ для исследованных клеточных культур охарактеризована данными, представленными на рис. 2.

Полученные данные свидетельствуют о дозозависимом цитотоксическом эффекте препарата,

возрастающем с увеличением концентрации Б-ДНКЖ-АЦЦ для всех изученных типов клеток. Сопоставление цитотоксической активности препарата в максимальной из исследованных концентраций (0.5 мкМ/мл) в отношении различных типов клеток свидетельствует о том, что фибробласты человека обладают более высокой чувствительностью к действию Б-ДНКЖ-АЦЦ по сравнению с опухолевыми клетками. Так, при воздействии указанной концентрации препарата на исследовавшиеся культуры клеток погибает 100% фибробластов линии WI-26, 75% клеток рака легкого А 549 и 56% клеток рака молочной железы МСF-7. При этом очевидно, что Б-ДНКЖ-АЦЦ проявляет большую активность в отношении клеток рака легкого А 549 по сравнению с клетками рака молочной железы МСF-7 (рис. 2).

При оценке цитотоксического эффекта препарата в соответствии с показателем $ИК_{50}$ также очевидно, что клетки рака легкого А549 более чувствительны, чем клетки рака молочной желе-

Таблица 2. Показатель цитотоксического эффекта IK_{50} препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ в отношении ряда культур опухолевых и нормальных клеток человека *in vitro*

Клеточная линия	IK_{50} , мкМ/мл
Рак молочной железы MCF-7	0.44
Рак легкого A549	0.12
Фибробласты WI-26	0.28

зы MCF-7, к действию Б-ДНКЖ-АЦЦ – IK_{50} составляет 0.12 и 0.44 мкМ/мл соответственно. Наряду с этим необходимо отметить, что, согласно показателю IK_{50} , опухолевые клетки A549 обладают более высокой чувствительностью к летальному действию препарата по сравнению с нормальными клетками человека WI-26, для которых IK_{50} составляет 0.28 мкМ/мл (табл. 2).

Согласно общепринятым критериям оценки цитотоксического эффекта, лекарственное средство из нового класса соединений считается цитотоксически активным при значениях $IK_{50} \leq 10^{-4}$ М (0.1 мкМ/мл) [8, 12, 13].

В соответствии с этим критерием Б-ДНКЖ-АЦЦ следует отнести к агентам, обладающим слабо выраженным цитотоксическим действием как на опухолевые (рак легкого A549, рак молочной железы MCF-7), так и на нормальные (фибробласты кожи WI-26) клетки человека.

Для оценки роли лиганда в проявлении цитотоксического эффекта различных комплексов на основе биядерных динитрозильных комплексов железа представляется весьма информативным сопоставление показателя IK_{50} для препаратов, содержащих глутатион (Б-ДНКЖ-Г), меркаптосукцинат (Б-ДНКЖ-МС) и N-ацетилцистеин (Б-ДНКЖ-АЦЦ) в отношении культуры клеток опухоли человека MCF-7 (табл. 3).

Как видно, изученный в данной работе комплекс Б-ДНКЖ-АЦЦ, подобно ранее изученным

в работе [8] соединениям Б-ДНКЖ-МС и Б-ДНКЖ-Г, обладает слабо выраженным цитотоксическим эффектом в отношении культуры опухолевых клеток человека MCF-7. Так, показатель IK_{50} составляет для Б-ДНКЖ-АЦЦ 0.44 мкМ/мл, для Б-ДНКЖ-МС – 0.80 мкМ/мл и для Б-ДНКЖ-Г – 2.00 мкМ/мл соответственно (табл. 3).

В то же время испытанные соединения весьма эффективно ингибируют развитие солидных опухолей мышей *in vivo*. Так, Б-ДНКЖ-АЦЦ тормозит развитие аденокарциномы Акатол на 60% по сравнению с контролем, а Б-ДНКЖ-МС и Б-ДНКЖ-Г ингибируют рост карциномы легких Льюис на 65 и 90% соответственно (табл. 3).

Сопоставление цитотоксической и противоопухолевой активности трех комплексов Б-ДНКЖ, содержащих различные лиганды, свидетельствует об отсутствии корреляции между эффектами препаратов в условиях *in vitro* и *in vivo* (табл. 3). Так, цитотоксический эффект препаратов, согласно показателю IK_{50} , уменьшается в ряду Б-ДНКЖ-АЦЦ – Б-ДНКЖ-МС – Б-ДНКЖ-Г, в то время как противоопухолевый эффект, в соответствии с показателем TPO , возрастает в этой же последовательности (табл. 3).

Таким образом, полученные в данной работе результаты подтверждают сделанное нами ранее предположение о том, что противоопухолевый эффект препаратов на основе биядерных динитрозильных комплексов железа обусловлен не только их прямым цитотоксическим воздействием на опухолевые клетки, но и опосредованным влиянием доноров оксида азота на развитие опухоли, связанным с их способностью включаться в иммунокомпетентные клетки организма, обеспечивающие направленную доставку комплексов к опухолям [8].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица 3. Показатель цитотоксического эффекта и противоопухолевой активности для ряда соединений на основе биядерных комплексов железа в отношении культуры опухолевых клеток человека MCF-7 *in vitro* и солидных опухолей мышей *in vivo*

Препарат	IK_{50} , мкМ/мл	TPO , %
Б-ДНКЖ-АЦЦ	0.44	60 (аденокарцинома Акатол)
Б-ДНКЖ-МС	0.80	65 (карцинома Льюис)
Б-ДНКЖ-Г	2.00	90 (карцинома Льюис)

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. 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**, 591 (2017).
6. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **64** (6), 1216 (2019).
7. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и А. Ф. Ванин, *Биофизика* **66** (2), 259 (2021).
8. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **65** (5), 1009 (2020).
9. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 1236 (2010).
10. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 110 (2013).
11. A. F. Vanin “*Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms*”, Cambridge, UK, Cambridge Scholars Publishing (2019).
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., гл. 39 (2012), сс. 642–657.
13. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., *Биофизика* **64** (6), 1138 (2019).

Nitric Oxide Donors: Antitumor and Cytotoxic Effects of Binuclear Dinitrosyl Iron Complex with N-Acetylcysteine

A.F Vanin^{* **}, L.A. Ostrovskaya^{***}, D.B. Korman^{***}, E.I. Nekrasova^{***}, O.O. Riabaya^{****}, N.V. Bluhterova^{***}, V.A. Rykova^{***}, and M.M. Fomina^{***}

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

^{**}*Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia*

^{***}*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

^{****}*Blokhin National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia*

The antitumor activity and cytotoxic effect of binuclear dinitrosyl iron complexes with N-acetylcysteine were investigated within *in vivo* and *in vitro* models using mouse solid tumor (Akatol adenocarcinoma), human tumor cell cultures (human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (A549)) and normal human cells (skin fibroblast cell line WI-26). It was found that after intravenous and intraperitoneal delivery, the drug with these complexes inhibits Akatol tumor growth by 60% as compared to the control. The drug has a mild cytotoxic effect on both tumor and normal cells. The IC_{50} values for tumor cells MCF-7 and A549, and human skin fibroblasts are 0.12, 0.44 and 0.28 $\mu\text{M}/\text{ml}$ respectively. It is assumed that the antitumor effects of drugs with binuclear dinitrosyl iron complexes occurs not only due to their direct cytotoxic effect on tumor cells, but also due to the indirect influence of nitric oxide donors on tumor growth associated with their ability to be included in the immunocompetent cells of the body, providing directed delivery of complexes to tumors.

Keywords: binuclear dinitrosyl iron complex with N-acetylcysteine, antitumor activity, cytotoxic effect