

ГЕНО- И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С МЕРКАПТОСУКЦИНАТОМ НА КЛЕТКИ MCF-7

© 2022 г. В. А. Тронов¹, *, Н. А. Ткачев¹, Е. И. Некрасова², А. Ф. Ванин¹

¹Федеральный научный центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, 119991 Россия

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: vtronov@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.04.2022 г.

После доработки 31.05.2022 г.

Принята к публикации 03.06.2022 г.

Цитотоксическое действие динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ) с меркаптосукциноматом (МС) на опухолевые клетки человека MCF-7 в 2 раза выше цитотоксического эффекта смеси предшественников его синтеза (МС + Fe²⁺). Методом щелочных комет показано, что смесь (МС + Fe²⁺) индуцировала в клетках одонитевые разрывы (ОР) ДНК. Эти повреждения полностью репарировались спустя 24 ч. Хотя комплекс ДНКЖ-МС индуцировал в ДНК клеток меньше ОР, часть из них сохранялась нерепарированными в 19% клеток спустя 24 ч. Методом нейтральных комет показано, что эти разрывы являются двунитевыми (ДР) и локализованы в 17% клеток. Качественная корреляция генотоксичности по выходу нерепарированных ОР в ДНК с цитотоксичностью, определенной по МТТ-тесту, на клетках MCF-7 говорит о том, что токсичность динитрозильного комплекса по отношению к клеткам MCF-7 может быть частично ассоциирована с возникающими ДР в ДНК. Потенциально летальные ДР могут возникать в результате атаки клеточными эндонуклеазами одонитевых участков и АП-сайтов в ДНК, которые фомируются как интермедиаты механизма репарации NER, активируемого в ответ на появление в ДНК сложных аддуктов оснований под действием ДНКЖ-МС.

Ключевые слова: клетки MCF-7, динитрозильный комплекс железа, повреждение ДНК, репарация, цитотоксичность, метод комет

DOI: 10.31857/S0041377122050091

Известны заболевания, ассоциированные с дефицитом оксида азота в тканях больных. К ним относятся сахарный диабет (Giacco, Brownlee 2010; Du et al., 2001), гипертоническая болезнь (Tögök, 2008), глаукома (Reina-Torres et al., 2021), эндометриоз (Burgova et al., 2019), онкологические заболевания (Carmeliet, Jain, 2011; Huang, et al., 2017). В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что синтетические динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), обеспечивая доставку NO в ткани, открывают возможность терапии таких заболеваний и (или) снижают их патологические проявления (Wu et al., 2016; Kelsey, 2014). В экспериментах на крысах химические доноры оксида азота оказывали нейропротекторное действие при ишемическом инсульте (Godínez-Rubí, 2013). Ранее на клетках аденокарциномы человека MCF-7 мы показали, что цитотоксический эффект синтетического комплекса ДНКЖ-

МС опосредован ионом нитрозония (NO⁺), высвобождающимся при распаде комплекса в клетках (Vanin et al., 2021). Цитотоксический эффект выразился в виде апоптоза, который регистрировали спустя 24 ч после добавления комплекса к клеткам. В этой же работе было показано, что время полужизни комплекса ДНКЖ-МС в водной среде при комнатной температуре составляет 2 ч. Этот факт ставит вопрос о связи цитотоксического эффекта с самим комплексом или с продуктами его распада в клетке (Vanin et al., 2021).

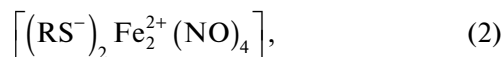
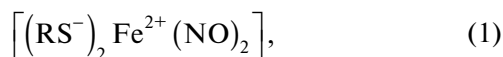
В настоящей работе мы, используя метод ДНК-комет, оценили гено- и цитотоксическое действие комплекса ДНКЖ-МС и смеси предшественников его синтеза – МС и ферросульфата (FeSO₄) – на клетки MCF-7, а также их влияние на репарацию ДНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

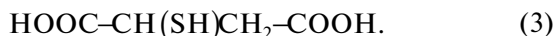
Синтез ДНКЖ-МС. Динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ) с меркаптосукциноматом (МС) (ДНКЖ-МС) синтезирован из ферросульфата и МС по разработанному нами протоколу (Vanin et al.,

Принятые сокращения: АП-сайты – апуриновые и апириимидиновые сайты; ДР – двунитевые разрывы; ДНКЖ – динитрозильный комплекс железа; МС – меркаптосукциномат; ОР – одонитевые разрывы; ЩЛС – щелочелабильные сайты; BER – эксцизионная репарация оснований; NER – эксцизионная репарация нуклеотидов; NO – оксид азота.

2021). В водном растворе ДНКЖ-МС присутствует в мономерной (1) и бидерной (2) формах:



где (RS^-) – тиол-содержащий лиганд, в данной работе RS^- – МС (3):



Образование стабильного комплекса ДНКЖ-МС регистрировали спектрофотометрически. Концентрацию комплекса определяли по оптической плотности на длине волны 360 нм, исходя из коэффициента экстинкции $3700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на один атом железа (Vanin et al., 2011). Следует отметить, что в экспериментах с использованием эквимольной смеси (МС + Fe^{2+}) концентрация компонентов этой смеси не превышала 0.3 мМ. При большей их концентрации, особенно при щелочном варианте метода ДНК-комет, ионы железа в заметном количестве включались в водонерастворимые гидроокисные комплексы $(\text{FeOH})_n$, затруднявшие визуализацию комет и искажавшие результаты.

Культура клеток. Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 были получены из коллекции лаборатории экспериментальной терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва). Клетки культивировали в атмосфере 5% CO_2 при 37°C в среде DMEM (ThermoFisherScientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина и 10 Ед/мл смеси пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия).

Оценка цитотоксичности. Цитотоксичность ДНКЖ-МС и эквимольной смеси компонентов комплекса (МС + Fe^{2+}) оценивали по снижению жизнеспособности клеток MCF-7 после воздействия препаратов. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. Клеточную суспензию в культуральной среде ($\sim 10^5$ кл./0.2 мл) вносили в лунку 96-луночного планшета. Спустя 24 ч (время адаптации и прикрепления клеток), в каждую лунку добавляли раствор тестируемых соединений в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS) в различном разведении (не более 0.1 общего объема в лунке). Клетки культивировали 48 ч в CO_2 -инкубаторе при 37°C, после чего в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора МТТ-реагента (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5 дифенил тетразолия бромид) (AppliChem, Германия), до конечной концентрации в лунке 0.5 мг/мл. Клетки продолжали культивировать в присутствии МТТ-реагента 3 ч, затем отбирали среду и к оставшимся в лунках клеткам добавляли по 200 мкл ДМСО, растворяющего кристаллы формазана (37°C, 10 мин со встряхиванием). С помощью анализатора MultiscfnFC (ThermoScientific, США) измеряли оптическую плотность раствора формазана

на в лунке (при длине волны 570 нм), которая прямо пропорциональна количеству жизнеспособных клеток. В каждом эксперименте контрольные и экспериментальные лунки в планшетах повторялись 4-кратно.

Оценка генотоксичности методом комет. Использовали щелочной и нейтральный варианты метода комет (Olive, Vanath, 2006) с некоторыми модификациями (Тронов, Некрасова, 2020). Их сочетание позволяет определять в разрывы в ДНК однонитевые (ОР), двунитевые (ДР), щелочелабильные сайты (ЩЛС) и строго их дискриминировать. Клетки ($3 \times 10^5/0.3\text{мл}$) высевали в 6-луночные плашки для культивирования в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 для адгезии клеток на дно лунок. К прикрепленным клеткам добавляли тестируемые соединения, предварительно растворенные в культуральной среде до требуемой концентрации. Время совместного культивирования составляло 5 ч (время максимальной генотоксичности) и 24 ч (время эффективной репарации повреждений ДНК в клетках). По завершении совместного культивирования клетки снимали с подложки трипсинизацией, промывали холодным PBS, ресуспендировали в телячьей сыворотке, содержащей 10% ДМСО, разливали на аликвоты и замораживали в жидком азоте. Замороженные аликвоты хранили при -70°C . Размороженную суспензию клеток центрифугировали (400 g, 5 мин). Осадок суспендировали в 0.7%-ном растворе легкоплавкой агарозы (тип IV, Sigma) в PBS (ПанЭко, Россия). Из суспензии готовили слайд на предметном стекле по стандартной процедуре метода комет (Тронов и др., 2012). Стекла с застывшим гелем погружали в нейтральный лизирующий раствор: 0.5 М Na_2EDTA , 2% Na-лауроилсаркозила, 0.3 мг/мл протеиназы К, pH 8, 37°C. После лизиса в течение 12–14 ч слайды либо подвергали нейтральному электрофорезу в ТАЕ-буфере pH 8 (0.8 В/см, 24 мин, 8°C), либо погружали в щелочной диссоциирующий раствор (1.2 М NaCl, 100 мМ Na_2EDTA , 0.1% Na-лаурилсаркозината, 0.26 М NaOH, pH > 13) на 1 ч, при 8°C. В этих условиях хроматин диссоциирует, а ДНК расплетается в области разрывов, вызванных как тестируемыми агентами, так и под действием репарирующих ферментов клетки. Процедура завершалась погружением слайдов в электрофоретический буфер (0.03 М NaOH, 2 мМ Na_2EDTA , pH ~ 12.3, 8°C, 1 ч). Электрофорез проводили в горизонтальной камере при 8°C в течение 25 мин и напряжении 0.8 В/см. После электрофореза слайды трижды по 5 мин ополаскивали нейтрализующим раствором (0.4 М Tris-HCl, pH 7.5), сушили на воздухе и дегидратировали в метаноле. Слайды окрашивали раствором ДНК-интеркалирующего красителя SYBR GreenI (Sigma), 2–4 мкг/мл в антифейде (20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 20 мг/мл DABCO, 60% глицерина). Визуализацию комет осуществляли на флуоресцентном микроскопе МИКМЕД-2 (АО ЛОМО, Россия). Повреждение

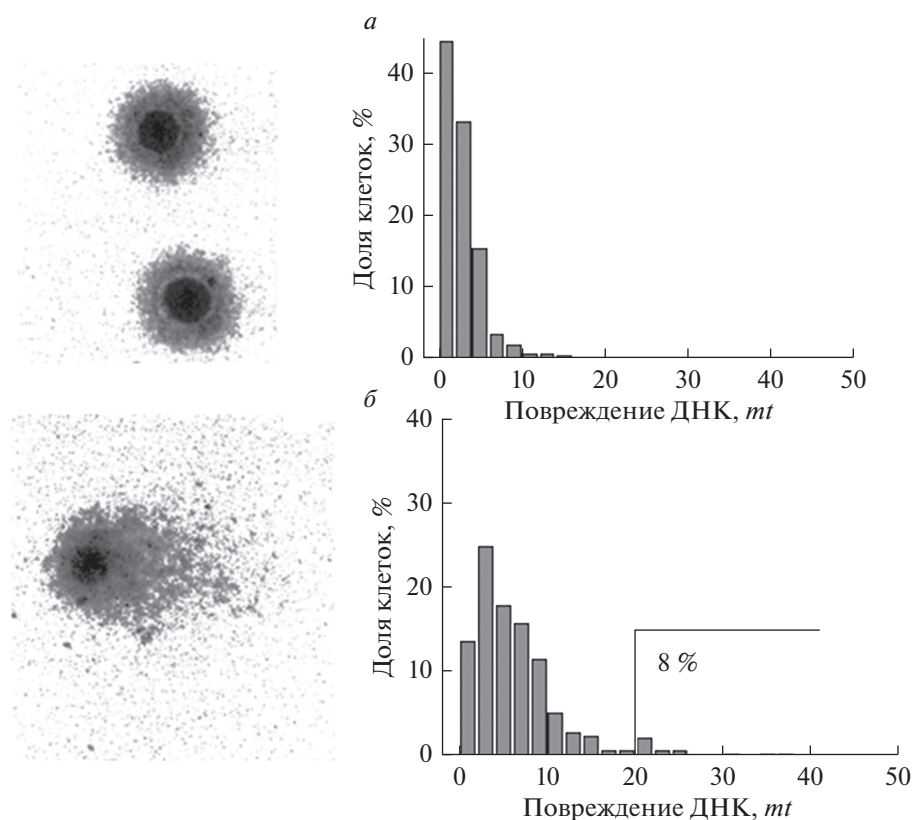


Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии щелочных ДНК-комет из интактных (а) и обработанных комплексом ДНКЖ-МС (б) клеток MCF-7, а также гистограммы распределения клеток по поврежденности ДНК в них. Показатель цитотоксичности (mt) представлен как доля клеток (комет) с высокой поврежденностью ДНК, для которых $mt \geq 20$ (8%, б).

ДНК анализировали по изображениям ДНК-комет, используя программу CASP 1.2.2, оценивали повреждение по моменту хвоста комет mt (Койса et al., 2003).

Репрезентация результатов и статистика. Полученные данные представляли в виде распределений комет по параметру mt (рис. 1а, б), из которых находили усредненную поврежденность ДНК в клетках (генотоксичность, $mt \pm SD$) и mt -цитотоксичность. Используемый в работе показатель mt -цитотоксичность определяли через 24 ч культивирования, в течение которой протекала и в основном завершалась репарация ДНК. Сохранившиеся к этому времени повреждения ДНК с большой вероятностью индуцировали в делящихся клетках апоптоз, т.е., прямо или опосредованно были связаны с жизнеспособностью клеток. Параметр mt -цитотоксичность представляет собой долю клеток/комет с высокой поврежденностью ДНК для щелочных ($mt \geq 20$) и для нейтральных ($mt \geq 10$) комет. Эти значения mt приняты в качестве пороговых для оценки mt -цитотоксичности, поскольку в распределениях по mt интактных клеток более 95% комет имели значение mt ниже этих значений для щелочных и нейтральных условий электрофореза соответственно (рис. 1а, б). Эксперименты проводили независимо и повторяли трижды;

результаты представлены средними значениями и их стандартными отклонениями (SD); сравнение экспериментальных распределений осуществлялось с помощью непараметрической статистики Колмогорова–Смирнова, считая различия достоверными при $P < 0.05$. Все статистические расчеты проведены с помощью программного обеспечения OriginPro 8.1. (Originlab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксичность комплекса ДНКЖ-МС и смеси предшественников его синтеза. Для сравнения цитотоксичностей комплекса ДНКЖ-МС и смеси предшественников его синтеза (МС + Fe^{2+}) мы выравняли их концентрации по Fe^{2+} , полагая, что на 1 моль ДНКЖ-МС приходится 1 моль Fe^{2+} , связанного с комплексом. Кроме того, в отличие от свободного Fe^{2+} , способного вступать в реакцию Фентона, цитотоксичность МС в исследуемом диапазоне концентраций близка к нулю.

Рис. 2 демонстрирует жизнеспособность клеток MCF-7 (определенной по МТТ-тесту) после культивирования их в течение 48 ч с различными концентрациями комплекса ДНКЖ-МС и эквимольной

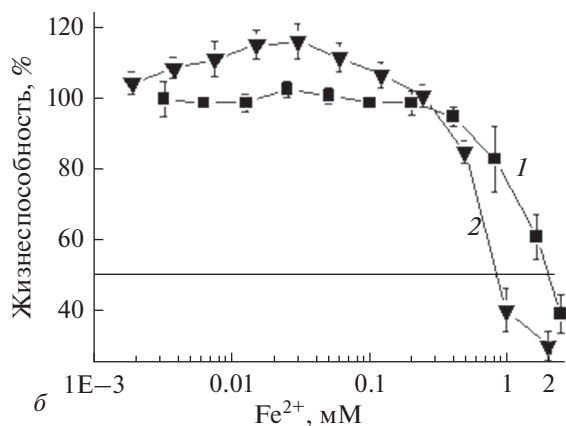


Рис. 2. Дозозависимая жизнеспособность клеток МСF-7 через 48-ч культивирования с эквимолярной смесью меркаптосукцината (МС) с Fe^{2+} (кривая 1) и с комплексом ДНКЖ-МС (кривая 2). Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. По вертикали: доля живых клеток, %.

смеси предшественников его синтеза — (МС + Fe^{2+}). Два факта, наблюдаемые на рисунке, обращают на себя внимание: дозозависимое увеличение жизнеспособности клеток в диапазоне концентраций комплекса ДНКЖ-МС 0–40 мкМ и более чем 2-кратное увеличение цитотоксичности комплекса по сравнению с цитотоксичностью смеси (МС + Fe^{2+}) — значение концентрации, при которой гибнет половина клеточной популяции (IC_{50}), составляет 0.85 мМ против 2.0 мМ соответственно.

Первый факт полностью соответствует общепризнанной точке зрения, согласно которой при различных концентрациях оксида азота (его химических доноров) проявляются различные физиологические функции NO (Khan et al., 2020). На опухолевых клетках показано, что в диапазоне средних концентраций NO, создаваемых донорами NO в клетке (100–350 мкМ) наблюдается генетическая нестабильность, репарация ДНК, снижение апоптоза (Yakovlev, 2013; Huerta, 2008). Эти реакции соответствуют клеточному адаптивному ответу, который включает в себя возрастание пролиферации, что демонстрирует рис. 2 (кривая 2). В ответ на более высокие концентрации NO (500–1000 мкМ) увеличивается повреждение ДНК, активируется АТМ/ATR-сигналинг, фосфорилирующий белок p53, который тормозит пролиферацию и активирует апоптоз (Yakovlev et al., 2010). Что касается второго факта, то поскольку цито- и генотоксичность смеси (МС + Fe^{2+}) в большой степени обусловлена свободным Fe^{2+} , включение его в комплекс ДНКЖ уводит его из токсического эффекта комплекса.

На циркулярной ДНК плазмиды показано (Lewandowska et al., 2015), что включение железа в комплекс ДНКЖ предотвращает реакцию Фентона и тем самым защищает ДНК плазмиды от деградации

под действием окислительного стресса. Полученный нами результат (рис. 2) на первый взгляд противоречит результатам этой работы. Поэтому мы оценили генотоксический эффект этих соединений в клетках МСF-7, т.е. их способность индуцировать повреждения ДНК. Эти повреждения могут возникать как под действием продуктов распада комплекса ДНКЖ (NO , NO^+ и свободного Fe^{2+}), так и в результате активации процессов репарации в ответ на повреждение ДНК (разрывы и апуриновые и апириимидиновые сайты (АП) сайты), которые в щелочных условиях лизиса клеток трансформируются в разрывы).

Влияние комплекса ДНКЖ-МС и его компонентов на ДНК и ее репарацию.

В отличие от результатов по параметру цитотоксичности с помощью МТТ-теста (рис. 2), наш результат по генотоксичности клеток МСF-7 через 5 ч совпадает с данными по повреждению ДНК *in vitro*, полученными в упомянутой выше работе (Lewandowska et al., 2015): *mt*-генотоксичность свободного железа выше таковой комплекса (рис. 3а). Однако культивирование клеток в присутствии агентов в течение 24 ч, помимо того, что снижает дозовые зависимости, но и меняет их места: повреждения, индуцированные смесью (МС + Fe^{2+}), практически полностью репарируются (рис. 3б); в случае с комплексом к 24 ч, как видно, сохраняются нерепарированные повреждения в субпопуляции клеток, составляющей 19%. В клетках, обработанных смесью (МС + Fe^{2+}), объем такой субпопуляции составляет 6% от общей численности клеток в распределении (более 400 клеток). Рис. 4 наглядно демонстрирует это и достоверную разницу между *mt*-распределениями сравниваемых популяций клеток через 24 ч обработки агентами. Различия между распределениями достоверны при уровне значимости $P < 0.05$ (статистика Колмогорова–Смирнова). Как видно, *mt*-цитотоксичности смеси МС + Fe^{2+} 0.3 мМ и комплекса ДНКЖ-МС, 1 мМ, найденные из полученных распределений, составляют 6 (рис. 4а) и 19% (рис. 4б) соответственно. Рис. 5 представляет объединенный результаты оценки цитотоксичности по МТТ-тесту и *mt*-распределению клеток, культивируемых с тестируемыми агентами 48 и 24 ч соответственно. Цитотоксичность комплекса, более высокая по результатам МТТ-теста, по сравнению с оценкой этого параметра по моменту хвоста комет *mt*. Это может быть связано с более длительным культивированием клеток с агентами при МТТ-тестировании.

Следует подчеркнуть, что представленная на рис. 5 цитотоксичность, определенная по значениям *mt* (черные столбики) базируется на измерении разрывов ДНК через 24 ч, которые включают в себя ОР, ДР и ШЛС в ДНК. Но известно, что ОР является наиболее частым и легкоустраняемым дефектом в

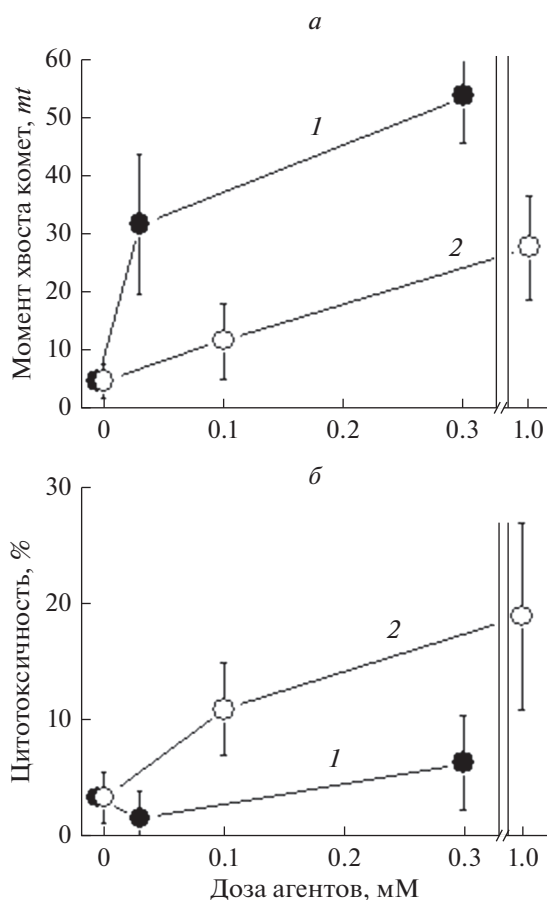


Рис. 3. Генотоксичность через 5 ч (а) и цитотоксичность через 24 ч (б) действия смеси (МС + Fe²⁺) (кривая 1) и комплекса ДНКЖ-МС (кривая 2) на клетки MCF-7. Генотоксичность, *mt*, определяли как среднюю поврежденность ДНК в клетке через 5 ч обработки агентами. Цитотоксичность оценивали как долю клеток (%) с поврежденной ДНК через 24 ч обработки агентами.

геноме клетки, а потому сам по себе не является летальным. Стало быть, длительное его пребывание в клетке может быть связано либо с NO-иницированной инактивацией ферментов репарации, либо с тем, что он представляет собой потенциально летальный ДР, обуславливающий цитотоксический эффект (Roos, Kaina, 2012). Поэтому мы провели проверку клеток MCF7, обработанных агентами в течение 24 ч, на наличие в их ДНК двуниевых разрывов, используя для этого метод нейтральных ДНК-комет. Результат суммирован в табл. 1 в виде распределения клеток по повреждению ДНК. Каждое из 3-х представленных в таблице распределений получено путем объединения результатов 3–4-х независимых экспериментов.

Из табл. 1 видно, что 24-часовая обработка клеток смесью предшественников комплекса практически не оставляет в клеточной ДНК двуниевых разрывов: вид распределения и средние показатели поврежденности клеток не отличаются от таковых для ин-

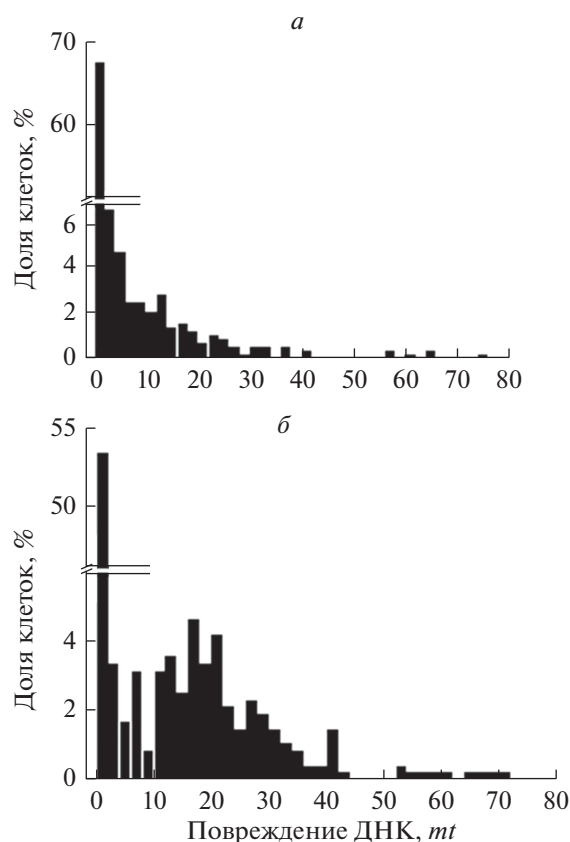


Рис. 4. Гистограммы распределений MCF-7 клеток по повреждению ДНК (по показателю *mt*) после воздействия в течение 24 ч 0.3 мМ смеси (МС + Fe²⁺) (а) и 1 мМ комплекса ДНКЖ-МС (б). Цитотоксичность смеси и комплекса составляет 6 и 19% соответственно (число клеток в каждом распределении более 400). Гистограммы построены по результатам 3–4 экспериментов.

тактных клеток. Комплекс ДНКЖ-МС через 24 ч оставляет существенные повреждения в ДНК в виде двуниевых разрывов. Эти разрывы локализованы в 17% клеток, и их число практически совпадает со значением цитотоксичности (19%), найденной в аналогичных экспериментах со щелочными кометами (рис. 4)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

NO включен во многие внутри- и межклеточные сигнальные пути, регулирующие физиологические процессы клетки. В то же время, в силу высокой реакционной способности, NO повреждает ДНК в клетке, вызывая модификацию оснований (дезаминирование, окисление), формирование апуриновых и апиримидиновых сайтов, разрывы цепей ДНК, внутри- и межклеточные сшивки (см. обзоры: Szabo, Ohshima, 1997; Burney et al., 1999). Как следствие таких повреждений, продемонстрирован мутагенный эффект NO на культивируемых лимфоцитах человека ТК6 по выходу мутаций в репортерных ге-

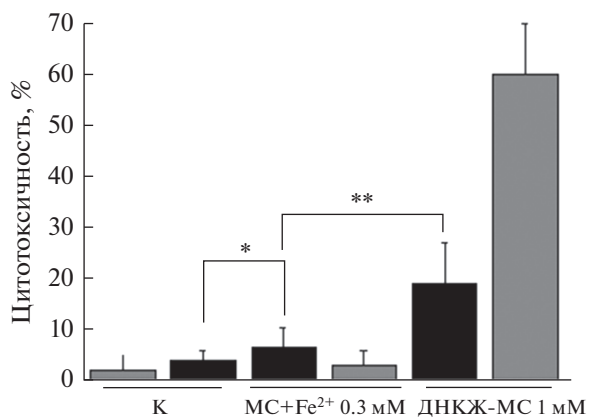


Рис. 5. Цитотоксичность комплекса ДНКЖ-МС (1 мМ) и 0.3 мМ смеси (МС + Fe²⁺), оцененная по *mt*-распределению (черные столбики) и МТТ-тесту (серые столбики) клеток МСF-7; * различия недостоверны, ** различия статистически достоверны при $P < 0.05$ (см. рис. 4).

нах *HPRT* и *TK* (Nguyen et al., 1992): частота NO-индуцированных мутаций в 15–18 раз превышала частоту спонтанного мутирования этих локусов.

В другой работе (Tamir et al., 1996) в качестве мишени для NO использовали кольцевую суперскрученную ДНК плазмиды *in vitro*. Оказалось, что во внеклеточной среде NO-обработанная ДНК плазмиды не подвергалась никированию, т.е. не содержала разрывов. Но после трансфекции NO-обработанной плазмиды в клетки CHO плазида подвергалась никированию (релаксации). Другими словами, при наличии активной системы репарации в клетке в NO-поврежденной ДНК появляются разрывы. Эти результаты говорят о том, что первичным повреждением ДНК под действием NO[•] является безразрывное дезаминирование пуринов в ксантин и гипоксантин, которые либо подвергаются спонтанной депуринизации, либо активно удаляются гликозилазами, гидролизующими N-гликозидную связь между химически модифицированным основанием и дезоксирибозой. В обоих случаях удаление основания оставляет безразрывный пропуск в виде апуринового и апириимидинового (АП) сайта. АП-сайт является субстратом для АП-эндонуклеазы 1, которая гидролизует в нем фосфодиэфирную связь, формируя разрыв цепи ДНК с 3'ОН- и 5'dRP-концами. Далее ДНК-полимераза β удаляет 5'dRP-конец разрыва и на его место присоединяет один нуклеотид, комплементарный противоположному нуклеотиду, тем самым заполняя пробел в АП-сайте. ДНК-лигазы I или III завершают процесс восстановления целостности ДНК по механизму BER. Следует отметить, что АП-сайт сам по себе не является разрывом в цепи ДНК, но гидролизует при щелочном pH и потому относится к группе повреждений, называемых ЩЛС.

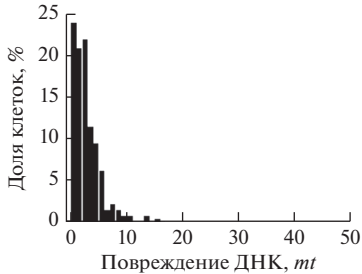
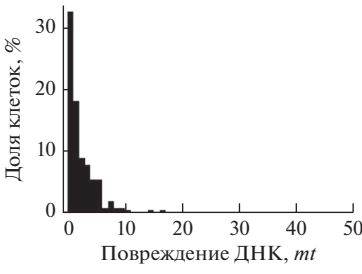
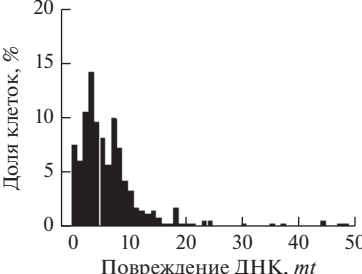
В случае действия смеси (МС + Fe²⁺) протекает реакция Фентона со свободным Fe²⁺, в результате которой либо окисляются основания, либо гидролизуются фосфодиэфирная связь в цепи ДНК. В обоих случаях активируется механизм BER, который удаляет и поврежденные основания, и однонитевые разрывы, как это показано на рис. 5 (различие с контролем статистически не достоверно).

В отличие от разрывов под действием смеси (МС + Fe²⁺), разрывы, возникшие в ответ на обработку клеток комплексом ДНКЖ-МС, репарируются медленнее, и через 24 ч наблюдается заметная доля клеток, сохраняющих высокий уровень повреждений в ДНК (рис. 5). Отсутствие репарации разрывов ДНК в NO-обработанных лимфоцитах человека отмечали ранее другие авторы (Nguyen et al., 1992). Наши опыты с нейтральными ДНК-кометами показали, что эти разрывы скорее всего являются двунитевыми. В пользу этого предположения говорит тот факт, что доли клеток, имеющих в ДНК однонитевые и двунитевые разрывы, оцененные методами щелочных и нейтральных ДНК-комет, почти совпадают – 19 и 17% соответственно (рис. 4б и табл. 1). Это совпадение говорит о том, что возможно ДР появились на месте ОР в результате атаки однонитевого участка клеточной эндонуклеазой.

Такое событие вполне вероятно в ходе репарации сложных аддуктов оснований. Показано, что такие аддукты образуются в результате прямой атаки ДНК азотистым ангидридом N₂O₃ (Tannenbaum et al., 1994), который, в свою очередь, накапливается в клетке в результате реакции оксида азота с молекулярным кислородом (Lewis et al., 1995). Взаимодействие N₂O₃ с гуанином приводит к дезаминированию с образованием диазониового катиона. Если таковые соседствуют в ДНК, то образуется межспиральный димер (сшивка) (Burney et al., 1999). Репарация таких аддуктов в клетке осуществляется механизмом NER (nucleotide excision repair). Важной особенностью NER является то, что размер выщепляемого участка ДНК, содержащего аддукт, у клеток млекопитающих составляет ~30 нуклеотидов (Shivji, 1995) (в механизме BER он ≤3 нуклеотидов в случае репарации АП-сайта и ОР, и не превышает 10 при репарации окси-модифицированных оснований).

Кроме того, обширное повреждение ДНК чревато разбалансировкой этапов репарационного процесса (Тронов, Некрасова, 2020). К рассогласованию этапов репарации может приводить и NO-индуцированная пост-трансляционная модификация белков NER, снижающая их активность и эффективность репарации в целом, (Graziewicz et al., 1996; Jaiswal et al., 2001). Именно с этим связан результат работы, в которой показано, что арсенит, экзогенный донор NO и пероксинитрита, увеличивал продукцию NO и одновременно с этим наблюдали подавление NER-эксцизии аддуктов ДНК в фибробластах человека, индуцированных УФ-излучением, диспла-

Таблица 1. Поврежденность двунитевой ДНК (днДНК) в клетках MCF-7 в ответ на воздействие 0.3 мМ смеси (МС + Fe²⁺) и 1 мМ комплекса ДНКЖ-МС в течение 24 ч

Обработка клеток	Распределение клеток по повреждению двунитевой ДНК, <i>mt</i>	Параметры распределения		
		N	$\langle mt \rangle \pm SD$	ЦТ, %
– (Интактные)		299	2.7 ± 2.4	2.3
(МС + Fe ²⁺) 0.3 мМ, 24 ч		281	2.2 ± 2.5	1
(ДНКЖ-МС) 1 мМ, 24 ч		332	8.2 ± 14	17

Примечание. N – число клеток, входящих в распределение; $\langle mt \rangle$ – средняя поврежденность двунитевой ДНК, найденная из распределения; ЦТ – цитотоксичность – доля клеток (%) с высокой поврежденностью ДНК ($mt > 10$).

тином, митомицином и бензопиреном (Chien, 2004). В механизм NER у млекопитающих вовлекаются более 30 различных белков, которые являются мишенью для NO-опосредованной модификации.

Таким образом, в результате незавершенной репарации увеличивается время существования таких интермедиатов процесса NER, как АП-сайты и протяженные одонитевые участки в ДНК-дуплексе; будучи атакованы эндонуклеазами, они переходят в двунитевые разрывы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетного финансирования Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с участием животных или людей в качестве объектов не проводились.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.А. Тронов: экспериментальная разработка идеи, планирование и проведение экспериментов, написание текста; Н.А. Ткачев: репрезентация результатов, статистика; Е.И. Некрасова: культивирование клеток, микроскопия, обсчет результатов измерений; А.Ф. Ванин: идея, планирование эксперимента, написание текста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Тронов В.А., Виноградова Ю.В., Поплинская В.А., Островский М.А. 2012. Механизмы радиорезистентности терминально дифференцированных клеток зрелой сетчатки глаза. Цитология. Т. 54. С. 261. (Tronov V.A., Vinogradova U.V., Loginova M.U., Poplinskaya V.A., Ostrovsky M.A. 2012. Mechanisms of radioresistance in terminally differentiated cells of mature retina. Cell Tiss. Biol. V. 6. P. 219.)
- Тронов В.А., Некрасова Е.И. 2020. Повреждение ДНК и белок P53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевины. Биофизика. Т. 65. С. 543. (Tronov V.A., Nekrasova E.I. 2020. DNA Damage and p53 restrict proliferation of Muller cells in mouse retina in response to the influence of *n*-methyl-*n*-nitrosourea. Biophysics (Russ.).)
- Burgova E.N., Khristidis Y.I., Kurkov A.V., Mikoyan V.D., Shekhter A.B., Adamyan L.V., Timashev P.S., Vanin A.F. 2019. The inhibiting effect of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands on the growth of endometrioid tumours in rats with experimental endometriosis. Cell Biochem. Biophys. V. 77. P. 69.
- Burney S., Caulfield J.L., Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxy nitrite. Mutat. Res. V. 424. P. 37.
- Carmeliet P., Jain R.K. 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. Nat. Rev. Drug Discov. V. 10. P. 417.
- Chien Y.-H., Bau D.-T., Jan K.-Y. 2004. Nitric Oxide inhibits DNA-adducts excision in nucleotide excision repair. Free Rad. Biol. Med. V. 36. P. 1011.
- Du X.L., Edelstein D., Dimmeler S., Ju Q., Sui C., Brownlee M. 2001. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. J. Clin. Invest. V. 108. P. 1341.
- Giacco F., Brownlee M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. Circ. Res. V. 107. P. 1058.
- Godínez-Rubí M., Rojas-Mayorquín A.E., Ortuño-Sahagún D. 2013. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. Oxid. Med. Cell. Long. Article ID 297357. <https://doi.org/10.1155/2013/297357>
- Graziewicz M., Wink D.A., Laval F. 1996. Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: Potential mechanisms for NO-mediated DNA damage. Carcinogenesis. V. 17. P. 2501.
- Huang Z., Fu J., Zhang Y. 2017. Nitric oxide donor-based cancer therapy: Advances and prospects. J. Med. Chem. V. 60. P. 7617.
- Huerta S., Chilka S., Bonavida B. 2008. Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics (review). Int. J. Oncol. V. 33. P. 909.
- Jaiswal M., LaRusso N.F., Shapiro R.A., Billiar T.R., Gores G.J. 2001. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. Gastroenterol. V. 120. P. 190.
- Kelsey M.S., Kwon M.-Y., Chung S.W., Kim E. 2014. Coordination-triggered NO release from a dinitrosyl iron complex leads to anti-inflammatory activity. Chem. Sci. V. 5. P. 2374.
- Khan F.H., Deryan E., Bhattacharyya D.D., McAuli J.D., Miranda K.M., Glynn S.A. 2020. The role of nitric oxide in cancer: master regulator or NOT? Int. J. Mol. Sci. V. 21. P. 9393. <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9393>
- Końca K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Goźdz, S., Koza Z. Wojcik, A. 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. Mutat. Res. V. 534. P. 15.
- Lewandowska H., Sadło J., Męczyńska S., Stepkowski T.M., Wójciuk G., Kruszewski M. 2015. Formation of glutathionyl dinitrosyl iron complexes protects against iron genotoxicity. Dalton Trans. V. 44. P. 12640.
- Lewis R.S., Tannenbaum S.R., Deen W.M. 1995. Kinetics of *N*-nitrosation in oxygenated nitric oxide solutions at physiological pH: role of nitrous anhydride and effects of phosphate and chloride. J. Am. Chem. Soc. V. 117. P. 3933.
- Nguyen T., Brunson D., Crespi C. L., Penman B.W., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 89. P. 3030.
- Olive P.L., Banath J.P. 2006. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. Nature Protocol. V. 1. P. 23.
- Reina-Torres E., De Ieso M.L., Pasquale L.R., Madekurozwa M., van Batenburg-Sherwood J., Overby D.R., Stamer W.D. 2021. The vital role for nitric oxide in intraocular pressure homeostasis. Prog. Retin Eye Res. V. 83. P. 1.
- Roos W.P., Kaina B. 2012. DNA damage-induced apoptosis: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. Cancer Letters. V. 332. P. 237. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>
- Shivji M.K., Podust V.N., Hubscher U., Wood R.D. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. 1995. Biochemistry. V. 34. P. 5011.
- Szabo C., Ohshima H. 1997. DNA damage induced by peroxynitrite: Subsequent biological effects, nitric oxide: Biol. Chem. V. 1. P. 373.
- Tamir S., Burney S., Tannenbaum S.R. 1996. DNA damage by nitric oxide. Chem. Res. Toxicol. V. 9. P. 821.
- Tannenbaum S.R., Tamir S., deRojas-Walker T., Wishnok J.S. 1994. DNA damage and cytotoxicity by nitric oxide. In: Nitrosamines and related *n*-nitroso compounds. Washington: American Chemical Society. V. 10. P. 120.
- Török J. 2008. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. Physiol. Res. V. 57. P. 813.
- Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Burbaev D.Sh. 2011. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione: electron paramagnetic resonance and optical studies. Nitric Oxide – Biol. Chem. V. 23. P. 136.
- Vanin A.F., Tronov V.A., Borodulin R.R. 2021. Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF7 human breast cancer cell culture). Cell Biochem. Biophys. V. 7. P. 93.
- Wu S.C., Lu C.Y., Chen Y.L., Lo F.C., Wang T.Y., Chen Y.J., Yuan S.S., Liaw W.F., Wang Y.M. 2016. Water-soluble dinitrosyl iron complex (DNIC): A nitric oxide vehicle triggering cancer cell Death via apoptosis. Inorg. Chem. V. 55. P. 9383.
- Yakovlev V.A. 2013. Nitric oxide-dependent down regulation of *BRCA1* expression promotes genetic instability. Cancer Res. V. 73. P. 706.
- Yakovlev V.A., Bayden A.S., Graves P.R., Kellogg G.E., Mikkelsen R.B. 2010. Nitration of the tumor suppressor protein p53 at tyrosine 327 promotes p53 oligomerization and activation. Biochemistry. V. 49. P. 5331.

Cytotoxicity and Genotoxicity of Dinitrosyl Iron Complex with Mercaptosuccinate in MCF-7 Cell Line Assessed Using Comet Assay

V. A. Tronov^{a,*}, N. A. Tkachev^a, E. I. Nekrasova^b, and A. F. Vanin^a

^a*Semenov Federal Research Centre of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^b*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: vtronov@yandex.ru*

Cytotoxic effect of dinitrosyl iron complex with mercaptosuccinate (DNIC-MS) in human tumor cells MCF-7 was 2-fold higher compared to cytotoxicity of mixture of precursors (MS + Fe²⁺) for the complex synthesis *in vitro*. Using alkaline comet assay we show that the mixture induced DNA single-strand breaks (SSBs) in MCF-7 cells. SSBs were repaired completely by 24h. Although the complex induced less number of SSBs compared with the mixture, they remained in 19% of the cells by 24 h after the treatment. We found by neutral comet assay that these DNA lesions are double-strand breaks (DSBs). The qualitative correlation between genotoxicity by yield of unrepaired DNA SSBs and MTT-cytotoxicity indicates that cytotoxicity of dinitrosyl iron complex may be, in part, associated with DSBs induced in DNA. Potentially lethal DSBs could be formed as a result of cellular endonucleases attack on single strand sites and AP-sites in DNA that produced as intermediates by the nucleotide excision repair (NER) of base adducts initiated by the DNIC-MS complex.

Keywords: human cells MCF-7, dinitrosyl iron complex, DNA damage, DNA repair, cytotoxicity, comet assay