

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ ЛИГАНДА НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ БИЯДЕРНЫХ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

© 2020 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, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

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

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

****Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 23.06.2020 г.

После доработки 23.06.2020 г.

Принята к публикации 29.06.2020 г.

Проведено изучение влияния природы лиганда на ростиингибирующий и цитотоксический эффект генерирующих оксид азота соединений — биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих глутатион и меркаптосукцинат, — в условиях *in vivo* и *in vitro*. Установлена преимущественная противоопухолевая активность комплексов с глутатионом по сравнению с комплексами с меркаптосукцинатом, ингибирующих развитие опухоли (карцинома легких Льюис) на 90 и 65% по сравнению с контролем соответственно. Обнаружено, что препараты обладают слабо выраженным цитотоксическим эффектом в отношении культуры клеток опухоли человека MCF7. Расчетная концентрация, вызывающая гибель 50% клеток ($ИК_{50}$), составляет для комплексов с меркаптосукцинатом 0.8 мкмоль/мл (640 мкг/мл), а для комплексов с глутатионом значение $ИК_{50}$ превышает 2 мкмоль/мл (1600 мкг/мл). Предполагается, что противоопухолевое действие исследованных комплексов железа в значительной степени определяется их способностью включаться в иммунокомпетентные клетки, обеспечивающих направленную доставку комплексов к опухолям.

Ключевые слова: биядерные динитрозильные комплексы железа, противоопухолевая активность *in vivo*, карцинома легких Льюис, цитотоксический эффект *in vitro*, культура клеток опухоли человека MCF7.

DOI: 10.31857/S0006302920050191

Ранее нами было обнаружено, что генерирующие оксид азота соединения, такие как моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), содержащие различные лиганды, а также S-нитрозоглутатион, обладают способностью ингибировать развитие ряда солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарциномы Акатол и Са-755). Противоопухолевый эффект изученных препаратов проявлялся при их введении как внутрибрюшинно, так и внутривенно и колебался в пределах от 60 до 90% торможения роста опухоли, изменяясь в зависи-

мости от дозового режима, схемы применения, времени оценки эффекта и природы опухолевого штамма [1–6].

В продолжение данного направления работ нами с целью выявления оптимальных подходов для дальнейшего исследования доноров оксида азота в качестве противоопухолевых агентов проведено изучение влияния природы лиганда на ростиингибирующий и цитотоксический эффект биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих глутатион (ДНКЖ-Г) и меркаптосукцинат (ДНКЖ-МС) условиях *in vivo* и *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. В экспериментах использовали ферросульфат железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Fluka,

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, ДНКЖ-Г — биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие глутатион, ДНКЖ-МС — биядерные динитрозильные комплексы железа, содержащие меркаптосукцинат, ТРО — коэффициент торможения роста опухоли.

Швейцария), восстановленный глутатион, 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 (NO₂) методом низкотемпературной сублимации жидкой смеси этих газов в вакуумированной системе, как это описано в работах [1, 7].

Биядерная форма динитрозильных комплексов железа с глутатионом. Синтез ДНКЖ-Г проводили согласно описанному ранее «простейшему» методу синтеза ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [1, 8]. В соответствии с этим методом синтез 5 мМ раствора ДНКЖ с глутатионом проводили следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на воздухе добавляли 62 мг глутатиона (20 мМ), вызывавшего подкисление раствора до pH 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, обусловленному образованием S-нитрозоглутатиона. Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерного для S-нитрозоглутатиона, реакция заканчивалась через полтора часа с образованием 10 мМ этого соединения. После этого pH раствора повышали до 7.2, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся процессом образования ДНКЖ-Г в растворе при участии S-нитрозоглутатиона, Fe²⁺ и глутатиона [9]. Для полного превращения S-нитрозоглутатиона в ДНКЖ-Г 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 размораживания) в экспериментах на животных. Оценку полученного количества ДНКЖ-Г (молекулярная масса 846 Да) проводили оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм, характеризующихся коэффициентами экстинкции ϵ , равными соответственно, 9200 и 7400 М⁻¹см⁻¹ [1]. Согласно этой оценке концентрация Б-ДНКЖ в растворе составляла ~2.5 мМ или 5 мМ в пересчете на один атом железа в комплексе.

Биядерная форма динитрозильных комплексов железа с меркаптосукцинатом. Синтез ДНКЖ-МС проводили путем 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 ранее [8]. Концентрация ферросульфата в этой смеси составляла 5 мМ. После пятиминутного встряхивания смеси, приводившей к включению всего двухвалентного железа в ДНКЖ-МС, NO удаляли из аппарата откачкой, раствор полученного ДНКЖ-МС замораживали и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Концентрацию препарата ДНКЖ-МС (молекулярная масса 800 Да) оценивали по интенсивности полосы его оптического поглощения на 360 нм с коэффициентом экстинкции ϵ , равным 7000 М⁻¹см⁻¹ (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ).

Противоопухолевая активность *in vivo*. Эксперименты проведены на 75 инбредных мышах линии BDF₁ – гибриды первого поколения f₁(C₅₇Bl/6 × DBA₂), самках с массой тела 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столовая» НЦБМТ ФМБА России».

В качестве опухолевой тест-системы служила солидная опухоль мышей – карцинома легких Льюис, перевиваемая подкожно в соответствии со стандартной методикой [9].

Исследовавшиеся препараты вводили животным в виде водных растворов внутривенно в хвостовую вену мышей при использовании различных дозовых режимов и схем применения. ДНКЖ-Г вводили в суточных дозах 0.5, 1.0, 2.0, 10.0 и 20.0 мкмоль/кг (400, 800, 1600, 8000 и 16000 мкг/кг) пятикратно на 1-е, 4-е, 7-е, 11-е и 14-е сутки после перевивки опухоли. ДНКЖ-МС вводили в суточных дозах 2.5 и 5 мкмоль/кг (2000 и 4000 мкг/кг) пятикратно на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки после перевивки опухоли.

Оценка противоопухолевой активности препаратов проведена при сопоставлении кинетики роста опухолей в группах контрольных и леченых животных. Показателем ростиингибирующего эффекта препарата служил коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %), который определялся из соотношения: $ТРО = (P_C - P_T) / P_C$, где P_C и P_T – объем (или масса) опухоли в группах контрольных (С) и леченых (Т) животных соответственно. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как $V = ab^2/2$, где a – длина, b – ширина и высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли плотность опухолевой ткани принимали равной 1 г/см³ [9].

Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из шестидесяти мышей при восьми-десяти животных в контроле. Наблюдение за животными продолжа-

лось 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*. Сравнительное изучение цитотоксичности биядерных динитрозильных комплексов железа с двумя различными лигандами — глутатионом и меркаптосукцинатом — проведено на модели культуры клеток опухоли молочной железы МСF7 человека, полученной из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Действие препаратов *in vitro* исследовано при их использовании в широком диапазоне концентраций — от 0.0039 до 2.0 мкмоль/мл (от 3 до 1600 мкг/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 [9, 11].

Клетки ($8 \cdot 10^4$ клеток/лунка) 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 исследуемые препараты в указанных концентрациях. В контрольную группу клеток препараты 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 (ОП) 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%.

Результаты экспериментов представлены в виде зависимостей «доза—эффект», характеризующих цитотоксическое действие препаратов и позволяющих определить показатель цитотоксичности ДНКЖ-Г и ДНКЖ-МС в отношении

изучавшейся культуры опухолевых клеток — ИК₅₀ (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток).

Статистическая обработка результатов проведена с помощью программ «Statistica» и «Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Противоопухолевая активность биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и меркаптосукцинатом *in vivo*. Исследование влияния лиганда на противоопухолевый эффект биядерных динитрозильных комплексов железа проведено на модели карциномы легких Льюис при сопоставлении активности препаратов, содержащих глутатион и меркаптосукцинат.

Противоопухолевая активность ДНКЖ-Г исследована в суточных дозах, изменяющихся в диапазоне от 0.5 до 20 мкмоль/кг, вводимых внутривенно на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после псевивки опухоли (рис. 1 и 2, табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о нелинейном характере зависимости противоопухолевого эффекта ДНКЖ-Г от дозы. Как видно, при применении препарата в суточных дозах 0.5, 1.0 и 2.0 мкмоль/кг наблюдается повышение ростиингибирующего эффекта ДНКЖ-Г, вызывающего торможение роста опухоли на 57, 73 и 90% соответственно. Дальнейшее увеличение дозы до 10 и 20 мкмоль/кг приводит к снижению торможения роста опухоли до 70 и 30% по сравнению с контролем соответственно (рис. 2).

Таким образом, исследование противоопухолевого эффекта ДНКЖ-Г в широком диапазоне доз (от 0.5 до 20 мкмоль/кг в сутки) позволило установить, что оптимальным режимом применения препарата является его внутривенное введение в суточной дозе 2 мкмоль/кг, пятикратно с интервалом в трое суток, вызывающее ингибирование на 90% роста опухоли (карцинома легких Льюис), что хорошо согласуется с полученными ранее данными [4, 9].

Противоопухолевое действие ДНКЖ-МС изучено при внутривенном введении в суточных дозах 2.5 и 5 мкмоль/кг пятикратно в течение четырнадцати суток с интервалом в двое-трое суток между инъекциями. Применение препарата в указанных дозах приводит к подавлению развития карциномы легких Льюис на 65 и 50% по сравнению с контролем соответственно. При этом противоопухолевый эффект, как видно из представленных данных, усиливался при снижении дозы препарата (рис. 3, табл. 2).

Для сравнения противоопухолевой активности исследованных препаратов на всем протяжении развития карциномы легких Льюис проведено сопоставление их ростиингибирующего эффекта при применении в максимально эффек-

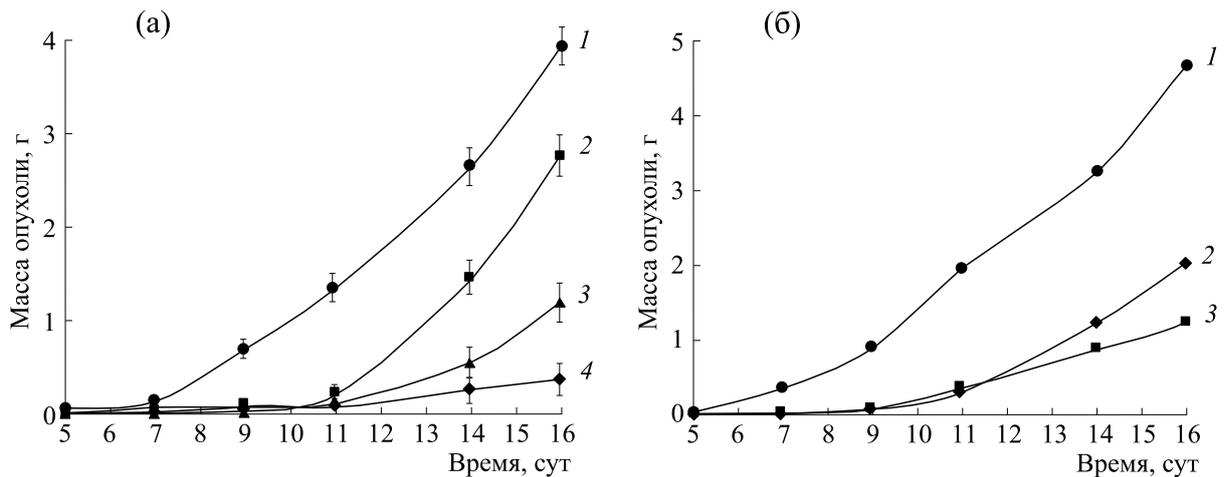


Рис. 1. Противоопухолевая активность ДНКЖ-Г при внутривенном введении различных доз препарата на модели карциномы легких Льюис: (а) – 1 – контроль, 2–4 – ДНКЖ-Г в суточных дозах 20, 10 и 2 мкмоль/кг соответственно; (б) – 1 – контроль, 2 и 3 – ДНКЖ-Г в суточных дозах 0.5 и 1.0 мкМ/кг соответственно. Дозы ДНКЖ-Г приводятся в пересчете на один $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -фрагмент. Введение препарата осуществляли внутривенно, пятикратно, на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после перевивки опухоли.

тивных дозах – 2.0 мкмоль/кг/сутки (ДНКЖ-Г) и 2.5 мкмоль/кг/сутки (ДНКЖ-МС). Как видно из представленных зависимостей, при применении ДНКЖ-Г показатель торможения роста опухоли за период наблюдения изменяется незначительно, всего на 9%, колеблясь в пределах от 96 до 85%, регистрируемых на 7-е и 17-е сутки после перевивки опухоли соответственно. При применении ДНКЖ-МС показатель ТРО уменьшается за тот же срок на 30% – с 86 до 56% по сравнению с контролем (рис. 4).

Сопоставление эффектов препаратов на 16-е сутки развития опухоли свидетельствует о том, что ДНКЖ-Г, примененный в оптимальной дозе

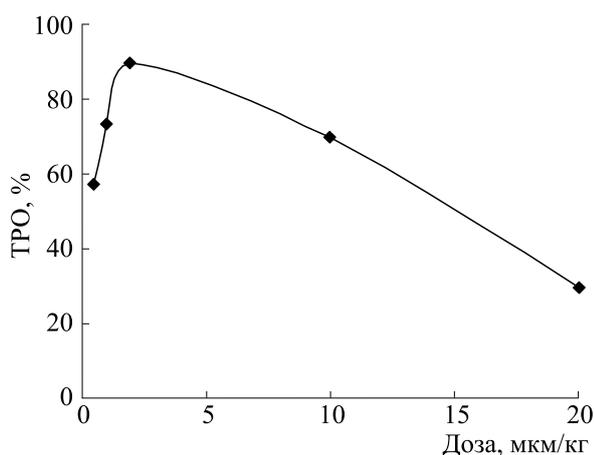


Рис. 2. Зависимость противоопухолевого эффекта ДНКЖ-Г от дозы при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис (оценка эффекта на 16-е сутки после перевивки опухоли).

(2.0 мкмоль/кг/сутки или 1600 мкг/кг/сутки), подавляет рост карциномы легких Льюис на 90%, в то время как препарат ДНКЖ-МС, введенный в максимально эффективной дозе (2.5 мкмоль/кг/сутки или 2000 мкг/кг/сутки), ингибирует развитие опухоли не более чем на 65% по сравнению с контролем (табл. 1 и 2, рис. 4).

Иными словами, использование глутатиона в качестве лиганда обеспечивает на модели карциномы легких Льюис несколько более высокую эффективность биядерного динитрозильного

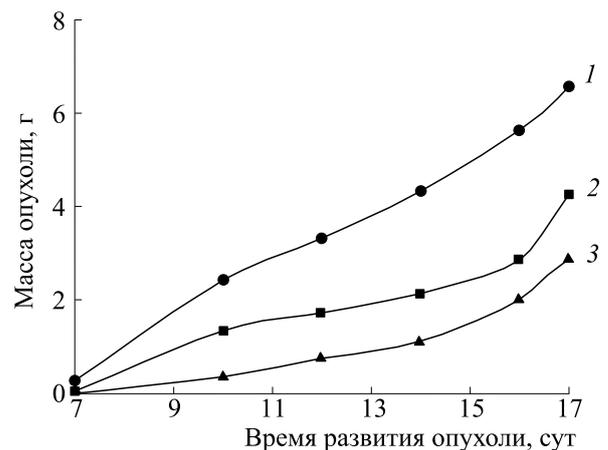


Рис. 3. Влияние препарата ДНКЖ-МС на развитие карциномы легких Льюис: 1 – контроль; 2 – ДНКЖ-МС, 5.0 мкМ/кг в сутки; 3 – ДНКЖ-МС, 2.5 мкМ/кг в сутки. Введение препарата осуществляли внутривенно на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки после перевивки опухоли

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

Серия опыта, №	Группа	Суточная доза, мкмоль/кг	Средняя масса опухоли, г	Торможение роста опухоли на 16-е сутки, %
1	ДНКЖ-Г	20.0	2.76 ± 0.54	30
1	ДНКЖ-Г	10.0	1.19 ± 0.14	70
1	ДНКЖ-Г	2.0	0.37 ± 0.08	90
1	Контроль	—	3.93 ± 0.65	—
2	ДНКЖ-Г	1.0	1.2 ± 0.24	73
2	ДНКЖ-Г	0.5	1.97 ± 0.13	57
2	Контроль	—	4.54 ± 0.45	—

Примечание. Введение препарата осуществляли на 1-е, 4-е, 7-е, 9-е и 11-е сутки после перевивки опухоли.

комплекса железа по сравнению с препаратом, содержащим меркаптосукцинат.

Цитотоксический эффект биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и меркаптосукцинатом *in vitro*. Влияние динитрозильных комплексов железа, содержащих различные лиганды — ДНКЖ-Г и ДНКЖ-МС, на выживаемость клеток культуры опухоли человека MCF7 изучено в широком диапазоне доз, изменяющихся в пределах от 0.0039 до 2.0 мкмоль/мл.

Полученные данные свидетельствуют о немотонном характере зависимости доли выживших после воздействия препаратов клеток от дозы.

Как видно из зависимостей, представленных на рис. 5, применение препаратов в диапазоне концентраций от 0.0039 до 0.125 мкмоль/мл (что соответствует диапазону доз, варьирующих в пределах от 3 до 100 мкг/мл) приводит к некоторому увеличению числа выживших клеток. Доля выживших клеток превышает уровень контроля на

5–22% при воздействии ДНКЖ-Г и на 1–15% при воздействии ДНКЖ-МС (рис. 5).

При увеличении концентраций препаратов от 0.5 до 2 мкмоль/мл (что соответствует диапазону доз от 400 до 1600 мкг/мл) наблюдается постепенное снижение доли выживших клеток — до 65% при воздействии ДНКЖ-Г и до 42% при воздействии ДНКЖ-МС (рис.5).

Зависимость гибели клеток от концентрации динитрозильных комплексов железа в указанном диапазоне концентраций — от 0.5 до 2 мкмоль/мл — показана на рис. 6.

Как видно, максимальный цитотоксический эффект выражается в гибели 58% клеток при применении ДНКЖ-МС (концентрация 1 мкмоль/мл или 800 мкг/мл) и 35% клеток при применении ДНКЖ-Г (концентрация 2 мкмоль/мл или 1600 мкг/мл).

Расчетная концентрация, вызывающая гибель 50% клеток (IK_{50}), составляет для ДНКЖ-МС 0.8 мкмоль/мл (640 мкг/мл), а для ДНКЖ-Г зна-

Таблица 2. Противоопухолевый эффект ДНКЖ-МС при внутривенном введении на модели карциномы легких Льюис

Группа	Суточная доза, мкмоль/кг	Средняя масса опухоли, г	ТРО на 16-е сутки, %	Критерий Стьюдента t
ДНКЖ-МС	2.5	2.00 ± 0.15	65	$3.45 > t_{0.01} = 3.05$ $f = 12$
ДНКЖ-МС	5.0	2.85 ± 0.35	50	$2.69 > t_{0.05} = 2.22$ $f = 10$
Контроль	—	5.61 ± 0.25	—	—

Примечание. Введение препарата осуществляли на 1-е, 4-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки после перевивки опухоли.

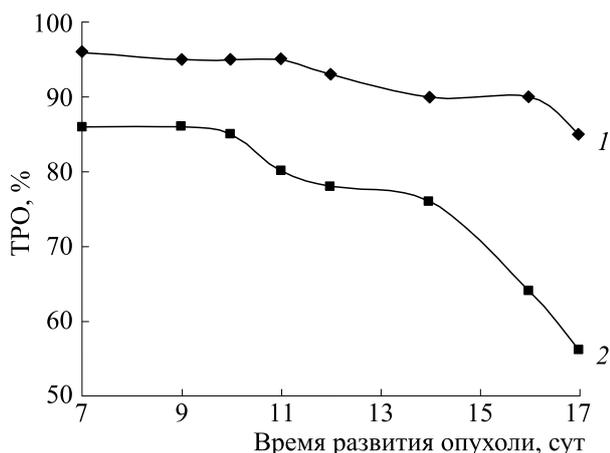


Рис. 4. Изменение показателя противоопухолевой активности биядерных динитрозильных комплексов железа с различными лигандами ДНКЖ-Г и ДНКЖ-МС в зависимости от времени оценки эффекта на модели карциномы Льюис: 1 – ДНКЖ-Г (2.0 мкмоль/кг/сутки), 2 – ДНКЖ-МС (2.5 мкмоль/кг/сутки).

чение $ИК_{50}$ превышает 2 мкмоль/мл (1600 мкг/мл) (рис. 6).

Учитывая, что согласно общепринятым критериям оценки цитотоксического эффекта вещество считается цитотоксически активным при значениях $ИК_{50} \leq 100$ мкг/мл [9], следует признать, что динитрозильные комплексы железа с глутатионом (ДНКЖ-Г) и с меркаптосукциноматом (ДНКЖ-МС) не обладают цитотоксическим действием на опухолевые клетки культуры МСF7 человека *in vitro*.

Представляется уместным отметить, при всей условности такого сопоставления, что диапазон доз, использованных в экспериментах *in vitro* и

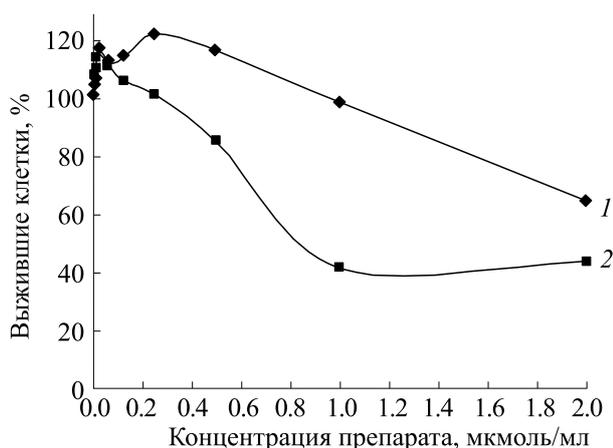


Рис. 5. Влияние динитрозильного комплекса железа с глутатионом (1) и с меркаптосукциноматом (2) на выживаемость опухолевых клеток культуры МСF7 человека *in vitro*.

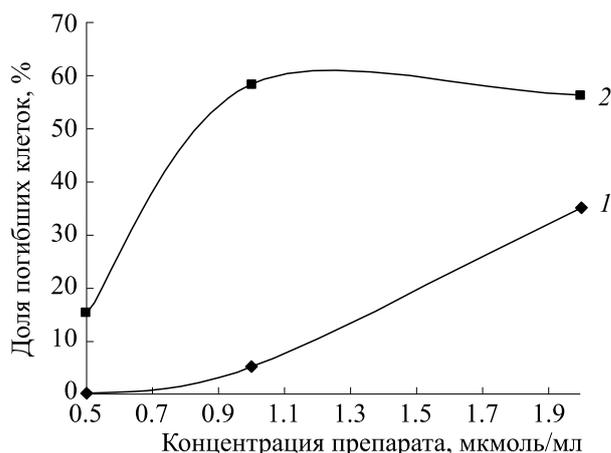


Рис. 6. Влияние динитрозильного комплекса железа с глутатионом (1) и с меркаптосукциноматом (2) на гибель клеток культуры МСF7 человека *in vitro*.

in vivo, изменяется примерно в одинаковых пределах – от 30 до 16000 мкг/кг в опытах, проведенных на культуре клеток, и от 400 до 16000 мкг/кг в опытах, проведенных на лабораторных животных (мыши).

Полученные результаты свидетельствуют о весьма значительной противоопухолевой активности динитрозильных комплексов железа с глутатионом и с меркаптосукциноматом, ингибирующих развитие опухоли (карцинома легких Льюис) на 90 и 65%, соответственно, *in vivo*, при слабо выраженном цитотоксическом эффекте препаратов в отношении культуры опухолевых клеток человека МСF7 *in vitro*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление результатов исследований противоопухолевого действия использованных ДНКЖ на уровне организма (*in vivo*) и на уровне клеточной культуры (*in vitro*) приводит к следующим, казалось бы, взаимоисключающим выводам.

Во-первых, из опытов *in vivo* следует, что это действие должно усиливаться по мере понижения дозы ДНКЖ, вводимой мышам, тогда как опыты *in vitro* показывают, что гибель злокачественных клеток должна повышаться по мере увеличения концентрации этих комплексов в культуральной среде.

Во-вторых, из экспериментов на животных следует, что для ДНКЖ-МС характерно более слабое, чем для ДНКЖ-Г, противоопухолевое действие, а в опытах на культуре клеток обнаруживается обратная зависимость.

Эти противоречия можно устранить, если принять во внимание участие иммунной системы в противоопухолевом действии ДНКЖ, а также

факт существенно меньшей стабильности ДНКЖ-МС. Последнее следует из факта более быстрого распада этих комплексов при их выдерживании на воздухе при нейтральных и кислых значениях рН. Если ДНКЖ-Г сохранялись в этих условиях соответственно в течение суток или в течение двух-четырех часов, то ДНКЖ-МС распались при нейтральных значениях рН за два-три часа, а при рН 1–2 – в течение получаса.

Участие иммунокомпетентных клеток в противоопухолевом действии ДНКЖ на уровне организма определяется способностью этих клеток, например макрофагов, эффективно включать в себя ДНКЖ [12] с последующей направленной транспортировкой этих комплексов к злокачественным опухолям и их поступлением из макрофагов внутрь тканей этих опухолей. При этом следует иметь в виду и то обстоятельство, что иммунокомпетентные клетки сами по себе могут подвергаться токсическому действию ДНКЖ, естественно, по мере повышения дозы этих комплексов. Именно поэтому противоопухолевое действие обоих ДНКЖ усиливалось по мере снижения дозы этих комплексов, введшихся в организм животных, достигая оптимального действия при дозах 2.0–2.5 мкмоль/кг веса животных. При этих дозах иммунокомпетентные клетки сохраняли интактность, целенаправленно передавая ДНКЖ в ткани опухолей. При этом локальная концентрация ДНКЖ в ближайшем окружении опухолей из-за преимущественной локализации этих комплексов в иммунокомпетентных клетках, контактирующих с опухолями, могла быть достаточно высокой.

В связи с вышесказанным более слабое противоопухолевое действие ДНКЖ-МС *in vivo* могло быть обусловлено тем, что токсическое действие на макрофаги и другие иммунокомпетентные клетки, включающие в себя эти комплексы, могло иметь место при их более низкой, чем для ДНКЖ-Г, дозе. В результате иммунокомпетентные клетки могли доставлять к опухолям существенно меньшее количество ДНКЖ-МС и тем самым инициировать более слабое, чем ДНКЖ-Г, противоопухолевое действие в экспериментах *in vivo*.

Как сейчас установлено [13], цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами определяется их способностью высвобождать при распаде как нейтральные молекулы NO, так и катионы нитрозония (NO^+). Первые, связываясь с ионами супероксида, продуцируют анионы пероксинитрита, продукты распада протонированной формы которых – гидроксильные радикалы и диоксид азота – собственно и оказывают токсическое действие на клетки и ткани. Что касается катионов нитрозония, их цитотоксическое действие, определяется, по-видимому, их способно-

стью инициировать S-нитрозирование тиолсодержащих белков, нарушающее нормальное функционирование этих белков, что и приводит к негативным для клеток и тканей последствиям. Остается открытым вопрос, какой из указанных компонентов ДНКЖ – молекулы NO или катионы нитрозония, высвобождающиеся из ДНКЖ при их распаде, – мог оказывать решающее цитотоксическое действие на злокачественные ткани и клетки.

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** (6), 1216 (2019).
7. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 1236 (2010).
8. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 110 (2013).
9. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в кн. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть 1, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), сс. 642–657.
10. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **65** (1), 48 (2020).
11. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., *Биофизика* **64** (6), 1138 (2019).
12. H. Lewandowska, T. M. Stepkowski, S. Meczynska, et al., *J. Inorg. Biochem.* **188**, 29 (2018).
13. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).

The Influence of the Ligand Nature on the Antitumour Activity and the Cytotoxic Effect of the Binuclear Dinitrosyl Iron Complexes

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 influence of the ligand nature on the growth-inhibiting and cytotoxic effects of nitric oxide-generating compounds such as binuclear dinitrosyl iron complexes containing glutathione and mercaptosuccinate was studied *in vivo* and *in vitro*. It was established that complexes with glutathione demonstrated antitumor activity prevailing over the effect exerted by complexes with mercaptosuccinate capable of inhibiting tumor growth (Lewis lung carcinoma) (90% and 65%, respectively, versus control). It was found that these complexes are weakly cytotoxic against MCF7 human cancer cell line. Half-maximal inhibitory concentration at which the viability of cells reduced by 50% (IC_{50}) was equal to 0.8 mM/ml (640 μ g/ml) when a complex with mercaptosuccinate was administered and 2 mM/ml (1600 μ g/ml) after injection of a complex with glutathione. It is assumed that the antitumor activity of iron complexes under study is determined by the ability of these complexes to enter into immunocompetent cells which provide a direct route to tumor tissues.

Keywords: binuclear dinitrosyl iron complexes, in vivo antitumor activity, Lewis lung murine carcinoma, cytotoxic effect in vitro, MCF-7 human cancer cell line