

УДК 577.03+577.1+577.11+577.12

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА НА КЛЕТКАХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Н. П. Акентьева^{1,2,*}, Н. А. Санина^{1,3}, Т. Р. Приходченко¹, А. Р. Гизатуллин¹,
Н. И. Шкондина¹, С. С. Шушанов⁴, Т. С. Ступина^{1,2}, академик РАН С. М. Алдошин^{1,3}

Поступило 25.12.2018 г.

Представлены результаты исследования влияния моноядерного динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ7) с функциональными серосодержащими лигандами (донорами NO) на жизнеспособность опухолевых клеток множественной миеломы. ДНКЖ7 понижал жизнеспособность и ингибировал пролиферацию клеток множественной миеломы, т.е. обладал цитотоксичными свойствами. Методом флуоресцентного анализа установлено, что соединение ДНКЖ7 понижает уровень внутриклеточного глутатиона и повышает уровень активных форм кислорода в клетках множественной миеломы. Предполагается, что ДНКЖ7 может быть потенциальным средством для лечения онкологических заболеваний.

Ключевые слова: цитотоксичность, динитрозильный комплекс железа, донор NO, множественная миелома.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524866742-747>

Множественная миелома – это заболевание крови, возникающее в костном мозге и тесно связанное с лимфомой и лейкозией [1]. Эффективного лечения миеломы на сегодня не существует, терапия направлена на замедление прогрессирования заболевания. Поэтому поиск новых препаратов для лечения множественной миеломы является актуальным.

Соединения, выделяющие монооксид азота NO, представляют растущий класс перспективных противоопухолевых препаратов. Молекула NO связывается с широким спектром молекулярных мишеней в клетке [2]. При высоких концентрациях (>1 мкМ) оксид азота метаболизируется в клетке с образованием таких соединений, как пероксинитрит или N₂O₃, которые являются цитотоксичными и проявляют противоопухолевый эффект [3]. Установлено, что оксид азота ингибирует деление и стимулирует апоптоз опухолевых клеток [4]. Показано, что соединение JS-K (донор NO) является эффективным ингибитором рака крови на моделях *in vitro* и *in vivo* [5]. Ранее мы показали, что ДНКЖ7 активирует активность фермента миелопероксидазы, что свидетельствует о его цитостатических свойствах [6].

Цель настоящего исследования – синтез водорастворимого динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ, донора NO), изучение его действия на жизнеспособность опухолевых клеток множественной миеломы человека.

Исследования выполнены на клеточной линии множественной миеломы человека (ММ, клеточная линия RPMI 8226), любезно предоставленной С.С. Шушановым (ФГБУ “НМИЦ им. Н.Н. Блохина” Минздрава России, Москва). Происхождение указанной линии клеток: человек, костный мозг, миелома. Способ культивирования: суспензионный в среде RPMI1640 с 10%-й телячьей эмбриональной сывороткой (ТЭС) при 37 °С, 5% CO₂.

В опытах исследовали особенности влияния на клетки моноядерного ДНКЖ7 с функциональными серосодержащими лигандами: соединение № 7-[Fe(SC(NHCH₃))₂(NO)₂]BF₄. Этот ДНКЖ7 выделяет NO при растворении в протонных растворителях вследствие диссоциации [7]. Синтез и идентификацию соединения ДНКЖ7 проводили согласно методике [7].

Цитотоксичность ДНКЖ7 определяли методом окрашивания клеток анилиновым красителем – трипановым синим [8]. Принцип метода состоит в том, что этот краситель неспособен проникнуть в клетку через неповрежденную клеточную мембрану, поэтому живые клетки не окрашиваются. При повреждении мембраны трипановый синий окрашивает клеточное ядро в интенсивный синий цвет, такие окрашенные клетки считаются мертвыми. Клетки ММ выращивали в культуральных флаконах в ростовой среде RPMI1640 в инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂. Количе-

¹ Институт проблем химической физики
Российской Академии наук, Черноголовка Московской обл.

² Научно-образовательный центр “Медицинская химия”
Московского государственного областного университета

³ Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

⁴ Российский онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва

* E-mail: na_aken@icp.ac.ru

ство живых и мёртвых клеток подсчитывали методом окрашивания клеток трипановым синим. Для оценки цитотоксичности соединения ДНКЖ7 к клеткам ММ (960 000 клеток /10 мл) добавляли ДНКЖ7 ($3,3 \cdot 10^{-3}$ М) и инкубировали в течение 24 ч. В качестве контроля использовали клетки ММ (960 000 клеток /10 мл) без добавления ДНКЖ7. Затем к 0,2 мл суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,1 мл 0,5% в 0,9%-м растворе хлорида натрия), инкубировали с красителем 10 мин при 37 °С и подсчитывали в камере Горяева количество живых, мёртвых клеток и общее количество клеток. Цитотоксический индекс (ЦИ) рассчитывали по формуле: (число погибших клеток/общее число клеток) \times 100%.

Для анализа действия ДНКЖ7 на жизнеспособность клеток ММ использовали метод AlamarBlue® Cell Viability Assay (“ThermoFisher Scientific”, США). Данный метод основан на способности митохондриальных НАДН-дегидрогеназ окислять НАДН и восстанавливать краситель резазурин во флуоресцентный резозуриин в живых клетках [9].

К клеткам ММ (7200 клеток на лунку) добавляли ДНКЖ7 ($3,3 \cdot 10^{-3}$ М), который непосредственно перед этим растворяли в воде, а в контрольные лунки добавляли равное количество фосфатно-солевого буфера (ФБ, 100 мМ, рН = 7,2). Образцы инкубировали в течение 20 мин при 37 °С в четырёх повторностях. Затем добавляли реагент AlamarBlue® (10 мкл) и измеряли интенсивность флуоресценции через 24 ч при $E_{ex}/E_{em} = 570/590$ нм на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (“Agilent Technologies”, США).

Влияние ДНКЖ7 на профиль клеточного цикла клеток ММ исследовали методом проточной цитометрии [10]. Данный метод основан на том, что различные стадии клеточного цикла отличаются по содержанию ДНК в клетке. Анализ клеточного цикла проводили с помощью ДНК-связывающего красителя, пропидиум йодида, интенсивность флуоресценции которого пропорциональна количеству ДНК. Клетки ММ выращивали в культуральных флаконах до плотности 10^6 клеток в каждом образце. В экспериментальный флакон добавляли ДНКЖ7 ($3,3 \cdot 10^{-3}$ М), а в контрольный флакон добавляли равное количество ростовой среды и инкубировали 24 ч при 37 °С, 5% CO₂. После этого клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин, супернатант удаляли, осадок клеток промывали ФБ. Затем клетки фиксировали охлаждённым до –20 °С 70% этанолом (2 мл) и инкубировали в течение 4 ч при температуре –20 °С. После инкуба-

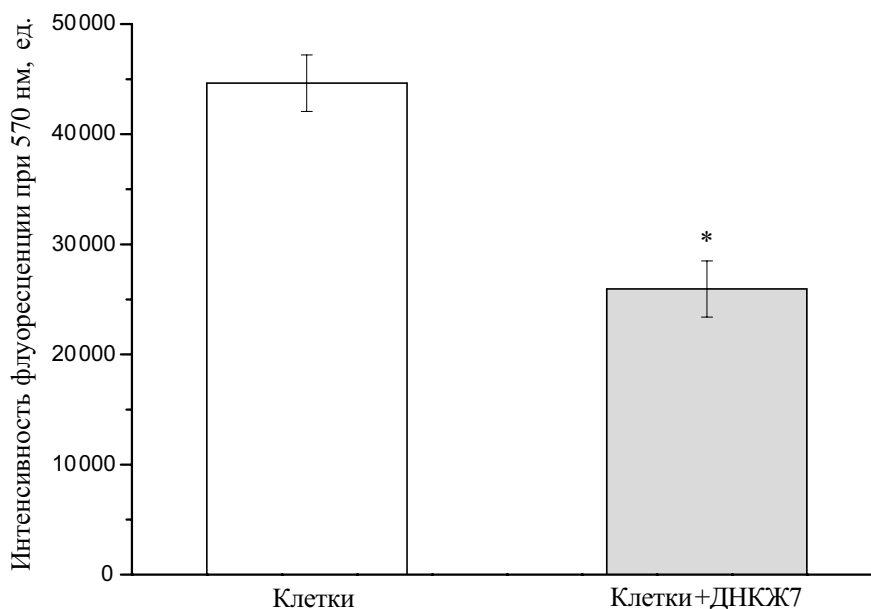
ции клетки отмывали от этанола ФБ и обрабатывали ФБ, содержащим пропидиум йодид (0,01 мг/мл), Triton X-100 (0,1%) и рибонуклеазу А (0,1 мг/мл). Рибонуклеазу А добавляли, чтобы обеспечить связывание с красителем только ДНК, но не РНК. Клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Часть клеток оставляли в качестве отрицательного контроля (неокрашенные клетки). После окрашивания образцы анализировали с помощью проточной цитометрии на установке Guava easyCyte System (Millipore) Guava® Cell Cycle. Интенсивность флуоресценции пропидиум йодида измеряли при $E_{ex}/E_{em} = 488/585$ нм. Анализ проводили при помощи Guava Soft™ 3.1.1 (Millipore, США). Интенсивность флуоресценции пропидиум йодида представляли на гистограмме в G₀/G₁-, S- и G₂/M-фазах клеточного цикла.

Изменение уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках ММ при добавлении ДНКЖ7 оценивали, используя нефлуоресцентный краситель 2',7'-дигидрохлорофлуоресцеин диацетат (H2-DCFDA, “Molecular Probes”, США) [11]. При попадании H2-DCFDA внутрь клетки эндогенные эстеразы расщепляют ацетатные группы, образуя внутри клетки восстановленную форму DCHF. Восстановленная форма DCHF окисляется в DCF под действием H₂O₂ или OH⁻, образуя флуоресцентное соединение. К клеткам ММ (7300 клеток на лунку) добавляли раствор ДНКЖ7 ($3,3 \cdot 10^{-3}$ М), в контроль добавляли равное количество ФБ и инкубировали в течение 15 мин. Затем клетки промывали дважды ФБ, добавляли к ним H2-DCFDA (20 мкл, $1,6 \cdot 10^{-3}$ М) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После инкубации клетки дважды промывали ФБ в течение 5 мин. Флуоресценцию окисленной формы DCF измеряли при $E_{ex}/E_{em} = 488/525$ нм.

Влияние ДНКЖ7 на уровень внутриклеточного восстановленного глутатиона оценивали с помощью *o*-фталевого альдегида согласно методике [12]. Этот метод основан на том, что амино- и сульфгидрильные группы глутатиона реагируют с *o*-фталевым альдегидом, восстанавливают его, образуя циклический, интенсивно флуоресцирующий продукт. Клетки ММ человека засеивали в 96-луночную планшету (7500 клеток / в лунке) и клетки выращивали в течение 24 ч в инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂ и 95% влажности. Затем в лунки добавляли ДНКЖ7 ($3,3 \cdot 10^{-3}$ М), а в контроль добавляли равное количество ФБ и инкубировали в течение 15 мин. Далее клетки промывали дважды с ФБ и добавляли раствор холодной дистиллированной воды (400 мкл), содержащей 17,5% HPO₃. После инкубации в течение

Таблица 1. Определение цитотоксичности ДНКЖ7 на клетках ММ

Название эксперимента	Общее количество клеток	Количество живых клеток	Количество мертвых клеток/мл	Цитотоксический индекс, %
До добавления ДНКЖ7 к клеткам ММ	960 000	960 000	0,0	0,0
После добавления ДНКЖ7 к клеткам ММ	960 000	280 000	680 000	70,8

Рис. 1. Влияние ДНКЖ7 на жизнеспособность клеток ММ. Здесь и на рис. 2–4 $M \pm m$, $n = 4$.

10 мин раствор удаляли и к клеткам добавляли ФБ (250 мкл, 100 мМ, 5 мМ ЭДТА, рН = 8,0) и 100 мкл *o*-фталевого альдегида (0,1% в этаноле), инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Затем флуоресцентный аддукт глутатиона определяли при $E_{ex}/E_{em} = 350/420$ нм на спектрофлуориметре. Данные представляются как средние от трёх повторных экспериментов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Graph Pad Prizm. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Подсчёт живых и мёртвых клеток с помощью трипанового синего показал, что изначально все клетки были живыми (960 000 клеток) (табл. 1). Однако после инкубации клеток с ДНКЖ7 в течение 24 ч количество живых клеток уменьшилось до 280 000, а количество мёртвых клеток выросло до 680 000. Это указывает на то, что соединение ДНКЖ7 проявляет цитотоксические свойства, цитотоксический индекс ДНКЖ7 составляет 70,8%.

Чтобы понять, отчего наблюдается гибель клеток, мы исследовали влияние ДНКЖ7 на активность митохондриальных дегидрогеназ, которые отвечают за синтез АТФ в клетке. Результаты исследований показали, что предварительная инкубация клеток ММ с ДНКЖ 7 ($3,3 \cdot 10^{-3}$ М) в течение 24 ч ингиби-

ровала активность митохондриальных дегидрогеназ на 55% по сравнению с контрольными клетками, необработанными ДНКЖ7 (рис. 1). Эти результаты также показали, что ДНКЖ7 понижает жизнеспособность опухолевых клеток.

Для того чтобы понять молекулярный механизм действия ДНКЖ7 на клетки ММ, мы исследовали эффект этого соединения на клеточный цикл ММ. Различные стадии клеточного цикла отличаются по содержанию ДНК в клетке. Мы анализировали влияние ДНКЖ7 на клеточный цикл ММ с помощью окрашивания клеток пропидиум йодидом, который связывает ДНК и интенсивность флуоресценции которого пропорциональна количеству связанного ДНК. С помощью гистограммы интенсивности флуоресценции мы выделяли клетки в SubG1, G1-, S- и G2/M-фазах клеточного цикла. Как видно из рис. 2, фазы G1 и S являются практически одинаковыми для контрольного и экспериментального образца (после инкубации клеток с ДНКЖ7). Фаза S, при которой происходит репликация ДНК клеточного ядра, составляет 24,35 и 28,82% соответственно для контрольного и экспериментального образца. Однако фаза клеточного деления (G2/M) для контрольных клеток равна 26,11%, а для экспериментальных клеток после инкубации с ДНКЖ7 эта фаза

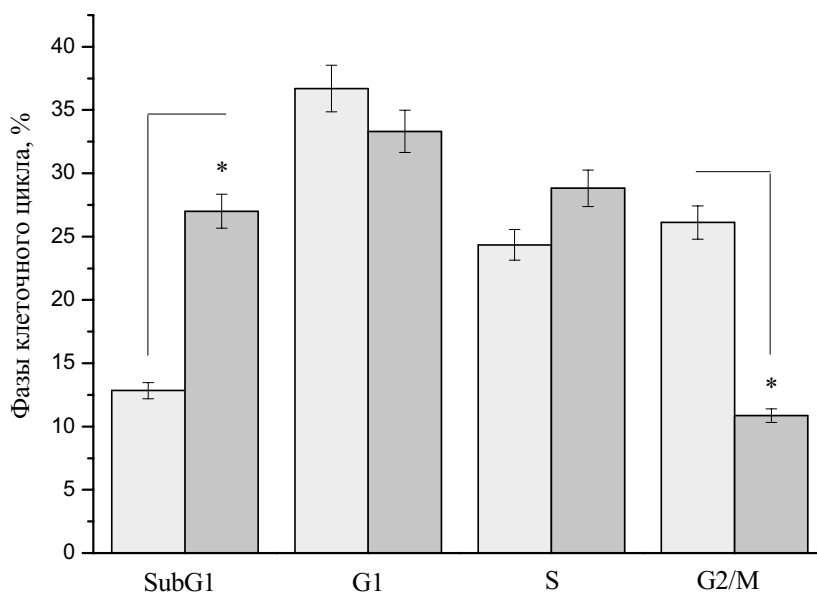


Рис. 2. Влияние ДНКЖ7 на профиль клеточного цикла ММ.

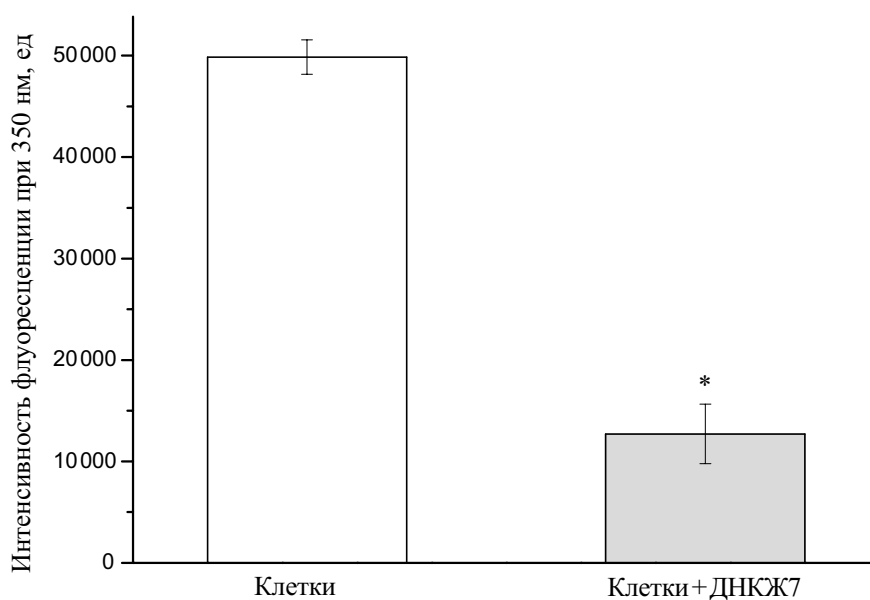


Рис. 3. Влияние ДНКЖ7 на уровень глутатиона в клетках ММ.

значительно уменьшается и составляет только 10,86%. Эти данные указывают на то, что ДНКЖ7 влияет на деление клеток и ингибирует пролиферацию клеток ММ в 2,5 раза.

Важным условием для жизнеспособности клетки является сохранение оптимального соотношения восстановленного глутатиона (GSH) к окисленному (GSSG) – GSH/GSSG. Глутатион играет ключевую роль в редокс-регуляции основных процессов жизнедеятельности клетки, а именно, в регуляции клеточного цикла, образовании энергии, апоптозе, пролиферации, дифференцировке, фолдинге белков, транскрипции, репарации ДНК, сигналинге, антиоксидантной защите [13]. Недавние исследования

показали, что GSH накапливается в ядре в начале G1-фазы, поэтому он может играть важную роль в сохранении редокс-статуса ядра во время клеточного цикла [14]. Снижение уровня GSH ниже показателей нормы служит индикатором нарушения клеточного редокс-статуса и изменения редокс-зависимой регуляции генов. Глутатион присутствует в клетке в основном в восстановленной форме, тогда как количество окисленного глутатиона не превышает 1% от его общего внутриклеточного содержания. Поэтому мы исследовали влияние ДНКЖ7 на уровень восстановленного глутатиона в клетках ММ. Результаты показали, что ДНКЖ7 понижал уровень восстановленного глутатиона в 5 раз, что свидетельствует

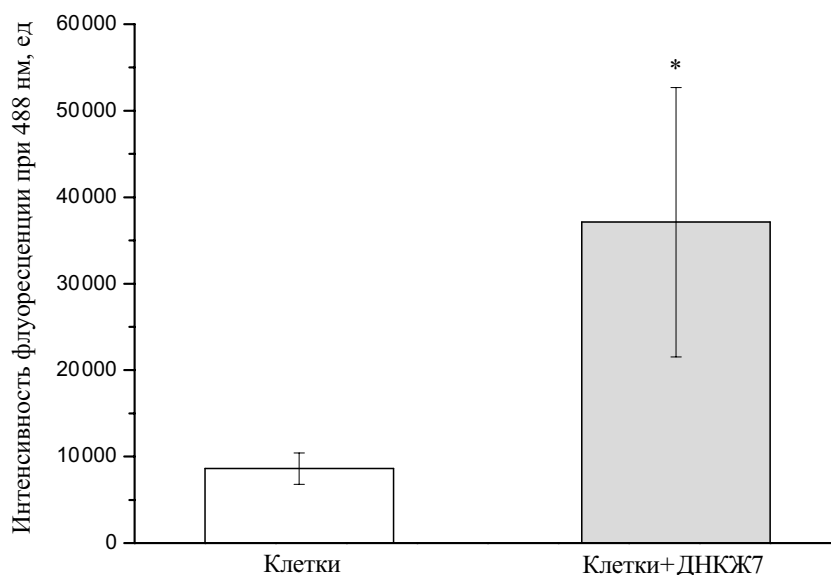


Рис. 4. Влияние ДНКЖ7 на уровень активных форм кислорода в клетках ММ.

об индукции окислительного стресса в клетке (рис. 3). Возможно, что ингибирование пролиферации клеток во время клеточного цикла под действием ДНКЖ7 связано с понижением уровня глутатиона в клетке. Снижение уровня GSH в цитоплазме в фазе G1 может также способствовать росту активных форм кислорода (АФК). Состояние системы тиол/дисульфид определяется клеточным редокс-статусом, характеризующимся соотношением GSH/GSSG. При физиологических условиях GSH/GSSG составляет 100:1, что минимизирует окислительное действие АФК. Нарушение данного соотношения оказывает существенное влияние с точки зрения редокс-регуляции функционирования белков на процессы сигнальной трансдукции, контроля экспрессии генов, клеточной пролиферации, дифференцировки, состояние клеточного метаболизма и жизнедеятельности клетки в целом [15]. Поддержание оптимального соотношения GSH/GSSG в клетке является существенным для нормального её функционирования и выживания. Недостаток GSH подвергает клетку риску окислительного повреждения. Мы исследовали влияние ДНКЖ7 на уровень АФК в клетках ММ (рис. 4). Результаты показали, что инкубация клеток с ДНКЖ7 увеличивала уровень АФК в раковых клетках в 4 раза. Это свидетельствует о том, что ДНКЖ7 вызывает активное образование АФК, которые губительно влияют на рост опухолевых клеток.

Таким образом, результаты нашего исследования показали, что ДНКЖ7 можно отнести к категории цитотоксических соединений, способных индуцировать окислительный стресс в клетках и тем самым вызывать гибель опухолевых клеток ММ.

Заключение. Результаты исследования показали, что динитрозильный комплекс железа обладает цитотоксическими свойствами и, следовательно, имеет потенциал для лечения множественной миеломы.

Благодарности. В экспериментах использовали оборудование НОЦ МГОУ “Медицинская химия” в ИПХФ РАН, г. Черноголовка.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований № 1.42 П “Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий” и в соответствии с государственным заданием (регистрационный № 0089-2019-0014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Costa F., Das R., Kini Bailur J., Dhodapkar K., Dhodapkar M.V. // *Front Immunol.* 2018. V. 9. Article 2204. P. 1–11. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02204.
- Rigas B., Sun Y. // *Brit. J. Cancer.* 2008. V. 98. P. 1157–1160.
- Scicinski J., Oronskya B., Ning S., Knox S., Peehl D., Kim M.M., Langeckere P., Fangera G. // *Redox Biol.* 2015. V. 6. P. 1–8.
- Hirst D.G., Robson T. // *Curr. Pharm. Des.* 2010. V. 16. P. 45–55.
- Maciag Anna E., Holland Ryan J., Cheng Y.-S. Robert, Rodriguez Luis G., Saavedra Joseph E., Anderson Lucy M., Keefer Larry K. // *Redox Biology.* 2013. V. 1. P. 115–124.
- Akentieva N.P., Sanina N.A., Gizatullin A.R., Shmatko N.Y., Goryachev N.S., Shkondina N.I., Prihodchenko T.R., Aldoshin S.M. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017. V. 477. № 1. P. 389–393. DOI: 10.1134/S1607672917060126.

7. *Sanina N.A., Aldoshin S.M., Shmatko N.Yu., Korcha-
gin D.V., Shilov G.V., Knyaz'kina E.A., Ovanesyan N.S.,
Kulikov A.V.* // *New J. of Chem.* 2015. V. 39.
P. 1022–1030.
8. *Венкатараман К.* Химия синтетических красителей.
Л.: Государственное научно-техническое издатель-
ство Химической литературы. 1956. Т. 1. 403 с.
9. *Schreer A., Tinson C., Sherry J.P., Schirmer K.* // *Anal.
Biochem.* 2005. V. 344. P. 76–85.
10. *Ormerod M.G., Tribukait B., Giaretti W.* // *Anal. Cell.
Pathol.* 1998. V. 17. № 2. P. 103–110.
11. *Oksvold M.P., Skarpen E., Widerberg J., Huitfeldt H.S.* //
J. Histochem. Cytochem. 2002. V. 50. P. 289–303.
12. *Hissin P.J., Hilf R.* // *Anal. Biochem.* 1976. V. 74.
P. 214–226.
13. *Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д.* //
Успехи биол. химии. 2014. Т. 54. С. 299–348.
14. *Garcia-Gimenez J.L., Markovic J., Dasi F., Queval G.,
Schnaubelt D., Foyer C.H., Pallardo F.V.* // *Biochim.
et Biophys. Acta.* 2013. V. 1830. P. 3304–3316.
15. *Cai Z., Yan L.J.* // *Journal of Biochem. and Pharmacol.
Research.* 2013. V. 1. P. 15–26.

ANTI-CANCER ACTIVITY OF DINITROSYL IRON COMPLEX (NO DONOR) ON THE MULTIPLE MYELOMA CELLS

**N. P. Akentieva^{1,2*}, N. A. Sanina^{1,3}, T. R. Prichodchenko¹, A. R. Gizatullin¹, N. I. Shkondina¹,
S. S. Shushanov⁴, T. S. Stupina^{1,2}, Academician of the RAS S. M. Aldoshin^{1,3}**

¹ *Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka,
Moscow Region, Russian Federation*

² *Moscow State Regional University, Moscow, Russian Federation*

³ *Lomonosov Moscow State University, Russian Federation*

⁴ *National Medical Research Center of Oncology N.N. Blokhina, Russian Ministry of Health,
Moscow, Russian Federation*

The results of a study of the effect of a mononuclear dinitrosyl iron complex (DNIC7) with functional sulfur-containing ligands (NO donor) on the cell viability of multiple myeloma cells are presented. It has been shown that DNIC7 decreased cell viability and inhibited the proliferation of cells of multiple myeloma, i.e. possesses cytotoxic properties. Fluorescent analysis revealed that the DNIC7 compound lowers the level of intracellular glutathione and increases the level of reactive oxygen species in cells of multiple myeloma. It is assumed that DNIC7 has the therapeutic potential for the treatment of cancer.

Keywords: cytotoxicity, dinitrosyl iron complex, donor NO, multiple myeloma.