

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОМ И S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ

© 2015 г. А.Ф. Ванин, Л.А. Островская*, Д.Б. Корман*, Л.Н. Кубрина,
Р.Р. Бородулин, М.М. Фомина*, Н.В. Блюхтерова*, В.А. Рыкова*, А.А. Тимошин**

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4;

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

***Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения РФ,
121522, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а*

E-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru; larros@list.ru

Поступила в редакцию 18.09.15 г.

Показано, что противоопухолевая активность биядерной формы динитрозильного комплекса железа с глутатионом, обнаруженная ранее на модели карциномы легких Льюис при внутрибрюшинном введении препарата, проявляется и при его подкожном применении, достигая 43% торможения роста опухоли при использовании комплекса на протяжении 10 или 15 сут в разовой дозе 100 мкМ/кг (в пересчете на одну группу $\text{Fe}(\text{NO})_2$ в составе комплекса). Ростингибирующее действие биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом было наиболее выраженным в первые две недели после перевивки опухоли. В более поздние сроки скорости роста опухолей у леченых животных достигали уровня контрольных значений или превышали их. При этом средняя продолжительность жизни экспериментальных животных превышала контрольные величины на 30%. Противоопухолевое действие биядерных динитрозильных комплексов железа при его внутрибрюшинном введении обнаружено и в отношении аденокарциномы Са-755, однако в этом случае продолжительность жизни экспериментальных животных повышалась не более чем на 7% по сравнению с контролем. Противоопухолевая активность обнаружена в аналогичных исследованиях и для S-нитрозоглутатиона, вызывающего ингибирование роста карциномы легких Льюис и аденокарциномы Са-755 на 70 и 90% соответственно. Однако в отличие от динитрозильных комплексов железа противоопухолевый эффект S-нитрозоглутатиона при повышении ежедневной дозы (с 200 до 400 мкМ/кг) ослаблялся. Предполагается, что первоначальное подавление развития опухолей под влиянием биядерных динитрозильных комплексов железа и S-нитрозоглутатиона определяется действием NO, высвобождающимся из этих соединений. Последующее блокирование этого эффекта обусловлено выработкой в опухолях систем антинитрозативной и антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, S-нитрозоглутатион, монооксид азота, карцинома легких Льюис, аденокарцинома Са-755.

Ранее нами был обнаружен противоопухолевый эффект одного из доноров монооксида азота (NO) – биядерной формы динитрозильных комплексов железа (Б-ДНКЖ) с глутатионом (GS) (формула $(\text{GS})_2\text{Fe}_2(\text{NO})_4$) в отношении солидной опухоли мышей – карциномы легких Льюис [1,2].

Введение препарата внутрибрюшинно, десятикратно, в разовых дозах 25, 50, 125 и 200 мкМ/кг (в пересчете на одну железо-динитрозильную $(\text{Fe}(\text{NO})_2)$ группу в составе комплекса)

приводило на начальной стадии роста опухоли к ее торможению, увеличивающемуся по мере повышения дозы Б-ДНКЖ с 60 до 85%, сменявшемуся в более поздние сроки усиленным ростом опухоли со скоростью, иногда даже превышающей скорость роста опухоли у контрольных животных.

Такого рода реакция опухолей на химиотерапевтическое воздействие, выражающаяся в смене периода регрессии опухолей их рецидивированием, является весьма распространенной и связана с выживанием фракции клеток, устойчивых к действию применявшихся препаратов.

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ – моно- и биядерная форма динитрозильных комплексов железа, GS – глутатион, GS-NO – S-нитрозоглутатион.

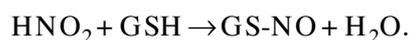
В связи с этим представлялось целесообразным дальнейшее исследование обнаруженного ранее противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ, включающее оценку активности препарата на других моделях солидных опухолей мышей при различных способах введения Б-ДНКЖ, а также проверку противоопухолевой активности других доноров NO, например S-нитрозоглутатиона (GS-NO), отличающегося по составу от комплекса Б-ДНКЖ с глутатионом только отсутствием железа.

С этой целью в настоящей работе было предпринято изучение влияния Б-ДНКЖ и GS-NO при различных способах их применения – внутрибрюшинно и подкожно – на развитие солидных опухолей мышей – карциномы легких Льюис и аденокарциномы Ca-755.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. При синтезе ДНКЖ с глутатионом использовали сернокислое железо ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион и нитрит натрия (NaNO_2) (Sigma, США).

Синтез биядерной формы динитрозильного комплекса железа с глутатионом. Комплекс синтезировали согласно описанному ранее «простейшему» методу синтеза ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [1,3]. В соответствии с этим методом синтез 5 мМ раствора Б-ДНКЖ с глутатионом проводили следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на воздухе добавляли 62 мг глутатиона (20 мМ), вызывавшего подкисление раствора до 4,0, с последующим введением в него 28 мг (10 мМ) сернокислого железа, приводившего к дальнейшему снижению pH до 3,8. После этого в раствор добавляли 6,9 мг (10 мМ) нитрита натрия, что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленному образованием GS-NO. Согласно работе [4], этот процесс был обусловлен протонированием нитрита с образованием азотистой кислоты, способной S-нитрозировать глутатион по реакции:



Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерного для GS-NO, реакция заканчивалась через 1,5 ч с образованием 10 мМ этого соединения. После этого pH раствора повышали до 7,2, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся процессом образования Б-ДНКЖ в растворе. Для полного превращения GS-NO в Б-ДНКЖ требовалось несколько часов. После удаления образовавшегося за это

время осадка гидроокиси трехвалентного железа полученный раствор использовали в экспериментах на животных.

Оценку полученного количества Б-ДНКЖ с глутатионом (мол. вес 846 Да) проводили оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм, характеризующихся коэффициентами экстинкции соответственно 9200 и 7400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [5]. Согласно этой оценке концентрация Б-ДНКЖ в растворе составляла ~2,5 или 5 мМ (в пересчете на одну группу $\text{Fe}(\text{NO})_2$ в составе комплекса).

Синтез S-нитрозоглутатиона. 5 мМ раствор GS-NO в 15 мМ HEPES-буфере получали понижая pH раствора 5,5 мМ глутатиона и 5 мМ нитрита натрия в том же буфере до pH 3,0–3,5 добавлением в раствор соляной кислоты, приводившим к розовому окрашиванию раствора. После одночасовой инкубации на воздухе pH раствора повышали до нейтральных значений. Концентрацию полученного GS-NO оценивали оптическим методом, как указано в предыдущем разделе.

Биологический эксперимент. Эксперименты проведены на 70 инбредных мышках-самках BDF_1 с массой тела 18–20 г, разведения питомника ПАМН «Столбовая». Опухолевыми тест-системами служили солидные опухоли мышей – карцинома легких Льюис и аденокарцинома Ca-755, перевиваемые подкожно в соответствии со стандартной методикой [6].

Б-ДНКЖ с глутатионом вводили мышам путем болюсной инъекции внутрибрюшинно или подкожно ежедневно в течение 10 либо 15 сут, начиная со следующих суток после перевивки опухоли, в суточных дозах 100 и 150 мкг/кг соответственно в 0,1 и 0,15 мл 5 мМ водного раствора комплекса (в пересчете на одну группу $\text{Fe}(\text{NO})_2$ в составе комплекса). GS-NO вводили путем болюсной инъекции внутрибрюшинно ежедневно десятикратно в разовых дозах 200 и 400 мкг/кг соответственно в 0,2 и 0,4 мл 5 мМ водного раствора GS-NO.

Оценка противоопухолевой активности. Показателями ростингибирующего эффекта препарата служили различия в кинетике роста опухолей (коэффициент торможения роста опухоли TPO , %) и средней продолжительности жизни (Δt , %) леченых (Т) и контрольных (С) животных. Показатель противоопухолевого эффекта – коэффициент торможения роста опухоли определялся 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. Изменение средней продолжи-

тельности жизни под влиянием испытуемого воздействия у леченных животных по сравнению с контролем определялось как $\Delta\tau = (\tau_C - \tau_T)/\tau_C$, %.

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. Масса опухоли соответствует ее объему, поскольку плотность опухолевой ткани принято считать равной 1 г/см^3 [6]. Минимально значимыми принято считать $TPO > 50\%$ и $\Delta\tau > 25\%$ [6].

Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из 6–8 мышей при 8–10 животных в контроле. Наблюдение за животными продолжалось в течение всего периода развития опухоли, вплоть до гибели животных.

ЭПР-измерения образцов тканей животных.

ЭПР-анализ тканей животных (опухоль, печень, селезенка, почки, кровь) проводили на группе мышей с карциномой Льюис, подвергнутой действию GS-NO внутривенно в течение 10 сут после перевивки опухоли. Забор образцов перечисленных тканей проводился на 22-е сутки развития опухоли, т.е. через 11 сут после окончания введения GS-NO. Биологический материал помещали в цилиндрические ампулы диаметром 4 мм с последующим их замораживанием в жидком азоте. Аналогичная процедура проводилась с образцами тканей контрольных животных. Масса извлеченных из этих ампул замороженных образцов тканей цилиндрической формы составляла не менее 0,5 г при длине образца не менее 3 см. При такой длине образец полностью заполнял рабочий объем резонатора радиоспектрометра. Для получения образцов опухолей, селезенки и легких массой 0,5 г смешивали биоматериал, взятый от двух-трех мышей. Измерения спектров ЭПР проводили на радиоспектрометре E-109E («Varian», США) при температуре жидкого азота (77 К).

Концентрацию парамагнитных центров в образцах указанных выше тканей животных определяли методом двойного интегрирования, используя в качестве эталонного образца раствор моноядерной формы ДНКЖ (М-ДНКЖ) с глутатионом, полученный путем повышения рН 2,5 мМ раствора Б-ДНКЖ с глутатионом от нейтральных значений до рН 11. Это подщелачивание приводило к полной трансформации диамагнитного Б-ДНКЖ в парамагнитный М-ДНКЖ с глутатионом (5мМ), характеризую-

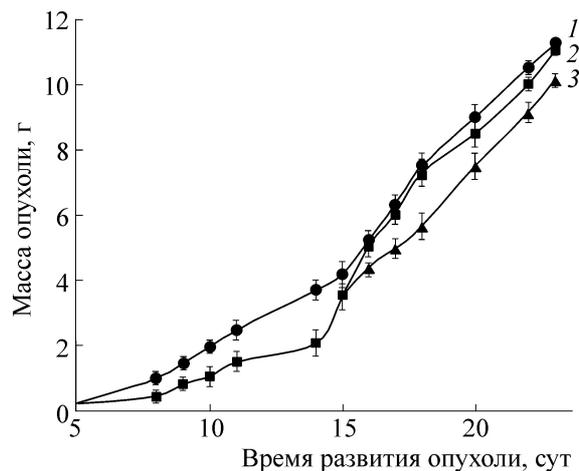


Рис. 1. Противопухольная активность препарата Б-ДНКЖ при подкожном введении в суточной дозе 100 мкМ/кг на модели карциномы легких Льюис: 1 – контроль; 2 – 100 мкМ/кг, с 1-х по 10-е сутки после перевивки опухоли; 3 – 100 мкМ/кг, с 1-х по 15-е сутки после перевивки опухоли.

щийся сигналом ЭПР со значениями g -фактора $g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,013$, $g_{ср} = 2,03$ [5,7].

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка оценок массы опухолей проведена с использованием пакета компьютерных программ «Statistica 6.0». Результаты оценок методом ЭПР концентрации М-ДНКЖ и нитрозильных комплексов гемопротеинов в образцах тканей мышей представлены как среднее значение (по трем образцам) \pm ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Противопухольная активность биядерной формы динитрозильного комплекса железа. Кинетические кривые, характеризующие влияние Б-ДНКЖ с глутатионом на развитие опухоли Льюис при подкожном введении комплекса в суточной дозе 100 мкМ/кг на протяжении 10 и 15 сут, приведены на рис. 1. При таком способе введения препарат тормозил развитие карциномы Льюис на 43% по сравнению с контролем на протяжении 14 сут. В дальнейшем действие препарата ослабевало и размеры опухолей у получавших Б-ДНКЖ животных практически не отличались от контроля независимо от длительности курса применения препарата (рис. 1, табл. 1). Средняя продолжительность жизни животных под влиянием подкожного введения Б-ДНКЖ увеличивалась на 30% по сравнению с контролем (табл. 1).

Влияние Б-ДНКЖ на развитие аденокарциномы Ca-755 иллюстрируется данными, пред-

Таблица 1. Противоопухолевая активность препарата Б-ДНКЖ на моделях карциномы легких Льюис и аденокарциномы Са-755

Штамм опухоли	Суточная доза и схема введения препарата	Время оценки эффекта, сут	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %	Средняя продолжительность жизни мышей, сут	$\Delta\tau$, %
Карцинома легких Льюис	100 мкМ/кг подкожно 1-е – 10-е сутки	14	2,1 ± 0,3	43	32 ± 4,8	29
		20	8,5 ± 0,7	5		
	100 мкМ/кг подкожно 1-е – 15-е сутки	14	2,1 ± 0,3	43	31,7 ± 5,8	28
		20	7,5 ± 0,6	16		
Аденокарцинома Са-755	Контроль	14	3,7 ± 0,4	–	24,8 ± 6,8	–
		20	9,0 ± 0,7	–		
	100 мкМ/кг внутривнутрибрюшинно 1-е – 10-е сутки	12	1,5 ± 0,2	37	25,6 ± 6,2	7
		12	2,4 ± 0,3	–	23,9 ± 4,7	–

ставленными на рис. 2 и в табл. 1. Внутривнутрибрюшинное введение препарата в суточной дозе 100 мкМ/кг в течение 10 сут приводило к торможению роста опухоли примерно на 40%, наблюдающемуся на протяжении 12 сут ее развития. При этом средняя продолжительность жизни животных с аденокарциномой Са-755 под влиянием Б-ДНКЖ возрастала не более, чем на 7% по сравнению с контролем (табл. 1). Таким образом, этот штамм опухоли оказался менее чувствительным к действию Б-ДНКЖ, чем карцинома Льюис.

Противоопухолевая активность S-нитрозоглутатиона. Предварительная оценка токсичности нитрозоглутатиона при внутривнутрибрюшинном шестикратном введении интактным мышам BDF₁ выявила хорошую переносимость препарата животными при применении в суточных

дозах 100, 200, 300 или 400 мкМ/кг, введенных в объеме 0,1–0,4 мл. В этих дозах препарат не вызывал гибель животных.

Влияние GS-NO на кинетику развития карциномы легких Льюис показано на рис. 3 и охарактеризовано данными, представленными в табл. 2. Из них следует, что десятикратное внутривнутрибрюшинное введение этого препарата в суточных дозах 200 и 400 мкМ/кг вызывало торможение роста опухолей на протяжении 18 сут. Наиболее выраженное ингибирование роста опухолей наблюдалось в течение 10 сут, т.е. в период введения препарата. Торможение роста опухолей составляло на 10-е сутки после перевивки 70 и 60% при суточном введении препарата в дозах 200 и 400 мкМ/кг соответственно. После окончания курса введения препарата торможение роста опухолей снижалось и на 18-е сутки составляло соответственно 30 и 20% по сравнению с контролем (рис. 3, табл. 2).

Влияние GS-NO на развитие аденокарциномы Са-755 характеризуют данные, представленные на рис. 4 и в табл. 2. Препарат эффективно тормозил развитие данного штамма опухоли в период его применения. Так, торможение роста опухоли на 10-е сутки ее развития к моменту окончания терапевтического воздействия составляло 90 и 50% при суточном введении GS-NO в дозах 200 и 400 мкМ/кг соответственно. В дальнейшем после окончания курса введения препарата наблюдалось снижение эффекта и показатель ингибирования роста опухолей на 14-е сутки не превышал 20 и 6% по сравнению с контролем при введении GS-NO в дозах 200 и 400 мкМ/кг соответственно (рис. 4, табл. 2).

Средняя продолжительность жизни животных с аденокарциномой Са-755 увеличивалась

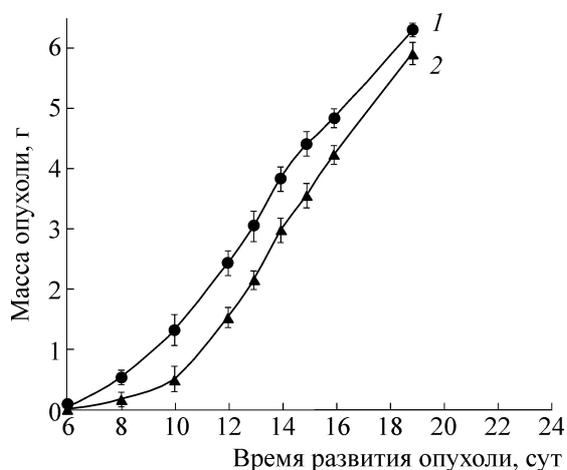


Рис. 2. Влияние препарата Б-ДНКЖ на развитие аденокарциномы Са-755: 1 – контроль; 2 – 100 мкМ/кг/сут, внутривнутрибрюшинное введение с 1-х по 10-е сутки после перевивки опухоли.

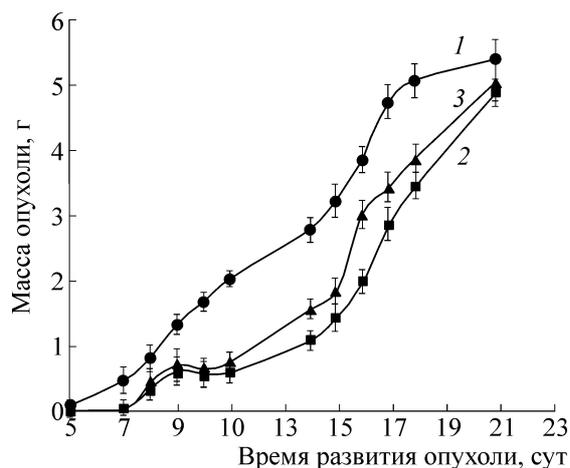


Рис. 3. Противоопухолевая активность препарата GS-NO на модели карциномы легких Льюис: 1 – контроль; 2 – GS-NO, 200 мкМ/кг/сут; 3 – GS-NO, 400 мкМ/кг/сут. Введение препарата внутривенно, с 1-х по 10-е сутки после перевивки опухоли.

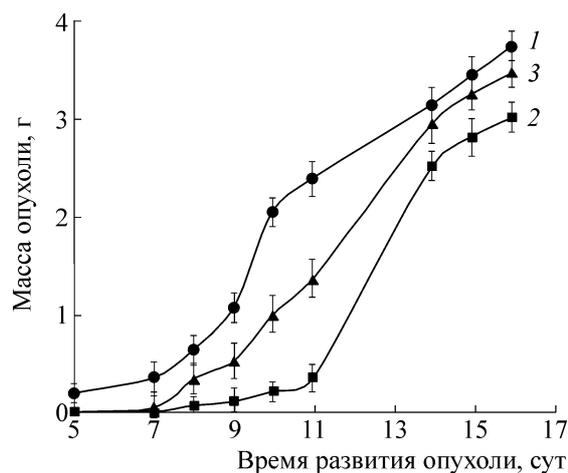


Рис. 4. Противоопухолевая активность препарата GS-NO на модели аденокарциномы Ca-755: 1 – контроль; 2 – GS-NO 200 мкМ/кг/сут; 3 – GS-NO 400 мкМ/кг/сут. Введение препарата внутривенно, с 1-х по 10-е сутки после перевивки опухоли.

под влиянием применения GS-NO в суточных дозах 200 и 400 мкМ/кг на 19 и 14% по сравнению с контролем соответственно (табл. 2).

Как уже отмечалось, активность препарата в отношении обеих изученных моделей опухолей со временем снижалась. При развитии карциномы Льюис торможение роста опухоли уменьшалось с 60–70%, наблюдавшихся на 10-е

сутки после перевивки, до 20–30%, регистрируемых на 18-е сутки при введении обеих доз препарата (рис. 4, табл. 2). На модели аденокарциномы Ca-755 это снижение активности препарата оказалось еще более выраженным: с 90 и 50%, отмеченных на 10-е сутки после перевивки при введении нитрозоглутатиона в дозах 200 и 400 мкМ/кг/сут соответственно, до

Таблица 2. Противоопухолевая активность препарата GS-NO на моделях карциномы легких Льюис и аденокарциномы Ca-755

Штамм опухоли	Суточная доза и схема введения препарата	Время оценки эффекта, сут	Средняя масса опухоли, г	TPO, %	Средняя продолжительность жизни мышей, сут	Δt, %
Карцинома легких Льюис	200 мкМ/кг внутривенно 1-е – 10-е сутки	10	0,5 ± 0,1	67	–	–
		14	1,0 ± 0,2	62		
		18	3,4 ± 0,4	32		
	400 мкМ/кг внутривенно 1-е – 10-е сутки	10	0,6 ± 0,2	62	–	–
		14	1,5 ± 0,4	44		
		18	3,8 ± 0,4	24		
Контроль	–	10	1,6 ± 0,4	–	–	–
		14	2,7 ± 0,7	–		
		18	5,0 ± 0,7	–		
Аденокарцинома Ca-755	200 мкМ/кг внутривенно 1-е – 10-е сутки	10	0,2 ± 0,1	90	29,2 ± 7,6	19
		14	2,5 ± 0,5	20		
		18	3,1 ± 0,6	–		
	400 мкМ/кг внутривенно 1-е – 10-е сутки	10	1,0 ± 0,2	51	28 ± 6,7	14
		14	2,9 ± 0,6	6		
Контроль	–	10	2,0 ± 0,3	–	24,6 ± 2,3	–
		14	3,1 ± 0,6	–		

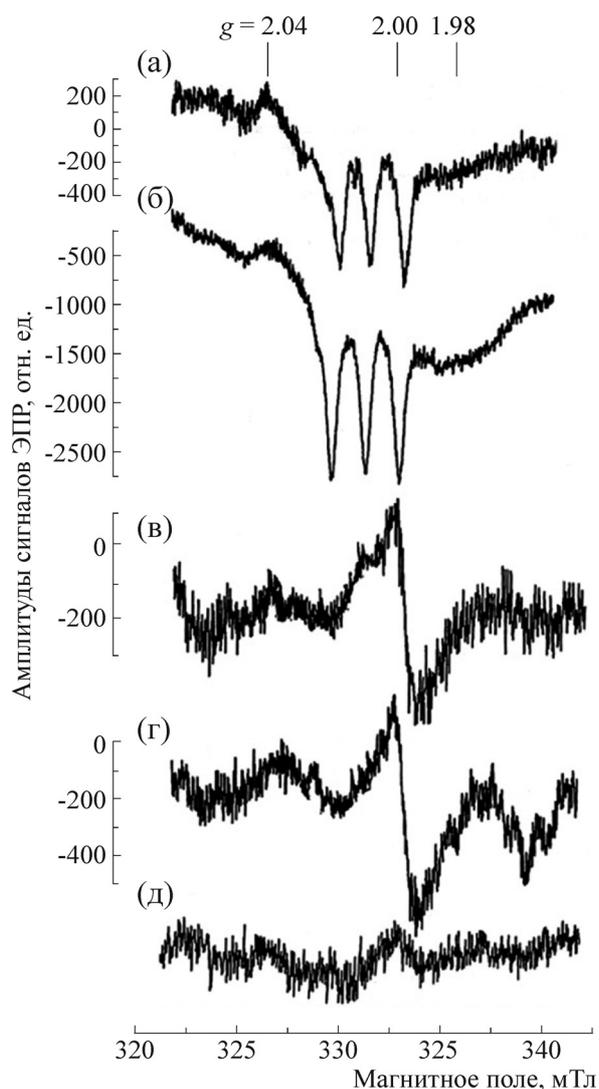


Рис. 5. Типичные спектры ЭПР тканей опухоли Льюис в опыте (а) и контроле (б), печени в опыте (в) и контроле (г) и крови животных (д), подвергнутых воздействию GS-NO в течение 10 сут после перевивки опухоли с последующим забором тканей на 22-е сутки развития опухоли. Сигнал при $g = 2,04$ в спектрах (а) и (б) обусловлен М-ДНКЖ, сигнал при $g = 2,0$ в спектрах ЭПР печени и крови – свободно-радикальными центрами, сигнал с триплетной сверхтонкой структурой и компонентой при $g = 1,98$ в спектрах (а) и (б) – нитрозильными комплексами гемопротенинов. Спектры зарегистрированы при 77 К. Слева приведена градуировка амплитуды сигналов ЭПР в относительных единицах.

20 и 6% на 14-е сутки наблюдения (рис. 4, табл. 2).

Обращает внимание тот факт, что в течение всего периода наблюдения GS-NO проявлял более высокую эффективность при применении в меньшей дозе 200 мкМ/кг/сут по сравнению с дозой 400 мкМ/кг/сут в отношении обоих штаммов опухолей, причем наиболее заметно

это различие проявлялось в опытах на модели аденокарциномы Са-755.

ЭПР-анализ тканей мышей, обработанных S-нитрозоглутатионом. ЭПР-измерения образцов тканей мышей (опухоль, печень, селезенка, почки, кровь), взятых на 22-е сутки развития карциномы Льюис, спустя 11 сут после воздействия GS-NO внутрибрюшинно на протяжении 10 сут, показали следующее.

В спектре ЭПР опухолей контрольных и леченых животных доминировал сигнал нитрозильных комплексов гемопротенинов, характеризующийся триплетной сверхтонкой структурой (рис. 5а,б) и компонентой при $g = 1,98$, впервые зарегистрированной в злокачественных опухолях в работах [8–10].

Значительного различия в интенсивности этого сигнала (по результатам измерений трех образцов) для опухолей в опыте и контроле не обнаруживалось. Концентрация нитрозильных комплексов гемопротенинов в этих образцах составляла 10 ± 5 нМ нитрозильных комплексов гемопротенинов на 1 г влажной ткани. Очевидно, в обоих случаях образование нитрозильных комплексов гемопротенинов было обусловлено появлением в ткани опухоли NO, образующегося из эндогенных источников. Что касается вклада в этот процесс GS-NO как экзогенного донора, оно через 11 сут после последнего введения этого соединения животным, очевидно, полностью нивелировалось.

То же самое можно сказать и в отношении небольшого количества М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (менее 0,5 нМ на 1 г влажной ткани), обнаруживаемого в опухолях опытных и контрольных животных по слабому сигналу ЭПР при $g = 2,04$ (рис. 5а,б).

Сигналы ЭПР нитрозильных комплексов гемопротенинов и М-ДНКЖ не обнаруживались в тканях других органов – печени (рис. 5в,г), селезенки, почек и крови. Спектры ЭПР этих тканей не отличались от тканей интактных животных (не показано).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показывают, что комплекс Б-ДНКЖ с глутатионом и GS-NO одинаковым образом влияют на развитие перевиваемых опухолей мышей – карциному легких Льюис и аденокарциному Са-755: они подавляют это развитие на начальной его стадии с последующим ростом опухолей на конечной стадии развития, причем иногда даже более быстрым, чем в контроле (рис. 1–4).

Поскольку общим для Б-ДНКЖ с глутатионом и GS-NO является их способность выступать в живых системах в качестве доноров NO [4,11,12], очевидно, что именно этот агент был ответственным за обнаруженное действие ДНКЖ и GS-NO на опухоли.

Такого рода реакция опухолей на воздействие ДНКЖ и GS-NO повторяет картину, характерную для химиотерапии злокачественных опухолей, при которой период ингибирования роста опухоли сменяется ее рецидивированием за счет пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток, устойчивых к действию применявшихся доноров NO.

Появление устойчивой к действию Б-ДНКЖ и GS-NO фракции клеток карциномы Льюис и аденокарциномы Ca-755 могло быть обусловлено двумя факторами – выработкой в злокачественных клетках систем антинитрозативной или антиоксидантной защиты, а скорее всего, одновременно этих двух систем.

Первая система, кстати, характерная для многих видов бактерий [13], могла обеспечивать удаление из клеток попадающего в них NO, что могло достигаться либо окислением (до диоксида азота), либо восстановлением (до закиси азота) последнего соответствующими ферментами, характерными для системы антинитрозативной защиты. В отсутствие последней гибель клеток, приводящая к замедлению роста опухоли на начальной стадии ее развития, могла быть обусловлена появлением в клетках значительного количества пероксинитрита (ONOO^-), возникающего в реакции NO и аниона супероксида [4]. Распад протонированной формы последнего на цитотоксические диоксид азота и особенно гидроксильный радикал должен был приводить к гибели клеток [14].

Выработка системы антинитрозативной защиты, приводящая к снижению в клетках уровня NO и тем самым пероксинитрита, должна была повышать выживаемость клеток опухолей. К тому же результату должно было приводить и повышение антиоксидантного потенциала злокачественных клеток, способного снимать прооксидантное, разрушительное действие гидроксильных радикалов, образующихся при распаде протонированного пероксинитрита.

Обращает на себя внимание более эффективное цитостатическое действие GS-NO на оба типа опухолей по сравнению с влиянием на них комплекса Б-ДНКЖ с глутатионом (рис. 1,2 и табл. 1, с одной стороны, и рис. 3, 4 и табл. 2 – другой стороны).

Не исключено, что это различие обусловлено более быстрым распадом GS-NO в организме

животных по сравнению с распадом Б-ДНКЖ, как это следует из данных работы [15], полученных при изучении гипотензивного действия этих доноров NO на животных.

Выброс в короткое время значительного количества NO из распадающегося GS-NO может приводить к появлению в тканях значительного количества пероксинитрита и, тем самым, к более эффективному цитотоксическому эффекту GS-NO по сравнению с медленно распадающимся Б-ДНКЖ. О последнем свидетельствует сохранение, по данным ЭПР-анализа, М-ДНКЖ в опухолях и в других тканях мышей-опухоленосителей через сутки после введения им Б-ДНКЖ [2].

В наших предыдущих исследованиях противоопухолевого действия Б-ДНКЖ с глутатионом [1,2] препарат вводился ежедневно в течение 10 сут, что приводило к существенному подавлению роста опухолей в этот период. В связи с этим можно было предположить, что последующий рост опухолей был обусловлен ингибирующим действием ДНКЖ, точнее, выделяющегося из этих комплексов NO, на белки антинитрозативной защиты. Для проверки этого предположения в настоящей работе было увеличено число введений ДНКЖ с 10 до 15 сут. Как следует из данных, приведенных на рис. 1, это увеличение практически не сказалось на характере действия комплекса ДНКЖ с глутатионом на опухоль Льюис. Таким образом, предполагаемый механизм цитотоксического действия этих комплексов, по крайней мере на опухоль Льюис, не был обусловлен ингибирующим действием ДНКЖ, а точнее, выделяющегося из этих комплексов NO, на белки антинитрозативной защиты.

Как следует из результатов исследования влияния GS-NO на развитие обоих штаммов опухолей, цитотоксическое действие этого агента на опухоли снижалось при повышении суточной дозы GS-NO с 200 до 400 мкМ/кг. Такого эффекта, согласно результатам работы [2], не обнаруживалось для Б-ДНКЖ с глутатионом: при повышении его суточной дозы со 100 до 200 мкМ/кг (в пересчете на одну железо-динитрозильную ($\text{Fe}(\text{NO})_2$) группу) цитотоксическое действие этих комплексов на карциному Льюис усиливалось. Если же учесть, что одна группа $\text{Fe}(\text{NO})_2$ могла высвобождать две молекулы NO, то при повышении количества NO, высвобождаемого из Б-ДНКЖ и из GS-NO, при увеличении дозы последнего с 200 до 400 мкМ/кг, следует признать, что характер действия Б-ДНКЖ и GS-NO на опухоль Льюис изменяется противоположным образом.

Возникает вопрос, почему по мере повышения дозы GS-NO его противоопухолевое действие ослаблялось? Для ответа на него следует напомнить, что аналогичный эффект наблюдался ранее в экспериментах на животных с экспериментальным эндометриозом, а именно, Б-ДНКЖ с глутатионом подавлял рост доброкачественных эндометриоидных опухолей, тогда как GS-NO усиливал этот рост [16,17]. Последнее, в соответствии с имеющимися на этот счет данными мексиканских исследователей [12], могло быть обусловлено ослаблением у животных иммунитета при действии на них S-нитрозотиолов.

Таким образом, GS-NO мог поставлять NO не только опухолям, но и другим тканям и клеткам, в частности иммунокомпетентным клеткам, что и могло приводить к инактивации последних и тем самым к усилению роста опухолей.

Что касается Б-ДНКЖ, они, как предполагается в работах [16,17], могли поставлять NO только опухолевым клеткам, что было обусловлено избирательным разрушением этих комплексов эндогенными хелаторами железа, продуцируемых опухолями для их обеспечения железом.

Таким образом, исходя из факта ослабления цитотоксического действия GS-NO на карциному Льюис при повышении его дозы, можно говорить о неизбирательности действия этого донора NO на опухоли, отличающего его от Б-ДНКЖ, избирательно действующего на последние.

В заключение остановимся на результатах ЭПР-анализа тканей мышей – носителей карциномы Льюис. Наиболее интересным здесь представляется обнаружение нитрозильных комплексов гемопротеинов в опухолях, и только в опухолях, по характерному для них триплетному сигналу ЭПР с расщеплением ~1,7–1,8 мТл (рис. 5). Как уже отмечалось, такого рода сигнал ЭПР был зарегистрирован в разнообразных злокачественных опухолях еще в 60-е–70-е годы прошлого столетия [8–10]. Не

исключено, что образование ответственных за этот сигнал нитрозильных комплексов гемопротеинов является показателем функционирования иммунной системы, «пытающейся» с помощью NO вызвать гибель опухолевых клеток.

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. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **35**, 110 (2013).
4. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004).
5. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 136 (2010).
6. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в кн. *«Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ»*, под ред. Р. У. Хабриева, изд. 2 (Медицина, М., 2005).
7. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2**, 234 (1998).
8. M. I. Brennan, T. Cole, and J. A. A. Singley, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **123**, 715 (1966).
9. N. M. Emanuel, A. N. Saprin, V. A. Shabalkin, et al., *Nature* **222**, 165 (1969).
10. T. Mariyama, N. Kataoka, S. Nagase, et al., *Cancer Res.* **31**, 179 (1971).
11. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **29**, 4 (2013).
12. J. Mier-Cabrera, S. Gonzalez-Collardo, and C. Hernandez-Guerrero, *Reprod. Sci.* **2**, 132 (2013).
13. J. Green, M. D. Rolfe, and L. J. Smith, *Virulence* **5**, 1 (2013).
14. D. Berg, M. B. Youdim, and P. Riederer, *Cell Tissue Res.* **318**, 211 (2004).
15. E. N. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **26**, 148 (2012).
16. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, L. V. Adamyan, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **727**, 140 (2014).
17. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, L. V. Adamyan, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **741**, 37 (2014).

Anti-Tumour Activity of Dinitrosyl Iron Complex with Glutathione and S-Nitrosoglutathione Preparations: Comparative Studies

A.F. Vanin*, **L.A. Ostrovskaya****, **D.B. Korman****, **L.N. Kubrina***, **R.R. Borodulin***,
M.M. Fomina**, **N.V. Bluchterova****, **V.A. Rykova****, and **A.A. Timoshin*****

**Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

***Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

****Russian Cardiology Research and Production Complex, Russian Ministry of Health,
ul. 3-ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121522 Russia*

The anti-tumor activity of the binuclear form of dinitrosyl iron complexes with glutathione against Lewis lung carcinoma, found earlier upon intraperitoneal administration of the complexes, was also observed when this preparation was injected subcutaneously. A 100 $\mu\text{M}/\text{kg}$ subcutaneous dose of the complex being used daily (as calculated per one iron atom in binuclear dinitrosyl iron complexes) for 10 or 15 days, inhibited the tumor growth by 43%. The effect was observed during the first two weeks after tumor transplantation. After that, the tumors began to grow at the rate equal to or even higher than that one for control animals. The mean survival time for treated mice exceeded the control values by 30%. Binuclear dinitrosyl iron complexes administered intraperitoneally was also effective against Ca-755 adenocarcinoma. However, in this case the mean survival time for treated animals increased only by 7%. The anti-tumor activity of S-nitrosoglutathione against Lewis lung carcinoma growth inhibition by 70% and Ca-755 adenocarcinoma growth inhibition by 90% was also shown. However, unlike binuclear dinitrosyl iron complexes the anti-tumor effect of S-nitrosoglutathione decreased when a daily dose of the compound increased (from 200 to 400 $\mu\text{M}/\text{kg}$) The initial anti-tumor effect of binuclear dinitrosyl iron complexes and S-nitrosoglutathione is suggested to be due to NO released from both compounds. A subsequent suppression of the effect is determined by the development of anti-nitrosative and anti-oxidant defense systems in tumors.

Key words: dinitrosyl iron complexes, S-nitrosoglutathione, NO, Lewis lung carcinoma, Ca-755 adenocarcinoma