

На правах рукописи

КЛЮШОВА
Любовь Сергеевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ФЕНОЗАНОВОЙ КИСЛОТЫ И КООРДИНАЦИОННЫХ
СОЕДИНЕНИЙ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ С N-ДОНОРНЫМИ
ЛИГАНДАМИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК В МОДЕЛЯХ
IN VITRO С ПОМОЩЬЮ МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОГО
СКРИНИНГА**

1.5.4 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск

2022

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте молекулярной биологии и биофизики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (НИИМББ ФИЦ ФТМ).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, **Вавилин Валентин Андреевич**
член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты:

Сорокина Ирина Васильевна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований федерального государственного бюджетного учреждения науки «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук» (НИОХ СО РАН)

Сметанина Мария Александровна, кан-т биол. наук, научный сотрудник лаборатории фармакогеномики федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН» (ИХБФМ СО РАН)

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ)

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в ____ час. на заседании диссертационного совета 24.1.242.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ) и на сайте <https://frcftm.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Онкологические заболевания – серьезная проблема современной медицины. Во всем мире в решение задач профилактики, диагностики и лечения злокачественных новообразований вкладываются огромные ресурсы. Поиск и разработка новых противоопухолевых препаратов является ключевым направлением деятельности многих фармацевтических компаний и научных групп. Учитывая значительные научно-технические достижения последних десятилетий в области методологии исследований, такие как введение высокопроизводительного скрининга (high throughput screening, HTS), можно было ожидать, что выход новых препаратов в клинику достигнет рекордно высокого уровня. Но фактически выпуск новых лекарств остается в значительной степени статичным. По данным Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, <https://www.fda.gov/drugs/>) с 2015 по 2021 год ежегодно регистрировалось в среднем 46 лекарственных препаратов, из которых доля противоопухолевых лекарств составляла от 23 до 32 % ежегодно. Это указывает на большое внимание, уделяемое исследованиям в данной области. Большинство новых зарегистрированных препаратов представляет собой малые молекулы с Cl и F в составе и моноклональные антитела. Преимущественно они направлены на лечение меланомы, мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легкого, рака крови и рака молочной железы.

Отчасти низкая продуктивность вывода новых лекарств в клинику связана с тем, что многие препараты не показывают эффективности на ранних стадиях разработки (на этапе первичного скрининга) по причине некорректно установленной терапевтической мишени и/или неправильно выбранной модели заболевания, а также из-за отсутствия дополнительной информации об эффектах тестируемого агента за пределами гипотезы о терапевтической мишени. Все это может происходить вследствие выбора неверной стратегии поиска новых лекарств, что приводит к необходимости формирования новых подходов при первичном скрининге (Berg, 2021; Moffat et al., 2017; Stahl, 2016; Swinney, 2021, 2013; Swinney and Lee, 2020; Vincent et al., 2022).

Технология многопараметрического скрининга на основе микроскопии (high content screening, HCS) позволяет выполнять большой объем исследований за короткое время и дает возможность оценивать как целевые гены, вовлеченные в патологический процесс, так и выявлять возможные фенотипические изменения клеток, тем самым расширяя область поиска возможных эффектов соединений (Marwick et al., 2021; Masters, 2010; Thoumine et al., 1999; Zamanian and Chan, 2021). Специальное программное обеспечение для HCS позволяет получать

количественную многопараметрическую информацию из изображений и характеризовать клеточные фенотипы в целом для тех или иных экспериментальных условий. Определение причинно-следственных связей между изменением функций мишеней и фенотипическими эффектами может открыть новые и неожиданные пути развития биологии опухоли и представляет собой наилучший способ обнаружения лекарств.

В связи с углублением понимания процессов канцерогенеза, появилось множество направлений в рациональном дизайне малых молекул в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Так, окислительный стресс является хорошо задокументированным явлением при канцерогенезе (Forman and Zhang, 2021; Waris and Ahsan, 2006). Было сделано предположение, что воздействие на антиоксидантную систему может значительно снизить заболеваемость и прогрессирование опухоли (Neha et al., 2019). Это привело к поиску противоопухолевых агентов среди синтетических ингибиторов свободнорадикального окисления (Singh et al., 2018; Yun et al., 2015). Одними из наиболее известных антиоксидантов являются алкилированные фенолы, содержащие в качестве заместителей функциональные группы с двухвалентной серой, селеном или теллуrom (Farzaliyev et al., 1978; Meier et al., 1999; Viglianisi and Menichetti, 2019). Однако такие соединения изучены недостаточно, информация об их эффективности противоречива.

Важное место среди малых молекул, как потенциальных противоопухолевых агентов, занимают комплексы переходных металлов (Gasser et al., 2011; Rafique et al., 2010; Zhang and Sadler, 2017). В природе металлы являются важными компонентами многих биологических систем. Это положило начало разработке препаратов на основе металлов. Их способность координировать лиганды трехмерным образом в соответствии с различными координационными числами и геометрией позволяет создавать уникальные молекулярные структуры, специально предназначенные для взаимодействия с определенными мишенями, что невозможно реализовать с помощью обычных молекул на основе углерода. Открытие цисплатина и его производных стало важным этапом развития этой области (Tsvetkova and Ivanova, 2022). В настоящее время активно ведутся разработки новых поколений химиотерапевтических средств на основе переходных металлов для преодоления серьезных нежелательных явлений, наряду с возникновением лекарственной устойчивости.

Решающее значение для предотвращения пагубных эффектов и предварительной оценки возможности межлекарственного взаимодействия имеет исследование потенциальных взаимодействий между новыми молекулами и цитохромами P450 (CYP) на ранних этапах скрининга, так как ингибирование и индукция CYP, в особенности CYP 2C9, 2C19, 2D6 и 3A4, являются основными механизмами фармакокинетического

взаимодействия лекарств (Esteves et al., 2021; Rendic and Guengerich, 2015; Zanger and Schwab, 2013).

Поскольку новые S- и Se-содержащие алкилфенолы и координационные соединения переходных металлов представляют фундаментальный интерес, а биологические эффекты, вызываемые этими соединениями, разнообразны, но слабо изучены, определение эффективной стратегии скрининга и изучение свойств данных соединений является актуальной задачей для современной биохимии.

Степень разработанности темы исследования. Поиск новых малых молекул, обладающих противоопухолевым действием, ведется во многих направлениях, в том числе в ряду фенольных халькогенсодержащих антиоксидантов и в ряду комплексов переходных металлов.

До недавнего времени в ряду фенольных антиоксидантов подавляющее большинство соединений обладало липофильными свойствами, а число водорастворимых форм было весьма ограничено. Однако разработки направленного синтеза позволили значительно расширить число гидрофильных соединений. Возможность их применения в различных областях биологии и медицины активно исследуется (Bernini et al., 2012; Liu et al., 2022).

Развивается координационная и медицинская химия разнолигандных комплексов переходных металлов. За последнее десятилетие появилось значительное количество новых соединений, обладающих биологической активностью и предположительно богатым потенциалом в области медицины. Широко известна серия цитотоксичных комплексов Casioreinas с общей формулой $[\text{Cu}(\text{олигопиридин})(\text{H}_2\text{O})\text{L}]\text{NO}_3$, где L – аминокислота или ацетилацетонат, так как в настоящее время одно соединение этой серии проходит первую фазу клинических исследований (Masuri et al., 2021). Определенный успех Casioreinas привел к появлению огромного количества новых соединений с заменой лиганда L в комплексах этой серии, а также координационных соединений других эссенциальных металлов (Mn, Co, Zn и т.д.) с олигопиридинами. Так как свойства координационных соединений сильно зависят как от природы металла, так и от его лигандного окружения, подобные замены могут приводить к существенным изменениям их биологических свойств. Еще одним ярким примером являются комплексы рутения НАМИ-А $\{(\text{ImH})[\text{транс-Ru}(\text{DMCO})(\text{Im})\text{Cl}_4, \text{Im} - \text{имидазол}\}$, KP1019 $\{(\text{IndH})[\text{транс-Ru}(\text{Ind})_2\text{Cl}_4], \text{Ind} - \text{индазол}\}$ и KP1339 $\{\text{Na}[\text{транс-Ru}(\text{Ind})_2\text{Cl}_4]\}$ (Alessio and Messori, 2019). Несмотря на структурное сходство биологические и фармакологические профили этих соединений сильно различаются. Что касается нитрозокомплексов рутения, то они в основном рассматриваются

как переносчики NO, способные выделять NO после фотоактивации или восстановления (Tfouni et al., 2011).

Таким образом, очевидными становятся как интерес в научном мире к фенольным халькогенсодержащим соединениям и координационным соединениям переходных металлов, так и необходимость применения высокопроизводительных технологий в изучении их биологических эффектов.

К моменту начала данной работы научной группой кафедры химии НГПУ и сотрудниками ИНХ СО РАН были синтезированы и охарактеризованы новые соединения, потенциально обладающие противоопухолевой активностью: гидрофильные халькогенсодержащие фенольные антиоксиданты и координационные соединения переходных металлов с N-донорными лигандами. Однако исследование их биологических свойств не проводилось, либо ограничивалось отдельными биохимическими анализами.

Цель настоящей работы – исследовать цитотоксические и цитостатические свойства, а также влияние на индукцию цитохромов P450 2C и 3A новых производных фенозановой кислоты и координационных соединений переходных металлов с N-донорными лигандами в культурах опухолевых клеток человека методами многопараметрического скрининга.

Задачи:

1. Провести первичный скрининг новых соединений для изучения цитотоксической и цитостатической активности на 2D- и 3D-культурах опухолевых клеток человека (аденокарциномы молочной железы MCF-7, карциномы гортани Hep-2 и гепатоцеллюлярной карциномы HepG2) в сравнении с активностью на неопухолевых фибробластах человека MRC-5 и мезенхимальных стволовых клетках человека МСК.
2. Исследовать влияние гидрофильных производных фенозановой кислоты на жизнеспособность клеток Hep-2, HepG2, MCF-7 и МСК в модели окислительного стресса, индуцированного H₂O₂.
3. Определить влияние фотоиндуцирующего излучения на цитотоксическую и цитостатическую активность нитрозокомплексов рутения.
4. Сравнить фенотипические изменения в клеточных популяциях Hep-2 и MCF-7 при воздействии новых соединений с таковыми у соединений с известным механизмом действия, используя метод многопараметрического скрининга с красителями Hoechst и DiD.
5. Изучить на клетках HepG2 влияние координационных соединений переходных металлов на уровень мРНК и белка основных цитохромов P450, ответственных за метаболизм лекарственных препаратов: CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19.

Научная новизна работы. Впервые подробно исследована цитотоксическая и цитостатическая активность новых соединений, представленных в данной работе, на 2D-культурах опухолевых клеток человека MCF-7, Her-2, HerG2 и неопухолевых фибробластов MRC-5, а также 3D-культуре HerG2.

Показано, что селен- и серосодержащие производные фенозана калия проявляют низкую цитотоксическую и цитостатическую активность. Антиоксидантная активность фенозана калия и его Se- и S-содержащих производных подтверждена в модели окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 . Установлено, что исследованные халькогенсодержащие фенольные соединения способны усиливать клеточную гибель в концентрациях > 25 мкМ при дополнительной генерации активных форм кислорода (АФК) для некоторых типов клеток.

Показано, что среди координационных соединений меди(II), марганца (II) и кобальта(II) с олигопиридинами и производными тетразола комплексы меди(II) проявляют выраженную дозозависимую цитотоксическую активность, а комплексы марганца(II) – цитостатическую. Наличие производного тетразола оказывает существенное влияние на их селективность для разных типов клеток и цитостатическую и цитотоксическую активность для 3D-культуры.

Нитрозокомплексы рутения проявляют дозозависимую цитотоксическую и цитостатическую активность на 2D- и 3D-модели клеток, которая зависит как от фрагмента изоникотиновой или никотиновой кислоты, так и от фрагмента метилового или этилового эфира в структуре нитрозокомплекса рутения. Активность комплекса с γ -пиколином соответствует активности соединения с метилизоникотинатом. Фотоиндуцирующее излучение (445 нм, 30 мВт, 30 мин) в 2 раза снижает цитотоксическую и усиливает цитостатическую активность комплекса с этилизоникотинатом.

Впервые исследовано влияние полученных оригинальных соединений на экспрессию основных цитохромов P450, ответственных за метаболизм лекарств. Показано, что комплексы $[Cu(L)_2]$, $[Cu_2(phen)_2(ФТ)_4]$ и $\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O\}_n$ являются индукторами CYP3A4, для комплексов $[Cu_2(phen)_2(ФТ)_4]$ и $\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O\}_n$ наблюдается тенденция к снижению экспрессии CYP2C9. Индуцирующее действие комплексов на CYP3A4 зависит как от производного тетразола, так и от олигопиридина.

Нитрозокомплексы рутения $[RuNOCl_3(NicMe)_2]$, $[RuNOCl_3(NicEt)_2]$, $[RuNOCl_3(InicMe)_2]$ и $[RuNOCl_3(InicEt)_2]$ оказывают индуцирующее действие на CYP3A4 и CYP2C19 и не влияют на экспрессию CYP2C9. Наличие фрагмента никотиновой/ изоникотиновой кислот в структуре комплекса влияет на экспрессию CYP2C19: комплексы с

метилизоникотинатом и этилизоникотинатом индуцируют *CYP2C19* в более низких концентрациях по сравнению с комплексами с метилникотинатом и этелникотинатом, соответственно. Комплекс $[\text{RuNOCl}_3(\gamma\text{-Pic})_2]$ оказывает индуцирующий эффект на *CYP3A4*.

Показана возможность использования фенотипического скрининга на основе красителей Hoechst и DiD в *in vitro* модели, для выявления соединений, обладающих активностью, схожей с активностью соединений с известным механизмом действия. Выявлены фенотипические изменения клеток, характеризующие митотическую катастрофу.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование биологических свойств новых соединений, потенциально обладающих противоопухолевой активностью, является существенным вкладом в фундаментальные знания в области медицинской биохимии. Установленные взаимосвязи «структура – активность» могут быть впоследствии использованы для направленного синтеза новых соединений с заданными функциональными свойствами. Ряд соединений, таких как исследованные нитрозокомплексы рутения, $[\text{Cu}_2(\text{phen})_2(\text{ФТ})_4]$, $[\text{Cu}_2(\text{bipy})_2(\text{ФТ})_4]$, комплексы марганца(II) и Se-содержащее производное фенозана калия можно использовать для дальнейших исследований в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

Методология и методы исследования. Диссертационное исследование проводилось с применением современной технологии многопараметрического скрининга, молекулярно-биологических и биохимических методов. Исследование влияния соединений на жизнеспособность клеток проводили на 2D- и 3D-клеточных моделях с помощью фенотипического скрининга. Антиоксидантная активность фенольных соединений дополнительно изучалась спектрофотометрическими методами. С помощью целевого скрининга исследовали влияние соединений на уровни мРНК и белка *CYP2C9*, *CYP2C19* и *CYP3A4*. Результаты индукции *CYP3A4* подтверждали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией в реальном времени.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Определены связь «структура – цитотоксическая и цитостатическая активность» и дозовая зависимость цитотоксической и цитостатической активности для каждого ряда исследованных соединений.
2. Новые S- и Se-содержащие производные фенозана калия проявляют антиоксидантную активность в модели индуцированного H_2O_2 окислительного стресса, зависящую от типа клеток: в высоких концентрациях они способны усиливать клеточную гибель при дополнительной генерации активных форм кислорода.

3. Координационные соединения меди(II) с олигопиридинами и нитрозокомплексы рутения проявляют цитотоксическую активность сравнимую или превосходящую активность цисплатина и карбоплатина, соединения марганца(II) оказывают сильный цитостатический эффект. Фотоиндуцирующее излучение влияет на активность нитрозокомплекса рутения с этилизоникотинатом.
4. Соединения меди(II) оказывают индуцирующее действие на экспрессию *CYP3A4*. Нитрозокомплексы рутения индуцируют экспрессию *CYP2C19* и *CYP3A4*.
5. Фенотипический скрининг на основе красителей Hoechst и DiD позволяет характеризовать фенотипы опухолевых клеток человека при воздействии новых соединений и сравнивать их с клеточными фенотипами, вызываемыми препаратами с известными механизмами действия.

Личный вклад соискателя. Автор принимал непосредственное участие в планировании экспериментов и лично выполнил весь блок исследований. Соединения для изучения были любезно предоставлены научными группами под руководством к.х.н. Лидер Е. В. и д.х.н., доцента Костина Г. А. (ИНХ СО РАН), а также научной группой под руководством д.х.н., профессора Кандалицевой Н. В. (НГПУ). Совместно с научным руководителем и соавторами проводилась подготовка статей и тезисов докладов к публикации.

Апробация результатов. Результаты диссертационной работы были представлены на международных и всероссийских конференциях: Конгресс молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (2018, г. Томск), 3-я Школа ADFLIM (Advanced Fluorescence Imaging Methods, 2018 г., г. Саратов), XX Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (2019, г. Гатчина), VI Съезд биофизиков России (2019, г. Сочи), Первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии MEDCHEMSCHOOL2021 (2021, г. Новосибирск), Всероссийская конференция с международным участием «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (2022, г. Новосибирск).

Степень достоверности. Воспроизводимость полученных результатов и согласованность данных различных методов исследования подтверждают достоверность результатов. Публикации в рецензируемых журналах свидетельствуют о значимости полученных результатов и их признании научным сообществом.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей и 7 тезисов в журналах, индексируемых в базах научной литературы Web of Science и Scopus и входящих в список ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 153 страницах, содержит 43 рисунка и 17 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы (гл.1), экспериментальной части (гл. 2), результатов (гл. 3) и их обсуждений (гл. 4), заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы (374 наименования).

Диссертационная работа выполнена в Научно-исследовательском институте молекулярной биологии и биофизики – структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (НИИМББ ФИЦ ФТМ) с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ» ФИЦ ФТМ, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691). Работа проводилась в рамках бюджетного научного проекта ФИЦ ФТМ № гос. регистрации АААА-А18-118012490236-3. Исследование было поддержано РФФИ в рамках научного проекта №19-34-90129 (руководитель Вавилин В.А.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

В настоящей работе с помощью многопараметрического скрининга исследованы цитотоксические и цитостатические свойства, а также влияние на индукцию цитохромов P450 2C и 3A новых соединений: S- и Se-содержащих производных фенозановой кислоты; комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II) с олигопиридинами и производными сенамина и тетразола; нитрозокомплексов рутения с метиловым/ этиловым эфиром никотиновой и изоникотиновой кислоты и γ -пиколином.

Результаты

1. Влияние производных фенозановой кислоты на жизнеспособность клеток

Результаты исследования цитотоксической и цитостатической активности фенозана калия **1**, его S- и Se-содержащих производных **2a** и **3a**, а также исходных S- и Se-содержащих гидрофобных кислот **2** и **3** на 2D-культурах Hep-2, MCF-7, HepG2 и мезенхимальных стволовых клеток МСК с помощью метода двойного окрашивания Hoechst/ PI показали, что активность фенольных соединений можно ранжировать в следующем порядке: Se-содержащие >> фенозан калия > S-содержащие (табл. 1).

По сравнению с другими типами клеток HepG2 чувствительнее к воздействию фенозана калия **1** и S-содержащих веществ **2** и **2a**, Se-содержащие соединения **3** и **3a** сильнее воздействуют на клетки Hep-2 и МСК, чем на HepG2 и MCF-7. Следует отметить, что цитотоксическая активность Se-содержащей соли **3a** и исходной кислоты **3** сравнимы для всех типов клеток, а цитостатическая активность отличается: для

опухолевых клеток активность соли **3a** выше, чем у кислоты **3**, а для МСК активности веществ **3** и **3a** сравнимы.

Таблица 1. Цитотоксическая (LC₅₀) и цитостатическая (IC₅₀) активность фенольных соединений для клеток HepG2, Hep-2, MCF-7 и МСК после 48 часов инкубации.

Соединение	LC ₅₀ , мкМ				IC ₅₀ , мкМ			
	HepG2	Hep-2	MCF-7	МСК	HepG2	Hep-2	MCF-7	МСК
1 C ₁₇ H ₂₅ KO ₃	3899 ± 39	>5000	> 5000	3901 ± 39	964 ± 19	1911 ± 38	2628 ± 52	1652 ± 33
2 C ₁₂ H ₁₆ O ₃ S	5729 ± 58	> 5000	> 5000	> 5000	2672 ± 106	3478 ± 35	> 5000	3807 ± 115
2a C ₁₂ H ₁₅ KO ₃ S	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	3617 ± 72	3734 ± 37	5895 ± 59	4215 ± 85
3 C ₂₀ H ₃₂ O ₃ Se	338 ± 20	235 ± 18	375 ± 30	193 ± 19	413 ± 12	224 ± 5	652 ± 54	166 ± 11
3a C ₂₀ H ₃₁ KO ₃ Se	326 ± 4	190 ± 6	459 ± 28	201 ± 29	237 ± 2	144 ± 11	265 ± 10	178 ± 19

Результаты спектрофотометрического исследования общей антиоксидантной активности (АОА) гидрофильных соединений **1**, **2a** и **3a** на основе реакций восстановления Fe(III) до Fe(II) и удаления радикалов DPPH[·] и ABTS^{·+} показали, что исследуемые соединения являются антиоксидантами (табл. 2). Различия в порядке активности соединений, полученные этими методами, можно объяснить разной продолжительностью инкубации с антиоксидантами, реакционной средой и значениями рН (Huang et al., 2005).

Таблица 2. Общая антиоксидантная активность гидрофильных фенольных соединений относительно удаления радикалов DPPH[·] и ABTS^{·+} и восстановления ионов железа. Аскорбиновую кислоту использовали в качестве эталонного антиоксиданта.

Соединение		IC ₅₀ ¹ , мкМ		мкмоль Fe(II)/мг соединения ²
		DPPH [·]	ABTS ^{·+}	
1	C ₁₇ H ₂₅ KO ₃	> 20	6,5 ± 0,2	3,9 ± 0,1
2a	C ₁₂ H ₁₅ KO ₃ S	22,9 ± 0,6	5,5 ± 0,1	7,2 ± 0,2
3a	C ₂₀ H ₃₁ KO ₃ Se	> 20	3,7 ± 0,1	3,0 ± 0,1
Аскорбиновая кислота		13,6 ± 0,4	12,5 ± 0,2	12,2 ± 0,3

Примечание: ¹IC₅₀ – концентрация соединения, снижающая концентрацию радикалов на 50%.
²Концентрация соединения, обладающего способностью восстанавливать phen- Fe(III), выраженная в мкмоль эквивалентов Fe(II).

На рисунках 1 и 2 показано влияние соединений **1**, **2a** и **3a** на жизнеспособность клеток в модели окислительного стресса, индуцированного H₂O₂. Предварительная обработка клеток Se-содержащей солью **3a** оказывает антиоксидантное действие в отношении H₂O₂-индуцированной цитотоксичности, сравнимое с действием фенозана калия на клетках HepG2 (рис. 1 А и И, рис. 2 А и И) и превышающее его на клетках Hep-2 (рис. 2 В и Л). На клетках MCF-7 **3a** проявляет АОА в низком диапазоне концентраций, но в концентрациях >25 мкМ резко усиливает клеточную гибель (рис. 1 К, рис. 2 К). Соединение с серой **2a** усиливает клеточную гибель Hep-2 в модели окислительного стресса (рис. 2 Ж).

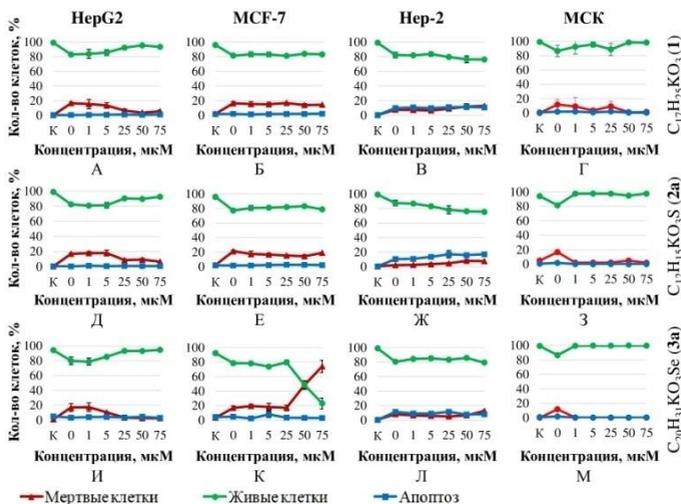


Рисунок 1. Влияние фенозана калия **1** (верхний ряд), его S- и Se-содержащих производных **2a** (средний ряд) и **3a** (нижний ряд) на жизнеспособность клеток HepG2 (А, Д, И), MCF-7 (Б, Е, К), Hep-2 (В, Ж, Л) и MCK (Г, З, М) после 4 часов воздействия 0,9 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ и 250 мкМ H₂O₂, соответственно. Точка К – контрольные клетки без обработки H₂O₂ и соединениями.

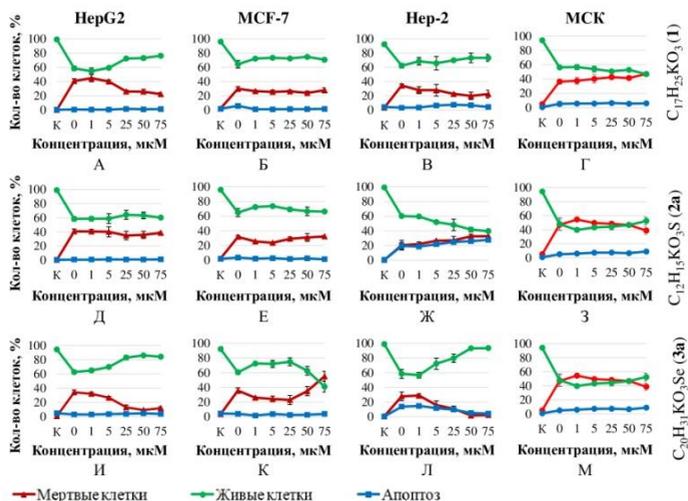


Рисунок 2. Влияние фенозана калия **1** (верхний ряд), его S- и Se-содержащего производных **2a** (средний ряд) и **3a** (нижний ряд) на жизнеспособность клеток HepG2 (А, Д, И), MCF-7 (Б, Е, К), Hep-2 (В, Ж, Л) и MCK (Г, З, М) после 4 часов воздействия 1,5 мМ, 3 мМ, 4 мМ и 500 мкМ H₂O₂, соответственно. Точка К – контрольные клетки без обработки H₂O₂ и соединениями.

Исследование влияния соединений **1**, **2a** и **3a** на митохондриальный мембранный потенциал (ММП), как возможного механизма антиоксидантной или прооксидантной активности этих соединений, в стандартных условиях и в модели окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 , показало, что фенозан калия **1** и его S- и Se-содержащие производные **2a** и **3a** не влияют на ММП (рис. 3).

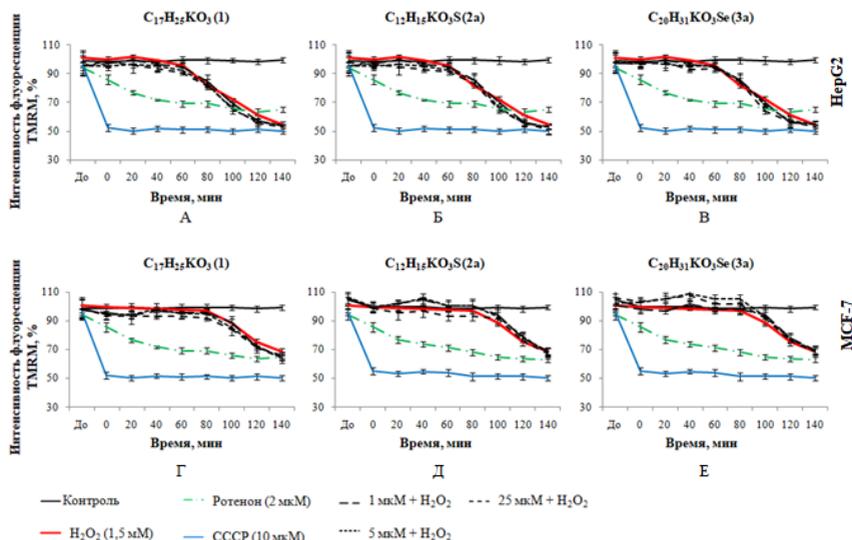


Рисунок 3. Влияние фенозана калия **1** и его S- и Se-содержащих производных **2a** и **3a**, соответственно, на митохондриальный мембранный потенциал клеток HepG2 и MCF-7. Точка До – интенсивность флуоресценции TMRM до добавления H_2O_2 , ротенона или CCCP. Ротенон (2 мкМ) и CCCP (10 мкМ) использовали в качестве положительного контроля падения ММП.

2. Цитотоксическая и цитостатическая активности комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II)

Исследование цитотоксического и цитостатического действия комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II) **4-9** на 2D-культурах опухолевых клеток Hep-2, MCF-7 и HepG2 показало, что разнолигандные комплексы меди(II) обладают ярко выраженной дозозависимой цитотоксической активностью (табл. 3). Значения параметров LC_{50} для наиболее токсичных комплексов находятся в диапазоне 0,60–12,3 мкМ, значения IC_{50} – в диапазоне 0,11–17,4 мкМ, что свидетельствует о большей активности новых соединений, чем у клинически одобренных препаратов цисплатина и карбоплатина. Установлено, что производное тетразола оказывает существенное влияние на селективность комплексов и цитостатическую

активность. Наибольшей цитостатической активностью обладают соединения с марганцем (II): они полностью останавливают деление клеток на концентрациях ~ 4 мкМ (рис. 4).

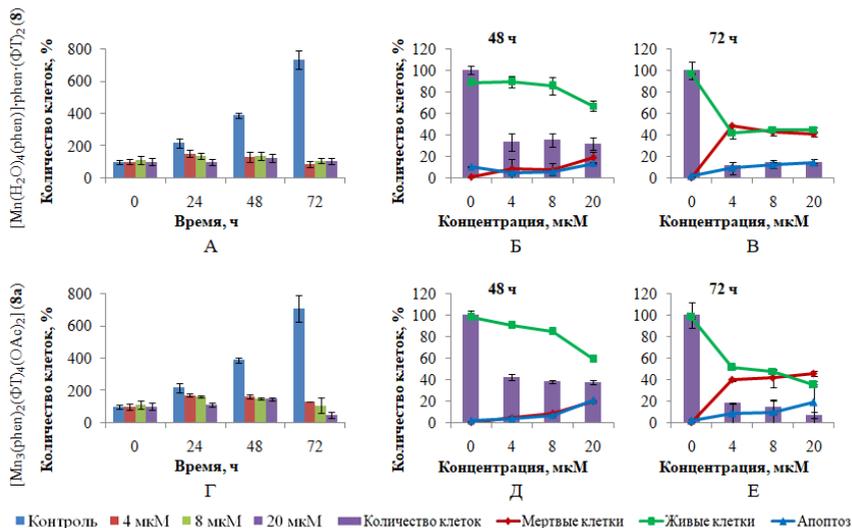


Рисунок 4. Влияние $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{phen})]\text{phen} \cdot (\text{ФТ})_2$ **8** и $[\text{Mn}_3(\text{phen})_2(\text{ФТ})_4(\text{OAc})_2]$ **8a** на жизнеспособность 2D-культуры НерG2. А, Г – динамика роста клеток в течение 72 часов при воздействии комплексов **8** и **8a**, соответственно. Б, В – концентрационная зависимость влияния комплекса **8** на жизнеспособность клеток после 48 и 72 часов воздействия, соответственно. Д, Е – концентрационная зависимость влияния комплекса **8a** на жизнеспособность клеток после 48 и 72 часов воздействия, соответственно.

Исследование цитотоксических и цитостатических эффектов новых соединений **4–9** на неопухолевых фибробластах легких MRC-5 и сфероидов НерG2 показало, что их активность в значительной мере определяется как олигопиридином в структуре комплекса и металлом, так и производным тетразола. Соединения меди(II) проявляют активность на 2D MRC-5 и 3D НерG2 меньшую, большую и сравнимую с активностью на 2D-культурах опухолевых клеток (табл. 3 и 5). Соединения Mn(II), оказывающие сильный цитостатический эффект на 2D-культуру, на 3D-культуре проявляют цитотоксическую активность (табл. 5).

3. Цитотоксическая и цитостатическая активность нитрозокомплексов рутения

Нитрозокомплексы рутения проявляют дозозависимую цитотоксическую и цитостатическую активность в отношении опухолевых 2D-культуры Нер-2, MCF-7 и НерG2 в диапазоне концентраций от 1 до 50

мкМ, которая в значительной степени зависит от фрагмента изоникотиновой или никотинной кислоты, и в меньшей от фрагмента метилового и этилового эфира (табл. 4). Значения параметров LC_{50} лежат в диапазоне 2,9–17,1 мкМ, значения IC_{50} – в диапазоне 2,9–10,2 мкМ, что также сравнимо, либо превышает активность клинически одобренных препаратов цисплатин и карбоплатин (табл. 3). Фрагмент метилового или этилового эфиров в структуре нитрозокомплекса рутения оказывает существенное влияние на активность комплексов на 2D-культуре MRC-5 (табл. 4) и сфероиды HerG2 (табл. 5).

Из всех исследованных соединений только активность комплекса с этилизоникотинатом **11a** меняется при воздействии фотоиндуцирующего излучения почти в 2 раза, при этом цитостатическая активность усиливается, а цитотоксическая ослабевает (табл. 4). Это может быть связано с непосредственным взаимодействием клетки со свободной молекулой NO, с взаимодействием фотопродуктов комплекса рутения с содержимым клетки или с наложением того и другого эффектов (Yakovlev et al., 2021).

Таблица 3. Цитотоксическая (LC₅₀) и цитостатическая (IC₅₀) активность комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II) с производными олигопиридина, снмина и тетразола на 2D-культурах после 48 ч инкубации.

Соединение		LC ₅₀ , мкМ				IC ₅₀ , мкМ			
		MCF-7	Нep-2	НepG2	MRC-5	MCF-7	Нep-2	НepG2	MRC-5
4	[CuL ₂]	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	53,1 ± 0,5
5	{[Cu(phen)(MT) ₂ ·H ₂ O] _n }	3,1 ± 0,1	3,6 ± 0,2	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	3,7 ± 0,2	2,4 ± 0,1
6	[Cu ₂ (phen) ₂ (ФТ) ₄]	11,7 ± 3,1	5,3 ± 0,3	5,0 ± 0,2	0,60 ± 0,01	4,3 ± 0,1	3,3 ± 0,2	0,98 ± 0,06	0,31 ± 0,01
7	[Cu ₂ (bipy) ₂ (ФТ) ₄]	> 50	3,2 ± 0,1	21,7 ± 0,4	27,2 ± 0,5	14,8 ± 0,1	17,2 ± 0,3	10,2 ± 4	27,2 ± 0,5
6a	[Cu ₂ (dmphen) ₂ (ФТ) ₄]	1,11 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,76 ± 0,02	0,79 ± 0,04	2,3 ± 0,2	0,49 ± 0,01	0,59 ± 0,02	0,22 ± 0,01
7a	[Cu ₂ (dmbipy) ₂ (ФТ) ₄]	18,1 ± 0,3	23,0 ± 2,8	13,1 ± 0,1	9,5 ± 0,2	20,8 ± 0,6	22,5 ± 0,7	9,8 ± 0,1	7,5 ± 0,1
6б	[Cu(phenidione)(ФТ) ₂]	0,89 ± 0,04	1,7 ± 0,6	0,70 ± 0,04	0,43 ± 0,01	0,27 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,37 ± 0,01	0,23 ± 0,01
8	[Mn(H ₂ O) ₄ (phen)]·phen·(ФТ) ₂	> 50	> 50	> 50	> 50	6,2 ± 0,1	0,69 ± 0,04	3,1 ± 0,1	4,1 ± 0,2
8a	[Mn ₃ (phen) ₂ (ФТ) ₄ (OAc) ₂]	> 50	> 50	34,8 ± 1,8	0,43 ± 0,01	3,5 ± 0,1	0,83 ± 0,03	2,9 ± 0,1	0,91 ± 0,01
9	[Co ₃ (phen) ₂ (ФТ) ₆]	> 50	> 50	> 50	> 50	38,4 ± 0,3	15,2 ± 0,3	29,6 ± 0,6	19,6 ± 0,5
Cas	[Cu(dmphen(лейцинат)]NO ₃	1,6 ± 0,1	0,67 ± 0,04	1,5 ± 0,1	-	0,60 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,50 ± 0,01	-
	Карбоплатин	33,7 ± 1,8	9,2 ± 0,5	32,2 ± 2,1	35,7 ± 0,3	3,1 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,8 ± 0,2	6,0 ± 0,3
	Цисплатин	38,9 ± 2,0	16,8 ± 0,2	33,0 ± 5,4	>50	3,2 ± 0,1	3,8 ± 0,2	3,6 ± 0,2	5,8 ± 0,2

Таблица 4. Цитотоксическая (LC₅₀) и цитостатическая (IC₅₀) активность нитрозокомплексов рутения на 2D-культурах после 48 ч инкубации.

Соединение		LC ₅₀ , мкМ				IC ₅₀ , мкМ			
		<i>без фотоактивации</i>			<i>после фотоактивации</i>	<i>без фотоактивации</i>			<i>после фотоактивации</i>
		MRC-5	Нep-2	НepG2	НepG2	MRC-5	Нep-2	НepG2	НepG2
10	[RuNOCl ₃ (NicMe) ₂]	> 25	7,1 ± 1,3	12,8 ± 0,3	14,2 ± 0,7	5,9 ± 0,1	3,3 ± 0,1	8,7 ± 0,2	7,1 ± 0,3
10a	[RuNOCl ₃ (NicEt) ₂]	24,7 ± 0,5	17,8 ± 0,8	13,2 ± 2,5	17,1 ± 1,0	6,8 ± 0,1	10,0 ± 0,1	10,2 ± 0,6	9,8 ± 0,3
11	[RuNOCl ₃ (InicMe) ₂]	1,8 ± 0,2	2,5 ± 0,6	3,6 ± 0,3	3,8 ± 0,2	0,42 ± 0,04	0,44 ± 0,03	3,8 ± 0,3	3,9 ± 0,4
11a	[RuNOCl ₃ (InicEt) ₂]	10,0 ± 0,2	1,8 ± 0,4	2,9 ± 0,2	6,5 ± 0,4*	3,7 ± 0,1	5,8 ± 0,1	7,4 ± 0,3	2,9 ± 0,2*
12	[RuNOCl ₃ (γ-Pic) ₂]	2,8 ± 0,2	3,0 ± 0,1	3,5 ± 0,2	4,2 ± 0,3	0,45 ± 0,04	0,50 ± 0,03	3,3 ± 0,3	3,6 ± 0,3

Примечание: * – отклонение значений LC₅₀ и IC₅₀ для НepG2 после воздействия фотоиндуцирующего излучения (длина волны 445 нм, мощность 30 мВт, время воздействия 30 мин) статистически значимо по отношению к значениям для НepG2 без дополнительного воздействия (p < 0,05).

Таблица 5. Цитотоксическая (LC₅₀) и цитостатическая (IC₅₀) активность соединений на 2D- и 3D-модели (сфероидов) HepG2 после 48 ч инкубации.

Соединение		LC ₅₀ , мкМ		IC ₅₀ , мкМ	
		2D HepG2	3D HepG2	2D HepG2	3D HepG2
4	[CuL ₂]	> 50	> 50	> 50	> 50
5	[[Cu(phen)(MT) ₂]:H ₂ O] _n	3,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1*	3,7 ± 0,2	2,4 ± 0,1*
6	[Cu ₂ (phen) ₂ (ФТ) ₄]	5,0 ± 0,2	6,4 ± 0,8	0,98 ± 0,06	0,88 ± 0,06
7	[Cu ₂ (bipy) ₂ (ФТ) ₄]	43,4 ± 0,8	> 50	10,2 ± 4	> 50
6a	[Cu ₂ (dmphen) ₂ (ФТ) ₄]	0,76 ± 0,02	0,49 ± 0,01*	0,59 ± 0,02	0,22 ± 0,01*
7a	[Cu ₂ (dmbipy) ₂ (ФТ) ₄]	13,1 ± 0,1	22,5 ± 0,7*	9,8 ± 0,1	17,5 ± 0,2*
6б	[Cu(phenidione)(ФТ) ₂]	0,70 ± 0,04	0,83 ± 0,03	0,37 ± 0,01	-
8	[Mn(H ₂ O) ₄ (phen)]·phen·(ФТ) ₂	> 50	38,6 ± 1,4	3,1 ± 0,1	9,3 ± 0,2*
8a	[Mn ₃ (phen) ₂ (ФТ) ₄ (OAc) ₂]	34,8 ± 1,8	36,8 ± 1,5*	2,9 ± 0,1	6,9 ± 0,3*
9	[Co ₃ (phen) ₂ (ФТ) ₆]	> 50	> 50	29,6 ± 0,6	> 50
10	[RuNOCl ₃ (NicMe) ₂]	12,8 ± 0,3	8,0 ± 0,2*	8,7 ± 0,2	7,3 ± 0,4*
10a	[RuNOCl ₃ (NicEt) ₂]	13,2 ± 2,5	38,8 ± 1,5*	10,2 ± 0,6	10,8 ± 0,3
11	[RuNOCl ₃ (InicMe) ₂]	3,6 ± 0,3	7,4 ± 0,1*	3,8 ± 0,3	4,8 ± 0,3
11a	[RuNOCl ₃ (InicEt) ₂]	2,9 ± 0,2	9,2 ± 0,2*	7,4 ± 0,3	5,0 ± 0,2
12	[RuNOCl ₃ (γ-Pic) ₂]	3,5 ± 0,2	7,0 ± 0,2*	3,3 ± 0,3	6,6 ± 0,2*
	Карбоплатин	32,2 ± 2,1	>50	3,8 ± 0,2	10,6 ± 0,3*
	Цисплатин	33,0 ± 5,4	49,0 ± 1,3*	3,6 ± 0,2	11,6 ± 0,2*

Примечание: * – отклонение значений для 3D-модели статистически значимо по отношению к 2D-культуре (p < 0,05).

4. Фенотипический скрининг на основе красителей Hoechst и DiD

Методом фенотипического скрининга с использованием красителей Hoechst и DiD выявлены фенотипические изменения в опухолевых клетках человека Hep-2 и MCF-7 под воздействием соединений с известным механизмом действия. Выделены популяционные фенотипы, образующиеся при действии противоопухолевых препаратов. Эти изменения были определены как «контрольные» точки для оценки действия новых соединений.

Карбоцианиновый краситель DiD флуоресцирует при включении в клеточные мембраны. Как правило, его используют для интравитальной визуализации цитоплазматической мембраны клеток. Изменение процедуры окраски, а именно окраска фиксированных клеток одновременно с процедурой пермобилизации позволила визуализировать внутриклеточные мембранные структуры для введения дополнительных параметров фенотипического скрининга.

В результате фенотипического скрининга на основе красителей Hoechst и DiD были получены концентрационные распределения 4 фенотипов клеток Hep-2 и MCF-7 (контрольного фенотипа (КФ), атипичного фенотипа 1 (АФ1), атипичного фенотипа 2 (АФ2) и атипичного фенотипа 3 (АФ3)) при воздействии соединений с известным механизмом действия. Выделены «фенотипические ландшафты», т.е.

характерное распределение фенотипов в клеточных популяциях в зависимости от концентрации соединения. Всего было выделено 4 фенотипических ландшафта (ФЛ) (рис. 4).

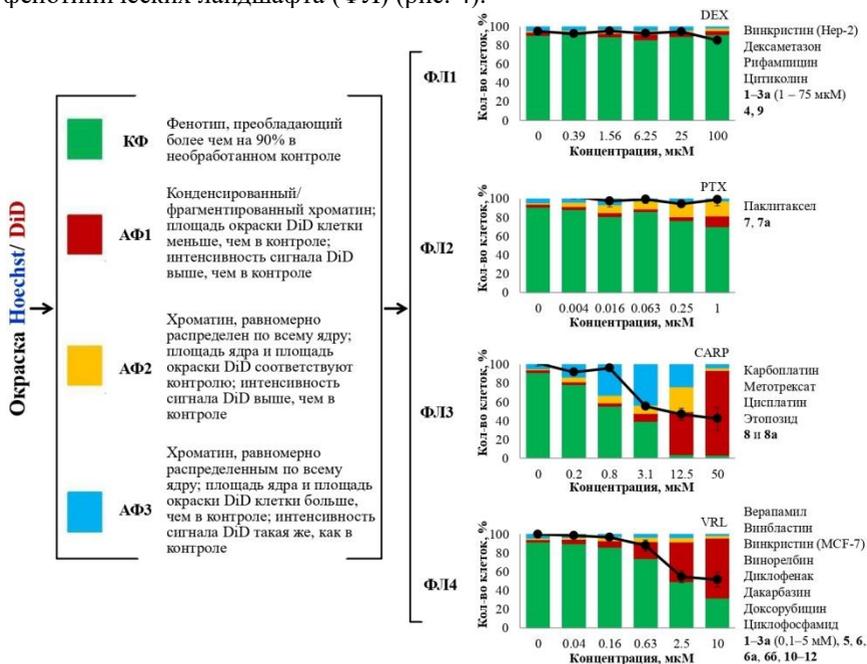


Рисунок 4. Влияние $[Mn(H_2O)_4(phen)] \cdot phen \cdot (ФТ)_2$ **8** и $[Mn_3(phen)_2(ФТ)_4(OAc)_2]$ **8а** на жизнеспособность клеток НерG2 в 2D-модели. А и Г – динамика роста клеток в течение 72 часов при воздействии комплексов **8** и **8а**, соответственно. Б и В – концентрационная зависимость влияния комплекса **8** на жизнеспособность клеток.

Самым интересным является фенотипический ландшафт 3 (ФЛ3), в котором присутствует клеточная популяция с аномально большим размером клетки. Подобная морфология обычно наблюдается при митотической катастрофе, способе гибели клеток, возникающем в результате преждевременного или ненадлежащего вступления клеток в митоз (Vakifahmetoglu et al., 2008). К митотической катастрофе приводит обработка агентами, влияющими на стабильность микротрубочек и вызывающими дефекты в контрольных точках клеточного цикла. Митотическая катастрофа не является отдельным способом гибели клеток, а скорее «предстадий» последующей гибели клеток посредством некроза или апоптоза.

5. Влияние комплексов переходных металлов на индукцию цитохромов P450

Исследование влияния на уровни мРНК и белка основных цитохромов P450, ответственных за метаболизм лекарств, CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4 в 2D-культуре HepG2 методом гибридизации *in situ*, показало, что комплекс [Cu(L)₂] с производным енамина **4** оказывает индуцирующее действие на CYP3A4 и не влияет на экспрессию CYP2C9 и CYP2C19. Комплексы {[Cu(phen)(MT)₂]-H₂O}_n **5** и [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄] **6** также индуцируют CYP3A4 и не влияют на экспрессию CYP2C9, однако для этих комплексов наблюдается тенденция к снижению уровня мРНК CYP2C9. Индуцирующее действие на CYP2C19 комплекса с 5-метилтетразолат анионом **5** сильнее, чем для комплекса с 5-фенилтетразолат анионом **6**. Комплекс [Cu₂(bipy)₂(ФТ)₄] **7** с 2,2'-бипиридином не влияет на экспрессию CYP2C9 и CYP2C19 и слабо индуцирует CYP3A4, по сравнению с комплексами **5** и **6** с 1,10-фенантролином.

Среди нитрозокомплексов рутения соединение с γ -пиколином [RuNOCl₃(γ -Pic)₂] **12** не оказывает модулирующего действия на исследованные CYP. Другие комплексы рутения **10–11a** также не влияют на уровень экспрессии CYP2C9, но индуцируют CYP3A4 и CYP2C19 в низких концентрациях (1–5 мкМ). Наличие фрагмента изоникотиновой кислоты в структуре комплекса влияет на экспрессию CYP3A4: комплексы **11** и **11a** индуцируют CYP2C19 в более низких концентрациях по сравнению с комплексами **10** и **10a**.

Учитывая то, как пересекаются механизмы транскрипционной регуляции CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4, разный профиль модуляции этих генов комплексами меди(II) позволяет сделать предположение, что эти комплексы влияют на экспрессию CYP через коактиваторы транскрипции, тогда как схожий профиль индукции CYP2C19 и CYP3A4 нитрозокомплексами рутения свидетельствует о том, что механизм индукции вероятнее всего связан с ядерными рецепторами.

Таблица 6. Кратное изменение интенсивности флуоресценции мРНК *CYP3A4*, *CYP2C9* и *CYP2C19* и белка *CYP3A4* в клетках НерG2 после 48 ч инкубации, ME [Q1- Q3].

Соединение		Концентрация, мкМ	Кратное изменение интенсивности флуоресценции			
			мРНК			Белок
			<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C19</i>	<i>CYP3A4</i>	<i>CYP3A4</i>
DEX	Дексаметазон	10	1,93* [1,57–2,16]	4,20* [3,82–4,70]	5,73* [4,95–6,30]	-
		100	2,10* [1,92–3,26]	5,25* [4,43–6,05]	5,50* [3,43–6,45]	1,75* [1,48–2,24]
RIF	Рифампицин	25	0,89 [0,76–1,04]	3,98* [3,06–4,17]	2,90* [2,51–3,49]	-
		100	2,05* [1,80–2,39]	6,26* [4,49–7,79]	5,51* [4,69–6,63]	1,84* [1,49–2,48]
4	[CuL ₂]	5	1,05 [0,97–1,23]	1,44 [0,90–1,77]	1,36 [1,07–1,63]	-
		25	0,97 [0,64–1,25]	1,35 [0,91–1,62]	1,97* [1,48–2,29]	1,77* [1,47–1,86]
5	{[Cu(phen)(MT) ₂ ·H ₂ O] _n }	0,2	0,56 [0,47–0,76]	1,12 [0,96–1,45]	2,25* [2,05–2,81]	-
		1	0,44 [0,36–0,66]	1,00 [0,76–1,19]	2,62* [1,96–3,43]	1,95* [1,89–2,32]
6	[Cu ₂ (phen) ₂ (ФТ) ₄]	0,2	0,79 [0,67–1,09]	1,03 [0,74–1,30]	0,84 [0,67–1,13]	-
		1	0,62 [0,55–0,66]	0,80 [0,62–1,21]	3,10* [2,26–3,87]	1,87* [1,67–2,25]
7	[Cu ₂ (bipy) ₂ (ФТ) ₄]	0,2	0,80 [0,69–1,20]	1,30 [1,01–1,75]	1,03 [0,67–1,25]	-
		1	1,12 [0,74–1,24]	1,92 [0,84–1,03]	1,04 [0,89–1,32]	1,03 [0,88–1,16]
10	[RuNOCl ₃ (NicMe) ₂]	1	0,98 [0,79–1,27]	1,27 [1,01–1,47]	2,25* [2,05–2,81]	-
		5	1,11 [0,83–1,50]	1,55* [1,28–1,85]	1,93* [1,81–2,95]	1,95* [1,89–2,32]
10a	[RuNOCl ₃ (NicEt) ₂]	1	0,73 [0,53–1,27]	1,02 [0,72–1,50]	1,65* [1,45–2,03]	-
		5	1,16 [1,05–1,36]	1,49* [1,31–2,06]	2,09* [1,47–2,90]	1,96* [1,88–2,12]
11	[RuNOCl ₃ (InicMe) ₂]	0,1	1,15 [1,01–1,28]	1,24 [0,77–1,43]	1,36 [1,05–1,96]	-
		1	1,05 [0,72–1,23]	1,58* [1,50–1,76]	2,49* [2,03–3,01]	1,93* [1,68–2,16]
11a	[RuNOCl ₃ (InicEt) ₂]	0,1	1,00 [0,66–1,16]	1,07 [0,92–1,26]	1,13 [0,92–1,36]	-
		1	1,16 [0,90–1,39]	1,44* [1,27–1,72]	2,01* [1,81–2,19]	1,79* [1,45–1,96]
12	[RuNOCl ₃ (γ-Pic) ₂]	0,1	0,68 [0,51–1,27]	0,96 [0,67–1,51]	1,06 [0,79–1,40]	-
		1	0,75 [0,66–1,17]	0,98 [0,81–1,24]	1,62* [1,28–2,18]	1,35 [1,15–1,49]

Примечание: * – отклонение статистически значимо по отношению к контролю (p < 0,05).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данное исследование позволило охарактеризовать биологическую активность новых соединений, определить взаимосвязь «структура – биологическая активность» и обозначить ряд соединений для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Цитотоксическая и цитостатическая активность Se-содержащего производного фенозана калия на порядок выше, чем у фенозана калия и его S-содержащего производного. В условиях окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода, Se-содержащая соль оказывает антиоксидантное действие на клетки Нер-2, НерG2 и МСК в диапазоне концентраций от 1 до 75 мкМ; на клетки МСF-7 в диапазоне концентраций до 25 мкМ она также оказывает антиоксидантное действие, а в концентрациях выше 25 мкМ – усиливает клеточную гибель МСF-7. Гидрофильные производные фенозановой кислоты не влияют на митохондриальный мембранный потенциал 2D-культур НерG2 и МСF-7 как в стандартных условиях, так и в модели окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 .

2. Среди координационных соединений меди(II), марганца (II) и кобальта(II) с олигопиридинами и производными енамина и тетразола комплексы меди(II) проявляют выраженную дозозависимую цитотоксическую активность, а комплексы марганца(II) и кобальта(II) – цитостатическую. Соединение с 5-метилтетразолат анионом не селективно для разных типов клеток, тогда как соединения с 5-фенилтетразолат анионом – селективны. Для 3D-культуры НерG2 комплексы с 5-метилтетразолат анионом активнее, чем для 2D-культуры НерG2. Среди комплексов с 5-фенилтетразолат анионом комплексы с 2,2'-бипиридином и его производным менее активны на 3D-культуре НерG2, активность комплексов с 1,10-фенантролином сохраняется.

3. Модулирующее действие координационных соединений меди(II) на экспрессию цитохромов P450 в большей степени зависит от олигопиридина в структуре комплекса. Комплекс с 1,10-фенантролином $[Cu_2(phen)_2(FT)_4]$ индуцирует экспрессию CYP3A4, тогда как комплекс с 2,2'-бипиридином $[Cu_2(bipy)_2(FT)_4]$ не оказывает модулирующего действия на CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4, а комплекс с производным енамина $[Cu(L)_2]$ индуцирует CYP3A4 (мРНК и белок) в концентрациях на порядок выше по сравнению с комплексами с 1,10-фенантролином. Комплекс с 5-метилтетразолат анионом $\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O\}_n$ является более сильным индуктором CYP3A4 по сравнению с комплексом с 5-фенилтетразолат анионом $[Cu_2(phen)_2(FT)_4]$.

4. Нитрозокомплексы рутения оказывают дозозависимый цитотоксический и цитостатический эффект в 2D-модели Нер-2 и НерG2,

который в большей степени зависит от производного пиридина и в меньшей степени от фрагмента метилового или этилового эфира. Однако фрагмент метилового или этилового эфира оказывает существенное влияние на активность комплексов в 2D-модели MRC-5 и 3D-модели HepG2. Фотоиндуцирующее излучение (445 нм, 30 мВт, 30 мин) в 2 раза снижает цитотоксическую и усиливает цитостатическую активность комплекса с этилизоникотинатом [RuNOCl₃(InicEt)₂].

5. Нитрозокомплексы рутения индуцируют CYP3A4 (мРНК и белок), CYP2C19 (мРНК) и не влияют на экспрессию CYP2C9. Наличие фрагмента никотиновой/изоникотиновой кислоты в структуре комплекса влияет на экспрессию CYP2C19: комплексы с изоникотинатом индуцируют CYP2C19 в более низких концентрациях по сравнению с комплексами с никотинатом. Комплекс с γ -пиколином [RuNOCl₃(γ -Pic)₂] оказывает индуцирующий эффект на CYP3A4 и не влияет на экспрессию CYP2C9 и CYP2C19.

6. Фенотипический скрининг на основе красителей Hoechst и DiD позволяет выявить характерные изменения в клеточных популяциях опухолевых клеток Hep-2 и MCF-7 при воздействии соединений с известным механизмом действия, которые воспроизводятся при воздействии на клетки новых исследованных соединений.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Eremina J. A., Lider E. V., Samsonenko D. G., Sheludyakova L. A., Berezin A. S., **Klyushova L. S.**, Ostrovskii V. A., Trifonov R. E. Mixed-ligand copper(II) complexes with tetrazole derivatives and 2,2'-bipyridine, 1,10-phenanthroline: Synthesis, structure and cytotoxic activity // Inorg. Chim. Acta – 2019 – V. 487 – P. 138-144. (Web of Science Q2)
2. Eremina, J.A., Lider, E.V., Sukhikh, T.S., **Klyushova, L.S.**, Perepechaeva, M.L., Sheven', D.G., Berezin, A.S., Grishanova, A.Y., Potkin, V.I. Water-soluble copper(II) complexes with 4,5-dichloro-isothiazole-3-carboxylic acid and heterocyclic N-donor ligands: Synthesis, crystal structures, cytotoxicity, and DNA binding study // Inorg. Chim. Acta - 2020 - V. 510 - 119778. (Web of Science Q2)
3. Rechitskaya E. D., Kuratieva N. V., Lider E. V., Eremina J. A., **Klyushova L. S.**, Eltsov I. V., Kostin G. A. Tuning of cytotoxic activity by bio-mimetic ligands in ruthenium nitrosyl complexes // J. Mol. Struct. – 2020 – V. 1219 – 128565. (Web of Science Q3)
4. Eremina J.A., Ermakova E.A., Smirnova K.S., **Klyushova L.S.**, Berezin A.S., Sukhikh T.S., Zubenko A.A., Fetisov L.N., Kononenko K.N., Lider E.V. Cu(II), Co(II), Mn(II) complexes with 5-phenyltetrazole and polypyridyl ligands:

synthesis, characterization and evaluation of the cytotoxicity and antimicrobial activity // Polyhedron – 2021 – V. 206 – 115352. (Web of Science Q2)

5. **Klyushova L. S.**, Kandalintseva N. V., Grishanova A. Y. Antioxidant Activity of New Sulphur- and Selenium-Containing Analogues of Potassium Phenosan against H₂O₂-Induced Cytotoxicity in Tumour Cells // Curr. Issues. Mol. Biol. – 2022 – V. 44 – № 7 – P. 3131-3145. (Web of Science Q2)

Список сокращений:

ABTS^{•+} – катион-радикал 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоикислоты)

bipy – 2,2'-бипиридин

CARP – карбоплатин

CYP – цитохром P450

DEX – дексаметазон

DiD – 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндодикарбоцианина перхлорат

dmbipy – 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин

dmphe – 4,7-диметил-1,10-фенантролин

DPPH[•] – 2,2-ди(4-трет-октилфенил)-1-пикрилгидразил радикал

IC₅₀ – концентрация соединения, при которой количество клеток (2D-культура) или площадь сфероида (3D-модель) снижены на 50% по сравнению с контролем.

InicEt – этилизоникотинат

InicMe – метилизоникотинат

L – анион 2-анилинометилиден-5,5-диметилциклогексан-1,3-диола

LC₅₀ – концентрация соединения, при которой количество живых клеток снижено на 50% по сравнению с контролем.

NicEt – этилникотинат

NicMe – метилникотинат

OAc – ацетат анион

phen – 1,10-фенантролин

phendione – 1,10-фенантролин-5,6-дион

PI – пропидий йодид

PTX – паклитаксел

RIF – рифампицин

TMRM – тетраметилродамин

VRL – винорелбин

γ-Pic – γ-пиколин

АОА – антиоксидантная активность

АФК – активные формы кислорода

ММП – митохондриальный мембранный потенциал

MT – 5-метилтетразолат анион

СССР – карбонил цианида м-хлор фенил гидразон

ФТ – 5-метилтетразолат анион

MRC-5 – неопухольевые фибробласты человека

НерG2 – гепатоцеллюлярная карцинома человека

Нер-2 – карцинома гортани человека

MCF-7 – аденокарцинома молочной железы человека

МСК – мезенхимальные стволовые клетки человека

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.м.н. Вавилину Валентину Андреевичу и ведущему научному сотруднику лаборатории биохимии чужеродных соединений Гришановой Алевтине Юрьевне за помощь в постановке задач исследования, обсуждении полученных результатов и, прежде всего, за поощрение свободы творчества.

Автор благодарен научной группе под руководством д.х.м., доцента Г. А. Костина ИНХ СО РАН и научной группе кафедры химии НГПУ под руководством д.х.н., профессора Н. В. Кандалинцевой за любезно предоставленные соединения для исследования и помощь в интерпретации полученных результатов. Автор благодарит всех соавторов.

Автор искренне благодарен научной группе лаборатории металл-органических координационных полимеров под руководством Е. В. Лидер, прежде всего, Голубевой Юлии Андреевны и Ермаковой Екатерине Андреевны за предоставленные соединения для исследования, за помощь в повседневной работе и обсуждении результатов, а также поддержку на всех этапах исследования и оптимизм.

Автор отдельно выражает благодарность Воронцовой Елене Владимировне за научное и практическое становление.