

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

На правах рукописи

ЦЫМБАЛ СЕРГЕЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

**МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ
КОМБИНИРОВАНИИ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ И
ТИОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

1.5.4 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Химико-биологическом кластере Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО».

Научный руководитель:

Штиль Александр Альбертович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Калинина Елена Валентиновна – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Щулькин Алексей Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 г. в ___:___ на заседании Диссертационного совета 24.1.241.02 при ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский пр., 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (109240, г. Москва, Устьинский пр., 2/14) и на сайте <http://www.ion.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Шумакова А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Окислительно-восстановительный баланс – важнейший регулятор жизнеспособности клеток. Внешние воздействия, направленные на сдвиг баланса в сторону окисления, способны вызвать гибель клеток, устойчивых к другим стимулам (плейотропная лекарственная устойчивость опухолевых клеток). В этих условиях метаболитами, вызывающими гибель клеток, являются активные формы кислорода (АФК). Известными прооксидантами являются переходные металлы: наночастицы и органические комплексы. Соединения на основе меди рассматриваются как перспективные противоопухолевые препараты.

Работа направлена на установление механизмов усиления цитотоксичности медьсодержащих соединений в присутствии органических восстановителей для индукции гибели опухолевых клеток – родительских линий различного тканевого происхождения и изогенных сублиний с лекарственной устойчивостью.

Степень разработанности темы диссертации. Проведены исследования по индукции гибели опухолевых клеток человека и мыши при действии наночастиц оксида меди или медьорганических комплексов в присутствии органических восстановителей – N-ацетилцистеина и аскорбата. Выявлено уникальное свойство меди (II) восстанавливаться в этих условиях, что приводит к продукции АФК с последующим повреждением макромолекул плазматической и других мембран, и быстрой гибели клеток. Такое воздействие оказывается эффективным при нефункционировании апоптотических каскадов – феномене, характерном для клеток с лекарственной резистентностью.

Основное внимание уделено изучению молекулярно-биологических и биохимических особенностей гибели клеток при восстановлении двухвалентной меди до одновалентной. С практических позиций важно установление противоопухолевой эффективности комбинации медьсодержащих соединений и восстановителя в модели трансплантированной опухоли у лабораторных мышей.

Цель исследования – установить биохимические механизмы цитотоксичности комбинаций медьсодержащих соединений и восстановителей (N-ацетилцистеин, аскорбат) для опухолевых клеток человека и трансплантированной опухоли у лабораторных мышей.

Задачи исследования:

1. Определить диапазоны концентраций медьсодержащих соединений, восстановителей и их комбинаций для индукции гибели культивируемых клеток.
2. Выявить механизмы взаимодействия меди (II) с N-ацетилцистеином в бесклеточной системе.
3. Установить биохимические механизмы гибели клеток при действии комбинации наночастиц оксида меди и медьорганических комплексов с восстановителями.
4. Подтвердить противоопухолевую эффективность комбинации медьорганического комплекса и N-ацетилцистеина на модели трансплантированной опухоли у мышей.

Научная новизна. Впервые показано, что эффект взаимодействия с восстановителями специфичен для соединений меди (II) в разных контекстах: наночастицы CuO, растворимая соль или металлоорганический комплекс. Помимо соединений, содержащих тиольную группу, восстанавливать двухвалентную медь способны и другие агенты, например, аскорбиновая кислота. Другие переходные металлы не взаимодействуют с указанными восстановителями. Впервые показано протекание гибели клеток без активации классических механизмов апоптоза, что расширяет терапевтический потенциал комбинаций. Впервые показана возможность снижения опухолевой нагрузки у лабораторных мышей-опухоленосителей при введении комбинации медьорганического соединения и восстановителя.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Общебиологическая значимость работы заключается в установлении механизма повышения цитотоксичности медьсодержащих соединений (наночастиц и органических комплексов) в комбинации с органическими восстановителями, в т.ч. физиологическими (цистеин, аскорбат). Генерируемый комбинацией окислительный “взрыв” приводит к гибели родительских и резистентных клеток без активации апоптоза. Такой результат имеет практическое значение для разработки рациональной высокоэффективной стратегий борьбы с лекарственной устойчивостью опухолей, в особенности при терминальной фазе заболевания, когда возможности апоптогенной терапии исчерпаны.

Методология и методы исследования. Основная часть работы выполнена с использованием культивируемых клеток человека: линии хронического миелоидного лейкоза K562, аденокарциномы кишки HCT116 и тройного негативного рака молочной железы MDA-MB-231. Также использованы сублинии с признаками лекарственной устойчивости: K562/4

(повышенная экспрессия Р-гликопротеина, множественная лекарственная устойчивость) и НСТ116ТР53^{-/-} (сниженная чувствительность к повреждениям ДНК). Для характеристики гибели и молекулярно-биологических механизмов её реализации применялись колориметрический МТТ-тест, конфокальная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, иммуноблоттинг, атомно-адсорбционная спектроскопия. Эксперименты в бесклеточных системах включали работу с искусственными мембранами, определение SH-групп методом Элмана, циклическую вольтамперометрию. Противоопухолевая эффективность изучена на мышах-самках Valb/c с трансплантированной асцитной опухолью Эрлиха. Первичные результаты обработаны современными статистическими методами.

Положения, выносимые на защиту:

1. Добавление N-ацетилцистеина приводит к многократному усилению цитотоксичности различных медьсодержащих веществ (наночастиц, солей и органических комплексов), но не других переходных металлов.

2. Гибель клеток обусловлена повреждением плазматической мембраны за счёт генерации АФК в первые часы действия комбинации без индукции апоптотических каскадов.

3. Восстановление меди лежит в основе генерации АФК за счёт участия в реакциях Габера-Вейса и Фентона.

4. На лабораторных животных (мыши Valb/c) с трансплантированной опухолью Эрлиха выявлено торможение роста асцита при комбинировании медьорганического комплекса и N-ацетилцистеина сравнимое с конвенциональным препаратом цисплатином.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты исследования получены на современном оборудовании, с использованием общепринятых биологических моделей и протоколов. Достоверность полученных результатов подтверждается первичными данными, а также их статистической обработкой.

Материалы диссертации опубликованы в виде 3 статей в рецензируемых международных журналах и представлены в виде докладов на 15 конференциях всероссийского и международного уровня. Получен патент на изобретение № 2721771 «Применение композиции наночастиц оксида меди и N-ацетилцистеина для индукции гибели клеток хронического миелоидного лейкоза», Роспатент.

Личный вклад автора. Вклад диссертанта заключался в планировании и проведении всех экспериментов на культурах клеток. Работа с искусственными мембранами и опыты *in vivo* проводились автором с участием соответствующих

специалистов. Автор выполнил статистическую обработку, анализировал экспериментальные данные и представил публикации и доклады на конференциях.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 4-х глав с описанием исследования (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Текст работы изложен на 125 страницах, включает 42 изображения и 6 таблиц. Список литературы содержит 168 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой главе приводится обзор литературы. Рассматривается феномен лекарственной устойчивости опухолевых клеток, механизмы её формирования и возможные способы борьбы с резистентными опухолями. Перечисляются основные механизмы гибели опухолевых клеток, отличия в их молекулярно-биологической реализации и участие в становлении устойчивости. Приводится информация о том, насколько полезной в борьбе с резистентными опухолями может в этом контексте оказаться оксидативная терапия. Перечисляются фармакологические препараты, терапевтический эффект которых реализуется за счёт воздействия на внутриклеточную систему перераспределения меди. Обсуждается эффективность таких веществ, и возможное будущее развитие области.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник наночастиц, солей и органических комплексов меди. Наночастицы (НЧ) CuO синтезированы методом преципитации из CuSO_4 , к кипящему раствору которого добавляли 1 М NaOH при интенсивном помешивании. Размер частиц был определён методом динамического рассеяния света и сканирующей электронной микроскопии. Органические комплексы меди и соответствующие органические лиганды без металла синтезированы и предоставлены кафедрой органической химии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Культуры клеток. Линии клеток хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) человека (K562), трижды негативной карциномы молочной железы (MDA-MB-231) и аденокарциномы толстой кишки (HCT116) получены из Американской коллекции типовых культур. Линии V16-F10 (меланома мыши), K562/4 (сублиния с гиперэкспрессией гена *MDR 1*/Р-гликопротеина) и псевдонормальные фибробласты ПФЧ предоставлены НМИЦ онкологии им.

Н.Н.Блохина. В экспериментах использовались клетки в логарифмической фазе роста.

Анализ цитотоксичности. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ-тест). После инкубации с веществами, к клеткам непосредственно в среду добавлялось 20 мкл раствора 10xМТТ (5 мг/мл) для получения конечной концентрации 0,5 мг/мл. Кристаллы формазана растворялись в 200 мкл ДМСО. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Tecan SPARK (Tecan, Switzerland), используя длину волны 570 нм.

Кинетика гибели клеток оценивалась с использованием пропидия йодида (PI) в проточной цитофлуориметрии (CytoFlex, Beckman Coulter, США). После соответствующих воздействий клетки инкубировали с PI (10 мкг/мл) 2 мин. Интенсивность флуоресценции измеряли в канале фикоэритрина (PE, 585/42 нм). Данные анализировали в программах CytExpert (Beckman Coulter, США) и Microsoft Excel.

Накопление АФК определяли с CM-H₂DCFDA (ThermoFisher, США). Интенсивность флуоресценции регистрировали в канале FITC (525/50 нм) на проточном цитофлуориметре CytoFlex.

Определение механизма гибели. После обработки комбинацией клетки K562 были окрашены 15 мин АннексиномV-FITC (Dead Cell Apoptosis Kit for flow cytometry; Thermo Fisher Sci.). После отмывки в фосфатном буфере добавляли 10 мкг/мл PI. Интенсивность флуоресценции регистрировали в каналах FITC и PE.

Трансмембранный потенциал митохондрий. Клетки K562 обрабатывали комбинацией НЧ CuO и NAC 1-6 ч и окрашивали MitoTracker™ RedCMXRos (Thermo Fisher Sci.) (85 нМ, 30 мин). Перед анализом на проточном цитофлуориметре клетки промывались холодным PBS, интенсивность флуоресценции анализировалась в канале аллофикоцианина (APC) (660/10 нм).

Иммуноблоттинг. Клетки K562 и НСТ116 лизировали в буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 1% NP 40, 0,1% SDS, 50 мМ Трис (pH 8,0), 2 мМ фенолметилсульфонилфторид и коктейль ингибиторов белка (Roche) 30 мин на льду. Концентрацию белка оценивали по методу Брэдфорда. Лизаты (35 мкг общего белка на дорожку) разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле при 120 В, 1,5 ч. Белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны 0,2 мкм (GE Healthcare, США), блокировали обезжиренным молоком и инкубировали с

первичными антителами к расщепленным поли(АДФрибозо)полимеразе (PARP) и каспазе-3 (Cell Signaling) в течение ночи при 4°C. После отмывания мембраны инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Белки визуализировали с помощью реагента усиленной хемилюминесценции и системы визуализации ChemiDoc MP (BioRad, США).

Атомно-абсорбционная спектроскопия. К клеткам K562 добавляли 0,5 мкг/мл или 5 мкг/мл НЧ CuO. Через 1, 6 и 24 ч клетки лизировали в дистиллированной воде. Пробы доставлены в Институт проблем химической физики РАН для анализа на спектрометре AAS-3 (Германия).

Эксперименты с искусственными мембранами. Бислойные мембраны формировали из 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-глицерола) (ПОФГ) по методу Монтала и Мюллера. Липосомы с кальцеином формировали с помощью мини-экструдера (Avanti Polar Lipids, Inc., США). Большие однослойные везикулы формировали в электрическом поле с использованием прибора "Nanion vesicle prep pro" (Германия). Эксперименты начинали с внесения 2,5 мМ NAC, после чего добавляли CuO (1-4 мкг/мл). Регистрировали ток через мембрану, транспорт кальцеина из липосом и термограммы суспензий.

In vivo. Исследования были проведены на мышах-самках Balb/c (12 недель, 20-25 г). Все исследования проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и по правилам ГОСТ 33216-2014. Опухоль Эрлиха перевивали однократно внутрибрюшинно. При введении комбинации компоненты предварительно смешивались и затем вводились в мышь. Наночастицы, медьорганический комплекс и NAC растворяли в стерильном PBS и вводили в брюшную полость животного (асцитный выпот) на второй день после прививки.

Статистическую обработку данных производили в программных средах Microsoft Excel и GraphPad Prism 8. Анализ выживаемости основывался на методе Каплана-Мейера. Рассчитывали продолжительность жизни животных 95% доверительным интервалом. Различия между группами выявляли по U-критерию Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика медьсодержащих соединений

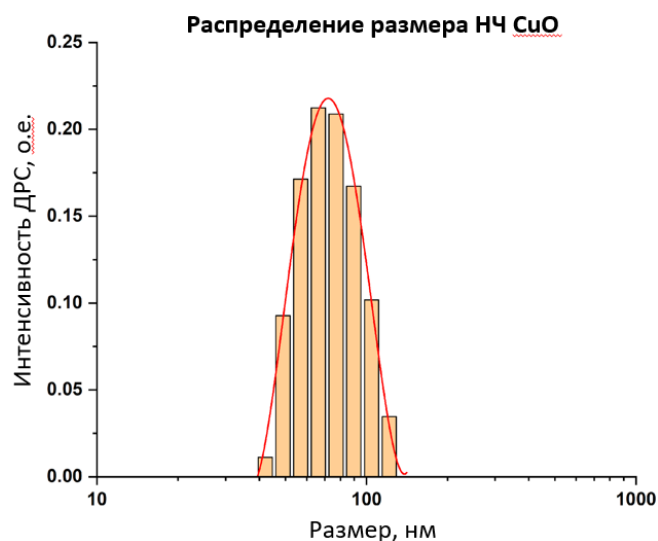


Рисунок 1. Распределение НЧ CuO по размерам.
Средний размер 80 ± 23 нм

Размер НЧ CuO, измеренный методом ДРС, составил 80 ± 20 нм (Рисунок 1). Стоковый раствор (1,4 мг/мл в деионизированной воде) хранили при $+4$ °С.

Формулы медьорганических комплексов представлены в

Таблица .

Таблица 1. Формулы медьорганических комплексов.

Название комплекса	FS-Me+2	FS-Me+1	FS-Me	Ftion	Ftion-k
Химическая формула					

Цитотоксичность НЧ CuO значительно повышается в присутствии N-ацетилцистеина (НАС)

Жизнеспособность опухолевых клеток оценивалась при помощи МТТ-теста. Как видно из Рисунок 2, НЧ CuO демонстрируют умеренный цитотоксический эффект: IC_{50} 6-40 мкг/мл (таблица 2). При предварительном добавлении N-ацетилцистеина в концентрации 2,5 мМ происходит значительное снижение величины IC_{50} , достигающее нескольких порядков. Следует отметить, что используемая концентрация НАС является нетоксичной, а само по себе соединение полностью биосовместимо. Данный эффект реализуется в отношении различных культур опухолевых клеток, что указывает на его неспецифическую природу. Важно отметить, что опухолевые клетки с

приобретённой лекарственной устойчивостью, а именно K562/4, экспрессирующие Р-гликопротеин (резистентность к доксорубину), также чувствительны к комбинации.

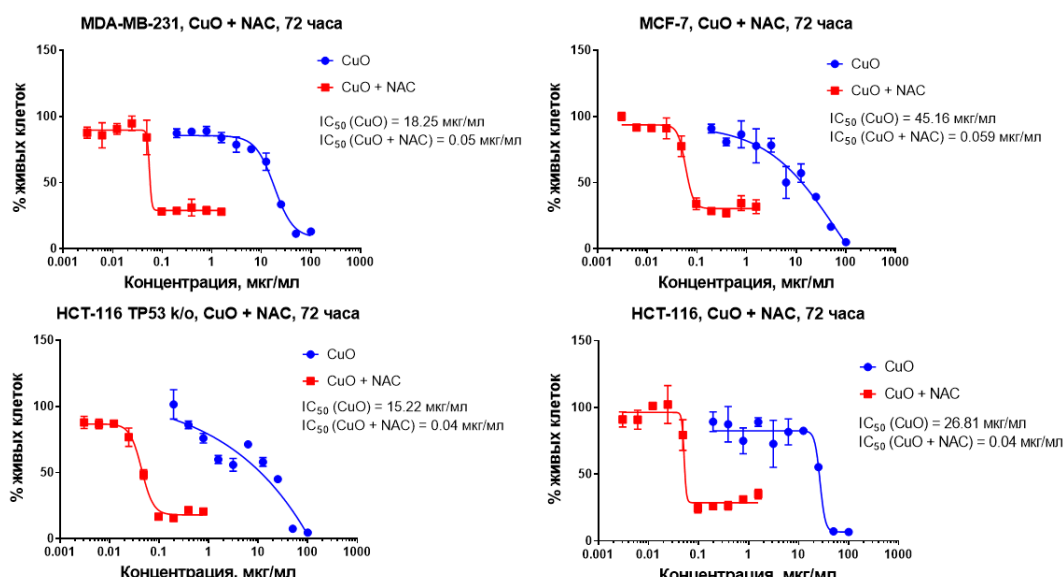


Рисунок 2.
 Жизнеспособность клеток после добавления НЧ CuO или НЧ CuO + 2,5 мМ NAC.

Таблица 2. IC₅₀ НЧ CuO в монодействии и с NAC.

Культура клеток	IC ₅₀ (CuO)*	IC ₅₀ (CuO + 2,5 мМ NAC)*	Потенцирование**
K562	8.5	0.01	850
K562/4	16.2	0.01	1620
MOLM-6	5.7	0.02	285
KU-812	7.0	0.02	350
HCT116	26.8	0.05	536
HCT116p53KO	15.2	0.04	380
MDA-MB-231	18.3	0.06	305
MCF-7	45.2	0.05	904
B16F10	17.6	0.06	293
SCOV-3	3.9	0.09	42
SCOV-3/CDDP	4.3	0.37	12
Опухоль Эрлиха	11.3	0.048	237
hFB-hTERT6	9.1	0.02	455

* IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), среднее 3-х экспериментов. **соотношение $IC_{50\text{CuO}}/IC_{50\text{CuO+NAC}}$

Исследование специфичности реакции CuO и NAC

Далее определили специфичность взаимодействия НЧ CuO и NAC: дают ли другие переходные металлы эффект, схожий с действием меди (II)? Оказалось, что ни НЧ ZnO, и НЧ Fe_3O_4 , ни другие тестированные металлы не вызывают гибель клеток в комбинации с NAC (Рисунок 3).

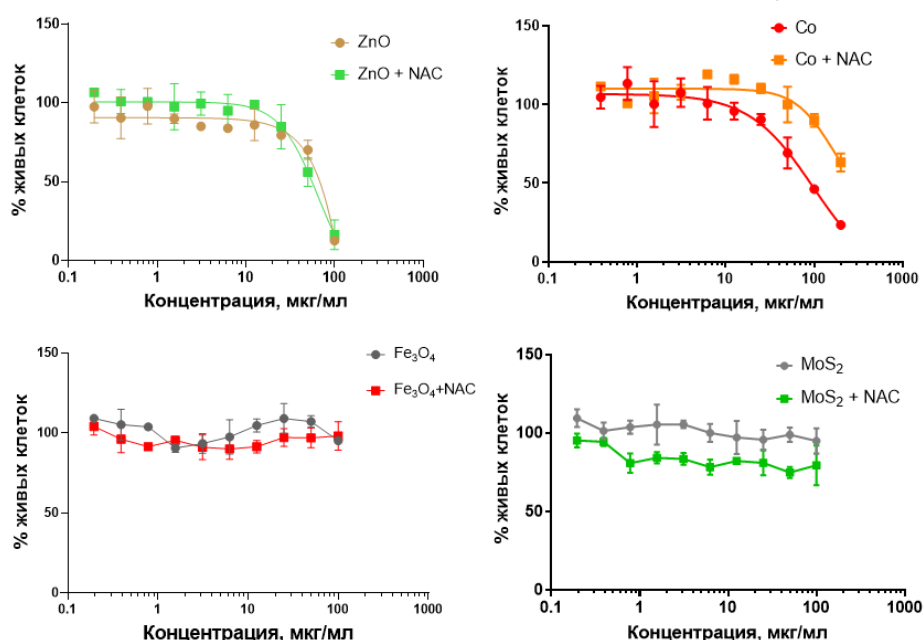


Рисунок 3. МТТ-тесты с соединениями других переходных металлов в комбинации с 2,5 мМ NAC.

В качестве альтернативы NAC изучены аминокислоты цистеин, метионин, фенилаланин, а также антиоксиданты аскорбат и токоферол (рисунок 4). Выбор соединений связан с тем, что первоначальная гипотеза заключалась в необходимости тиольной группы для генерирования АФК в комбинации с медьсодержащими соединениями. Из исследованных соединений только цистеин и аскорбат проявляют те же свойства, что и NAC. Это означает, что соединения, содержащие тиольную группу, действительно способны усиливать цитотоксичность медьсодержащих соединений, однако, такой же способностью обладают и другие восстановители (в т.ч. физиологические), например, аскорбат.

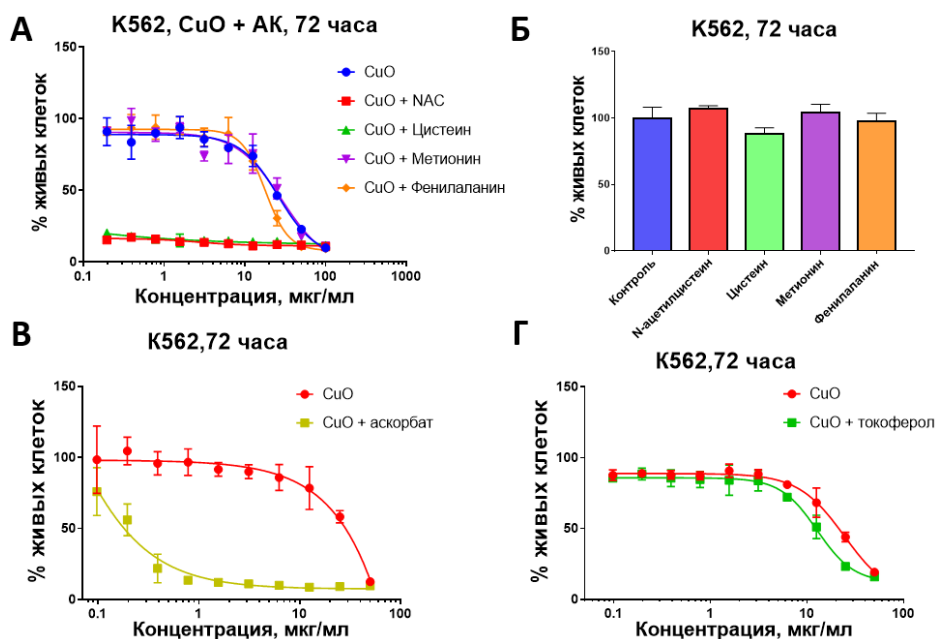


Рисунок 4. Цитотоксичность комбинаций НЧ CuO с аминокислотами или антиоксидантами. (А) Цитотоксичность НЧ CuO в комбинациях с NAC, цистеином, фенилаланином и метионином (2,5 мМ). (Б) Отсутствие цитотоксичности аминокислот в моновоздействии. (В-Г) Комбинации НЧ CuO с аскорбатом или токоферолом.

Исследование гибели клеток

Определение времени гибели и накопления АФК

После выявления эффективных концентраций действующих веществ, следующим шагом стало определение времени наступления клеточной гибели (рисунок 5).

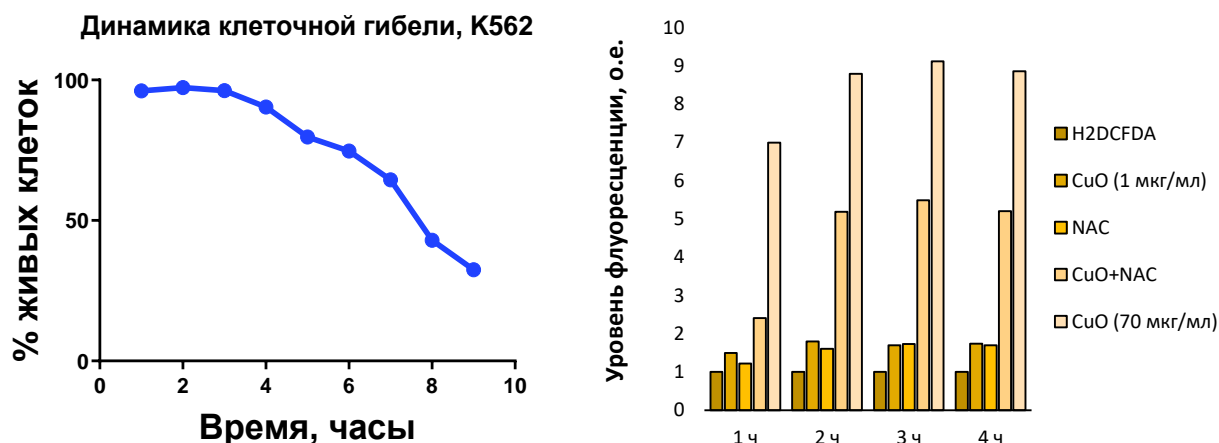


Рисунок 5. Динамика гибели клеток после воздействия комбинации (НЧ CuO (100 нг/мл) и NAC (2,5 мМ)) (слева). Относительный уровень флуоресценции проб, взятых для анализа по обнаружению АФК с помощью CM-H₂DCFDA (справа). Уровень флуоресценции считался как частное медианного значения уровня флуоресценции пробы от медианного значения уровня флуоресценции пробы с красителем.

Гибель клеток наступает довольно быстро: через 9 ч после добавления комбинации остаётся менее 25% живых клеток. Окислительный стресс фиксировался окрашиванием клеток CM-H₂DCFDA (рисунок 5) с последующей визуализацией на проточном цитофлуориметре. Значительное образование АФК наблюдается после 2 ч инкубации с комбинацией. Гибель детектируется к 4-му часу после добавления комбинации и через 2 ч после регистрации АФК.

Комбинация НЧ CuO и NAC нарушает электрический потенциал митохондрий

При помощи MitoTracker определили кинетику митохондриального потенциала (рисунок 7).

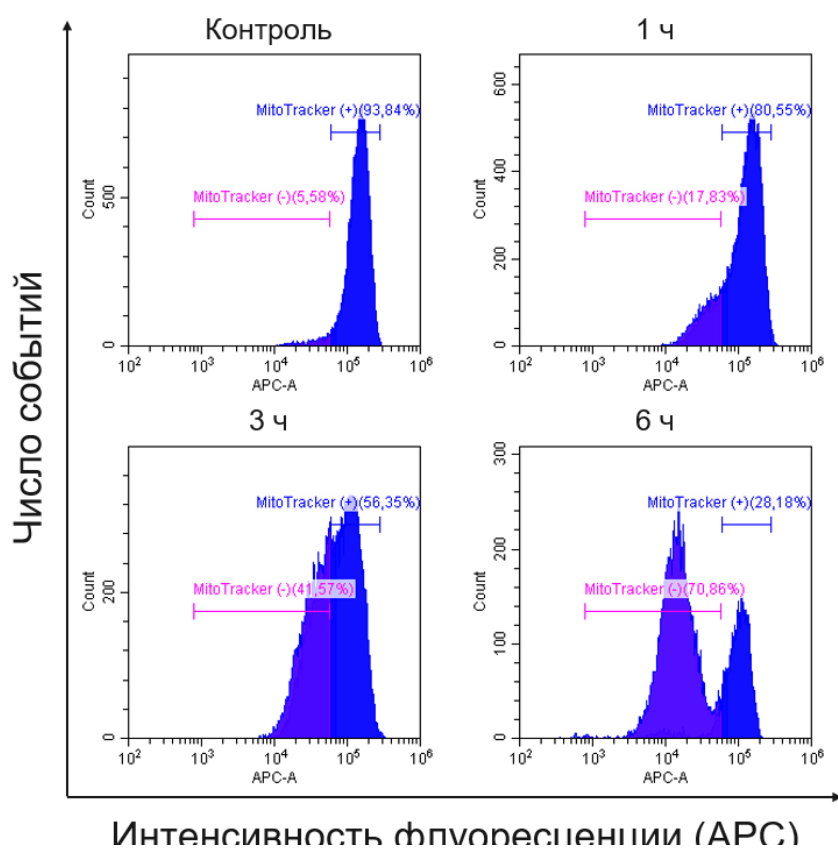


Рисунок 7. Изменения митохондриального потенциала в клетках K562.

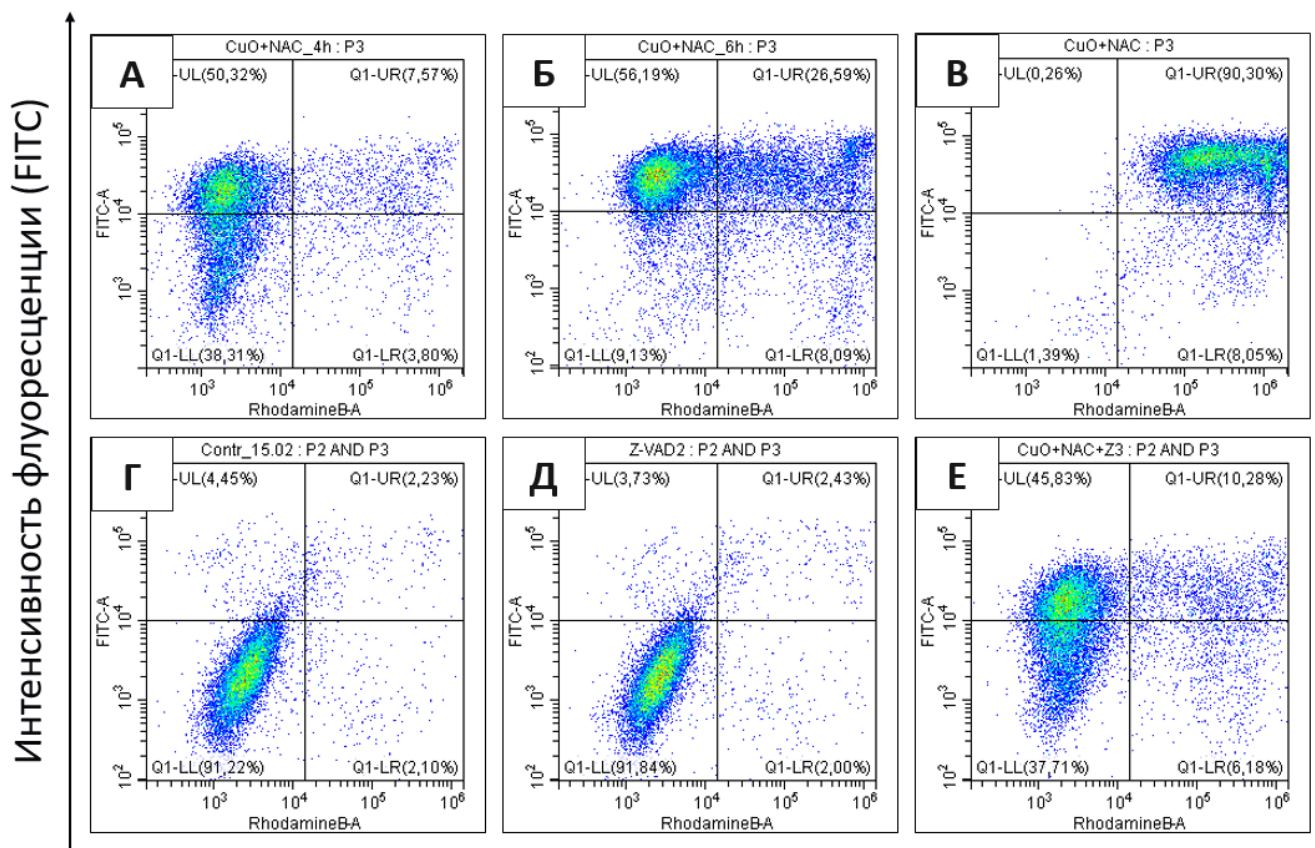
показано, что после 4 ч инкубации с CuO + NAC количество положительных событий в канале флуоресценции FITC увеличивается. После 6 ч с комбинацией почти все клетки FITC-положительны, а часть популяции получила двойное окрашивание. Спустя 24 ч свечение наблюдается в каналах обоих красителей. Пан-каспазный ингибитор z-VAD не ограничивал гибель.

Митохондриальный потенциал снижается после 1 ч инкубации со комбинацией. К 6 ч популяция разделилась на группы с сниженным и нормальным потенциалом.

Признаки апоптотической гибели

Одним из методов дифференциации апоптотического или некротического типа гибели является двойное окрашивание

Аннексином V-FITC/пропидия иодидом (PI). На рисунке 8



Интенсивность флуоресценции (PI)

Рисунок 8. Окрашивание аннексином V/PI. (А-В) Клетки, обработанные НЧ CuO и 2,5 mM NAC в течение: (А) 4 ч, (Б) 6 ч, (В) 24 ч. (Г) Необработанные клетки. (Д) z-VAD, 50 мкМ. (Е) z-VAD (50 мкМ) + НЧ CuO + NAC, 4 часа.

Комбинация CuO и NAC не активирует биохимические маркеры апоптоза или некроптоза

Активация расщепленной каспазы-3 и PARP - признаки апоптоза. Результаты иммуноблоттинга (рисунок 12) свидетельствуют об отсутствии расщепления каспазы-3 при комбинации CuO + NAC. Таким образом, эти механизмы апоптоза не вовлечены в реализацию гибели, индуцированной комбинацией. Данные предыдущих экспериментов можно объяснить неспецифической пертурбацией мембран (плазматической, митохондриальной) без значительной активации апоптотических механизмов.

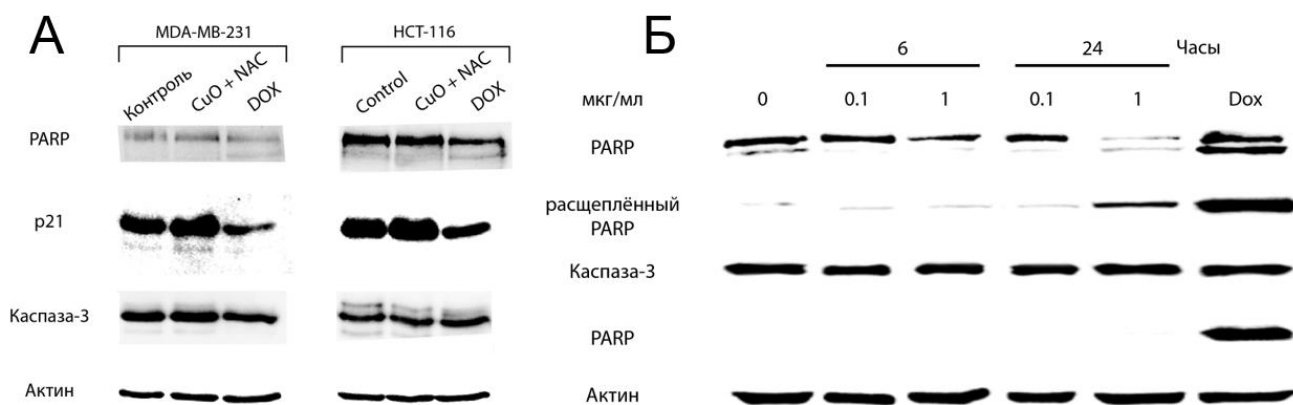


Рисунок 12. Выявление PARP и каспазы-3 (иммуноблоттинг) после добавления комбинации или доксорубина (DOX) клеткам MDA-MB-231 и HCT116 (А) или K562 (Б). Инкубация с НЧ CuO (100 нг/мл) + NAC (2,5 мМ) 24 часа.

Так как признаки гибели несут черты и апоптоза, и некроза, мы изучили возможность некроптоза – сочетанного варианта программируемой гибели. Клетки K562 обработали некростатином-1 за 1 ч до добавления комбинации и далее смотрели изменится ли выживаемость клеток.

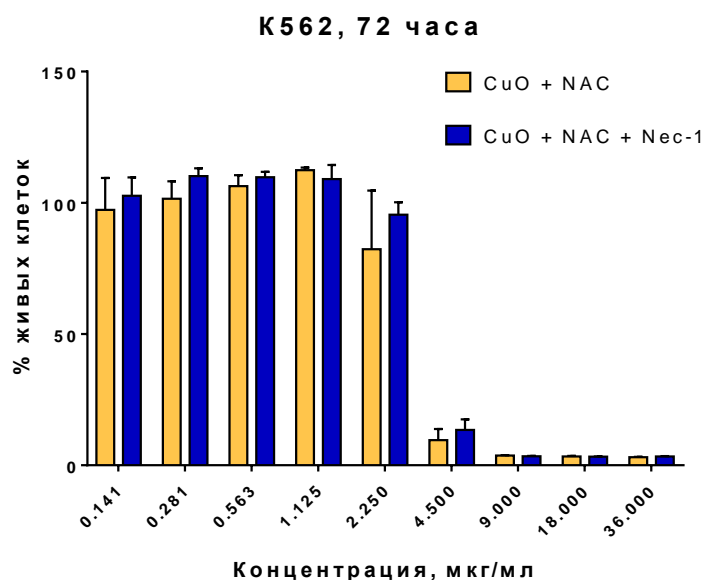


Рисунок 13. Жизнеспособность клеток в присутствии или в отсутствие некростатина-1 (Nec-1) при добавлении НЧ CuO + NAC.

АФК, при комбинации НЧ CuO и NAC является некроз.

Некростатин не повлиял на жизнеспособность клеток в присутствии CuO + NAC (рисунок 13), что позволяет сделать вывод об отсутствии некроптоза. Другим возможным механизмом гибели может быть ферроптоз, однако токоферол не предотвращал гибель (рисунок 4Г), что означает, что перекисное окисление липидов приводит к другой форме гибели клеток. Таким образом, вероятным механизмом гибели клеток, вызванной генерацией АФК, при комбинации НЧ CuO и NAC является некроз.

Низкое внутриклеточное накопление НЧ CuO

Атомно-адсорбционная спектрофотометрия использовалась для измерения количества внутриклеточной меди после добавления наночастиц CuO через различные промежутки времени. Результаты представлены на рисунке 14.

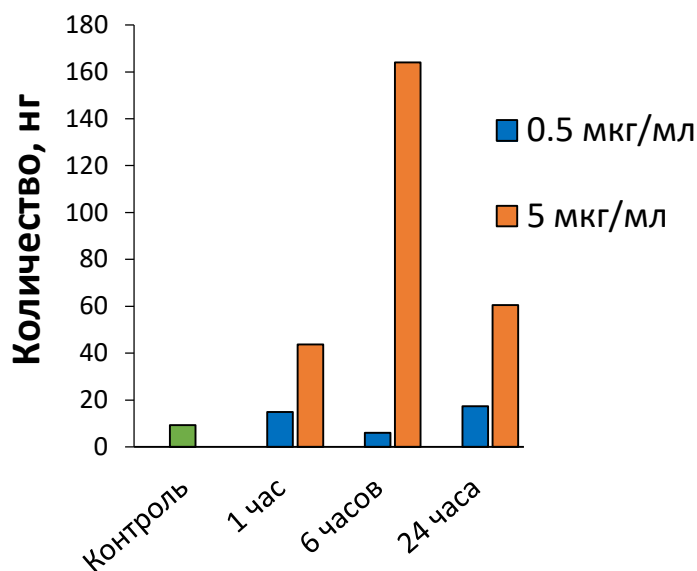


Рисунок 14. Атомно-абсорбционная спектроскопия. Столбцы - абсолютное количество меди в образце. Показан репрезентативный эксперимент из 3-х независимых повторностей.

Установлено, что в образцах остается лишь небольшая доля НЧ. Поэтому генерация АФК, вызванная комбинацией НЧ и NAC, происходит вне клетки. Быстрое повреждение плазматической мембраны не позволяет реализоваться механизмам апоптотической гибели - повреждению мембран митохондрий и нарушению распределения фосфатидилсерина в бислое. Возможно, эти процессы - также мембранотропные эффекты комбинации.

Комбинация НЧ CuO и NAC изменяет проницаемость липидных мембран

Доказательство негативного влияния комбинации на мембраны получено на модели бислойных липидных мембран. Добавление NAC не влияет на проницаемость ПОФХ мембран, однако, вызывает флуктуации тока в ПОФГ мембранах. Добавление постепенно повышающихся концентраций CuO приводит к разрыву ПОФГ мембраны (рисунок 15). Это указывает на то, что действие комбинации сильнее проявляется в отношении бислоев, содержащих отрицательно заряженные группы.

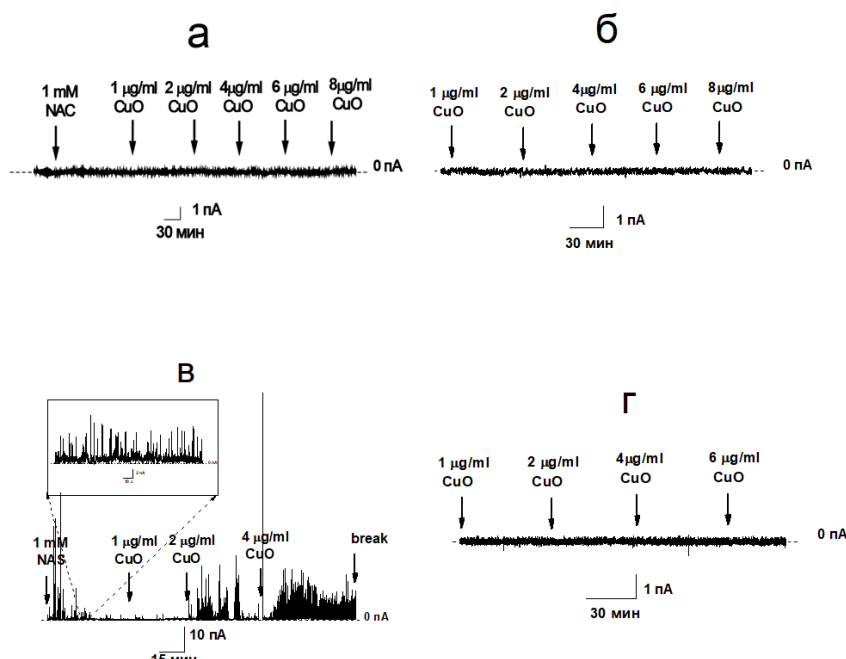


Рисунок 15. Флуктуации трансмембранных токов, протекающих через липидные бислои, модифицированные 2,5 мМ NAC и CuO.

Цитотоксичность комбинаций медьорганических комплексов и NAC

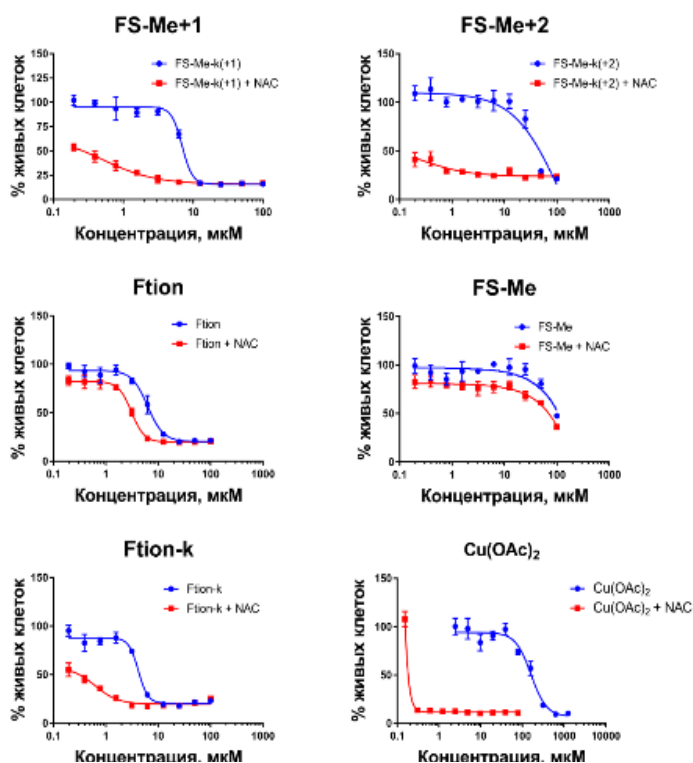


Рисунок 16. Цитотоксичность медьорганических соединений в комбинации с 2,5 мМ NAC для линии K562 (МТТ-тест).

Так как применимость НЧ может ограничиваться растворимостью и биораспределением, в дальнейших экспериментах использовали органические комплексы меди (II). Как видно из рисунка 18, и для этих соединений добавление NAC существенно усиливает цитотоксичность; эффективность определяется окружением катиона меди. Примечательно, что цитотоксичность безметалльных комплексов не усиливается добавлением NAC. Именно катион меди в оптимальном окружении необходим для реакции с восстановителем, генерирующей АФК.

Механизм взаимодействия медьсодержащих соединений и NAC

Химическую природу реакции устанавливали по возможности NAC и аскорбата восстанавливать Cu^{2+} . Реакции оценивали в циклической

вольтамперометрии (рисунок 17). Раствор медьорганического комплекса (Cu^{2+}) выявил только катодную волну (отрицательные значения тока), соответствующую электрохимическому восстановлению $\text{LCu}^{2+} \rightarrow \text{LCu}^{1+}$. При добавлении НАС или аскорбата (1:1 моль/моль) катодный ток уменьшился, а анодный ток увеличился через 5 мин, что указывает на восстановление Cu^{2+} до Cu^{1+} . Вольтамперограммы регистрировали при 960-250 мВ, что соответствует переходу Cu^{+2} в Cu^{+1} в соединении FS-Me.

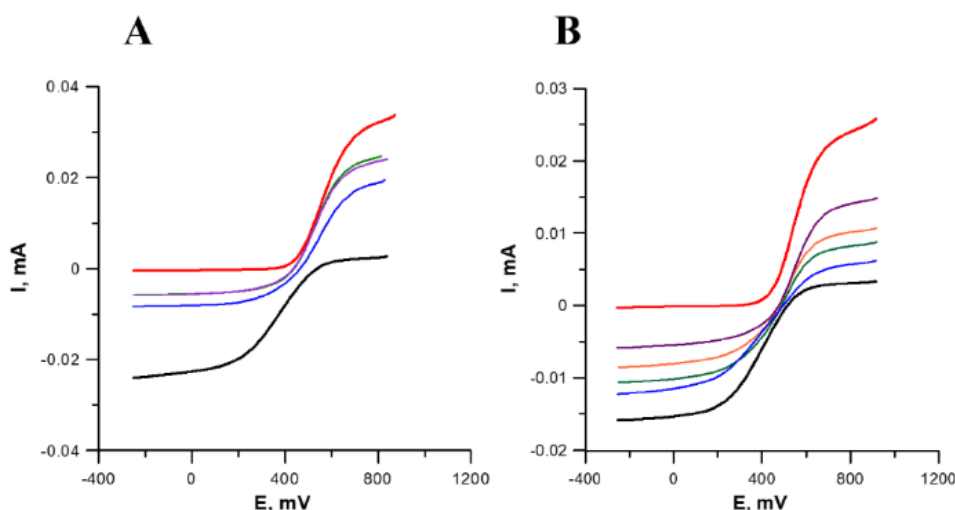


Рисунок 17. Вольтамперограммы восстановления Cu^{+2} в составе медьорганического комплекса FS-Me+2.

*Исследование противоопухолевой активности комбинации *in vivo**

Испытание комбинации решено было провести на самках мышей линии Balb/c. Комбинацию предполагалось вводить в брюшную полость с целью ограничения общерезорбтивной токсичности. Вначале подобраны максимальные переносимые дозы для НЧ CuO , медьорганических комплексов и НАС: 3 мг/кг, 6,125 мг/кг и 800 мг/кг, соответственно. Далее испытали противоопухолевые свойства комбинации FS-Me+2 и НАС (рисунок 19). Мышам линии Balb/c перевивали асцитную опухоль Эрлиха (день 0). Комбинацию медьорганического комплекса и НАС, а также соответствующие контроли вводили на 2-й день.

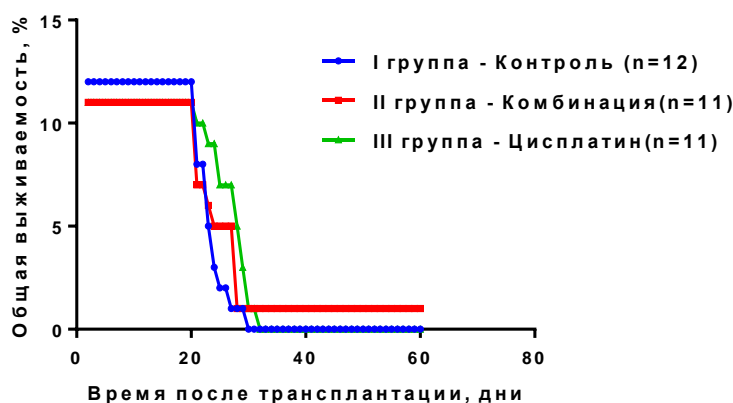


Рисунок 19. Выживаемость мышей с опухолью Эрлиха при экспериментальной терапии.

Судя по кривым Каплана-Мейера, характеризующими общую выживаемость (рисунок 19), значимой разницы между контрольной группой и животными, получавшими комбинацию, не обнаружена. Динамика смертности животных схожа с таковой в группе, которой давался цисплатин. Тем не менее, отмечено достоверное торможение роста опухоли в группе, получавшей комбинацию – такое же, как у мышей, получавших цисплатин (рисунок 20), что говорит о сопоставимости эффективности комбинации соединений меди с НАС и результатами конвенциональной химиотерапии.

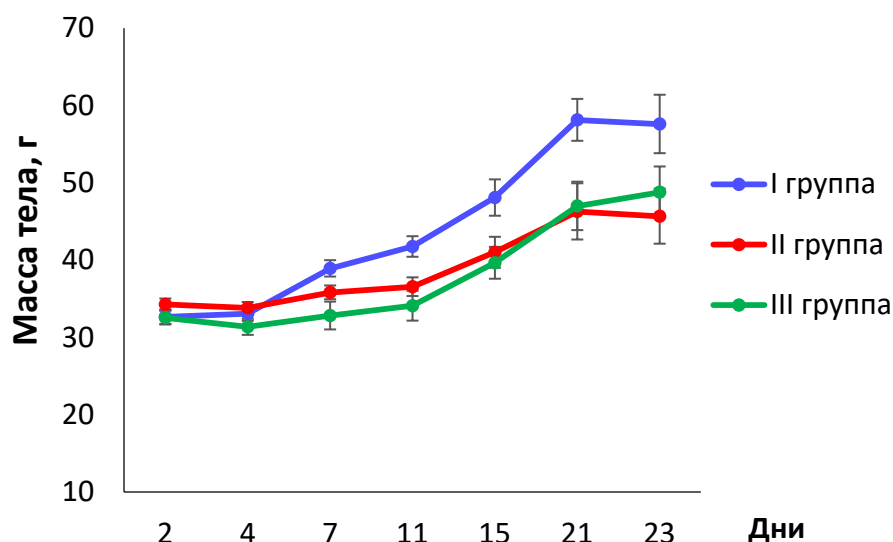


Рисунок 20.
Динамика увеличения массы тела мышей с опухолевым асцитом.
I – контроль, II – комбинация, III – цисплатин.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных ограничений эффективности химиотерапии опухолей является лекарственная устойчивость. Клетки, выжившие после неоднократных токсических воздействий, существенно отличаются от исходных. Особенно важно, что в таких клетках не функционируют апоптотические каскады: метаболическое перепрограммирование дает селективное преимущество в выживании. Разработка подходов к преодолению лекарственной устойчивости требует выявления молекулярных механизмов гибели, сохранившихся в резистентных клетках. Помимо апоптоза есть ряд других механизмов регулируемой клеточной гибели, многие из которых индуцируются повышением внутриклеточных АФК, нарушением баланса в метаболизме металлов или первичным повреждением плазматической мембраны. Правомерно предположить, что при блокировании апоптотических сигналов именно такие воздействия окажутся терапевтической альтернативой.

В настоящей работе исследованы биохимические механизмы гибели опухолевых клеток посредством смещения редокс-баланса в сторону окисления при восстановлении катионов меди (II). Установлено значительное (до 3-х порядков по соотношению 50%-х рост-ингибирующих концентраций)

увеличение цитотоксичности медьсодержащих соединений – неорганических (НЧ оксида, соли) и в составе сложных органических комплексов – при их комбинировании с НАС или аскорбатом. Отдельные компоненты комбинации использовали в нетоксичных концентрациях. Повышение чувствительности клеток достигнуто независимо от тканевой принадлежности. Особенно важно, что указанный эффект сохраняется в клетках с лекарственной устойчивостью. Выявленные закономерности выполняются только для соединений меди (II); другие переходные металлы неактивны в комбинациях с восстановителями.

При анализе молекулярных событий в ответ на комбинации выявлено довольно быстрое – в первые часы воздействия – нарушение целостности плазматической мембраны для молекул типа пропидия иодида (маркер некроза). Механизм гибели клеток сложный: признаки, характерные для апоптоза (Аннексин V-позитивность, снижение электрического потенциала митохондрий), сочетаются с некротическим нарушением целостности плазматической и других мембран. Мы считаем именно этот признак решающим: окислительное повреждение плазматической мембраны нерепарируемо (летально). Из-за быстроты его развития другие процессы, сопровождающие гибель, не успевают реализоваться. Клетки с лекарственной устойчивостью оказываются чувствительны к АФК-индуцируемому некрозу. Таким образом, мембраны – мишени терапевтических воздействий для элиминации таких клеток.

Исследование противоопухолевой эффективности *in vivo* позволяет считать комбинацию перспективной. Выявлено статистически достоверное торможение роста опухоли, сравнимое с эффективностью клинического препарата. Эффективность АФК-генерируемой гибели клеток можно увеличивать, оптимизируя структуру медьсодержащих соединений и режимы введения комбинаций.

ВЫВОДЫ

1. Тиолсодержащие соединения (N-ацетилцистеин, глутатион, цистеин) и аскорбат усиливают цитотоксичность оксида, солей и органических комплексов меди (II). Усиление находится в диапазоне от 3-5 до 900 раз (по соотношению 50%-х рост-ингибирующих концентраций до и после воздействия) и проявляется независимо от тканевой принадлежности клеток. Синергическое действие вызывается при введении соединений Cu(II) и восстановителей в концентрациях 5-40 нмоль/л и 2,5 ммоль/л, соответственно; в этих концентрациях компоненты нетоксичны при отдельном применении. Родительские линии и изогенные сублинии клеток с лекарственной устойчивостью одинаково чувствительны к указанным комбинациям.

2. Потенцирование цитотоксичности добавлением тиоловых соединений и аскорбата выявлено только для соединений меди (II). В случае других переходных металлов (железо, цинк, кобальт, молибден) синергический эффект отсутствовал.

3. С помощью исследования взаимодействия между Cu(II) и N-ацетилцистеином методами циклической вольтамперометрии и вращающегося дискового электрода по электрохимическим показателям тока окисления и восстановления установлено, что цитотоксичные АФК образуются в процессе восстановления меди (II) до одновалентного состояния с последующим участием Cu^+ в реакциях Габера-Вейса и Фентона.

4. Первоначальные признаки гибели клеток под влиянием комбинации медьорганических соединений (5-40 нмоль/л) и N-ацетилцистеина (2,5 ммоль/л) проявляются через 4-8 ч после добавления и сопровождаются окислительным повреждением плазматической мембраны, а также снижением электрического потенциала митохондрий на 70% без характерной для апоптоза протеолитической активации поли(АДФрибозо)полимеразы и каспазы-3. Повреждение мембран – ведущий фактор гибели родительских клеток и сублиний с лекарственной устойчивостью.

5. Максимальная переносимая доза лидерного медьорганического комплекса [(Z)-3-(2-флуорофенил)-2-метилтио-5-(пиридин-2-илметил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он]медь(II) дихлорида (FS-Me+2) и N-ацетилцистеина для самок мышей породы Balb/c - 6,25 и 400 мг/кг массы тела, соответственно, при трёхкратном внутрибрюшинном введении. Однократное введение комбинации FS-Me+2 и N-ацетилцистеина животным с асцитной аденокарциномой Эрлиха приводит к статистически достоверному торможению роста опухоли на 52% через 23 дня после введения. Величина этого показателя сопоставима с эффективностью клинического химиопрепарата цисплатина.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи в журналах, рецензируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science:

1. Kuchur O. A., Tsymbal S. A., et al. Metal-derived nanoparticles in tumor theranostics: Potential and limitations //Journal of Inorganic Biochemistry. – 2020. – Т. 209. – С. 111117.
2. Tsymbal S. A. et al. Copper-containing nanoparticles and organic complexes: metal reduction triggers rapid cell death via oxidative burst //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 20. – С. 11065.
3. Tsymbal S. A. et al. Recent advances in copper-based organic complexes and nanoparticles for tumor theranostics //Molecules. – 2022. – Т. 27. – №. 20. – С. 7066.

Публикации в иных изданиях:

1. Цымбал С.А. Комбинация наночастиц оксида меди и N-ацетилцистеина для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток//Сборник тезисов 8-го международного молодёжного медицинского конгресса - 2019. - с. 56.
2. Цымбал С.А. Новая комбинация неорганических композитов и органического соединения для элиминации клеток хронического миелоидного лейкоза//Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых – 2019.
3. Цымбал С.А. Комбинированное применение наночастиц оксида меди и N-ацетилцистеина для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Материалы международного научного форума "Ломоносов-2020", электронное издание, 2020.
4. Цымбал С.А., Штиль А.А. Восстановление экзогенной двухвалентной меди для элиминации полирезистентных опухолевых клеток // Сборник тезисов 24-ой Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология - Наука XXI века», с. 240, 2020.
5. Tsymbal S., Shtil A. 54P The combination of copper oxide nanoparticles and N-acetyl-L-cysteine triggers rapid oxidative burst and death of wild-type and multidrug-resistant tumour cells // Annals of Oncology, 31, S1233-S1234, 2020.
6. Цымбал С.А., Агаджанян Н.А. Гибель опухолевых клеток при действии комбинаций медьсодержащих соединений и восстановителей // Сборник материалов XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021», с. 320-321, 2021.
7. Цымбал С.А., Агаджанян Н.А., Штиль А.А. Система на основе наночастиц оксида меди в комбинации с восстановителями для индукции окислительного стресса в опухолевых клетках // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2021», электронное издание, 2021.
8. Цымбал С.А., Штиль А.А., Агаджанян Н.А. Индукция окислительного стресса комбинированием соединений меди и восстановителей для терапии опухолей // Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. Электронное издание, 2021
9. Агаджанян Н. А., Цымбал С. А., Духинова М. С., Штиль А. А. Использование меди N-ацетилцистеином и аскорбатом для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Материалы VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии. Электронное издание, 2021.
10. Цымбал С.А., Агаджанян Н.А., Штиль А.А. Преодоление лекарственной устойчивости опухолевых клеток за счет восстановления меди антиоксидантами VIII // Международная научно-практическая конференция

- молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Сборник тезисов, 2021.
11. Tsymbal S., Agadzhanian N., Shtil A. 65P Oxidative stress associated with Cu²⁺ to Cu⁺ reduction for eradicating wild type and multidrug-resistant tumor cells // *Annals of Oncology*, 32, S1365, 2021.
 12. Цымбал С.А., Агаджанян Н.А. Исследование цитотоксических свойств комбинации медьсодержащих агентов и восстановителей для борьбы с лекарственной устойчивостью опухолевых клеток // *Материалы XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022»*, с. 272-273, 2022.
 13. Цымбал С.А., Змитриченко Ю.Г. Восстановление двухвалентных катионов меди как средство для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток // *Сборник материалов конференции «Актуальные проблемы биомедицины – 2023»*, 2023.
 14. Цымбал С.А., Штиль А.А. Применение комбинации медьсодержащих соединений и восстановителей для борьбы с лекарственной устойчивостью опухолевых клеток // *Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. Электронное издание*, 2023.
 15. Цымбал С.А. Применение комбинации медьорганических соединений двухвалентной меди с N-ацетилцистеином для терапии опухолей с приобретённой лекарственной устойчивостью // *Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2023»*, электронное издание, 2023.

Патент:

1. Патент Российской Федерации № 2721771 на изобретение «Применение композиции наночастиц оксида меди и N-ацетилцистеина для индукции гибели клеток хронического миелоидного лейкоза».

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю А.А.Штилю за помощь в планировании и выполнении экспериментов, интерпретации результатов и обсуждении текста диссертации.

Автор благодарен соавторам и коллегам из Химико-биологического кластера университета ИТМО, а также выражает отдельную благодарность профессору Е.К. Белоглазкиной и к.х.н. А.А. Моисеевой (кафедра органической химии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова) за предоставленные медьорганические комплексы и электрохимические эксперименты, профессору О.С. Остроумовой и группе моделирования ионных каналов (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук Министерства науки и высшего

образования Российской Федерации) за работу с искусственными мембранами, В.А. Ольшевской и В.М. Алпатовой (Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН) за предоставленные порфириновые комплексы меди, Г.В. Точильникову и Ю.Г. Змитриченко (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации) за консультации по работе с лабораторными животными, а также В.В. Татарскому и коллективу лаборатории молекулярной онкобиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук Министерства науки и высшего образования за критические замечания.