

©Коллектив авторов

## ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА НИТРОЗОКОМПЛЕКСОВ РУТЕНИЯ И ИХ МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НА ЦИТОХРОМЫ P450 В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HepG2

Л.С. Ключова\*, В.А. Вавилин, А.Ю. Гришанова

Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики,  
Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,  
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12; \*эл. почта: klyushovals@mail.ru

В настоящее время активно ведутся исследования нитрозокомплексов рутения в качестве противоопухолевых агентов. На ранней стадии разработки лекарственных препаратов регулярно проводится оценка потенциальных взаимодействий между цитохромами P450 и новыми соединениями. Цель работы заключалась в изучении цитотоксической и антипролиферативной активности нитрозокомплексов рутения с метиловым/этиловым эфиром никотиновой и изоникотиновой кислоты, а также  $\gamma$ -пиколином на 2D- и 3D-культурах гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и неопухолевых фибробластов лёгких человека MRC-5, оценке фотоиндуцированной активности исследуемых соединений и изучении модулирующего действия на цитохромы P450 (CYP) — CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19. Исследование цитотоксической и антипролиферативной активности проводили на 2D- и 3D-клеточных моделях с помощью фенотипического скрининга на основе флуоресценции. С помощью целевого скрининга на основе флуоресценции исследовали экспрессию генов CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4. Результаты экспрессии CYP3A4 подтверждали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией в реальном времени. Исследованные нитрозокомплексы рутения проявляли дозозависимый цитотоксический эффект на HepG2 и MRC-5. Цитотоксическая активность комплексов с этилизоникотинатом (1) и никотинатом (3, 4) существенно ниже для MRC-5, чем для HepG2, для комплекса с метилизоникотинатом (2) выше для MRC-5, чем для HepG2, для комплекса с  $\gamma$ -пиколином (5) сравнима для обеих линий. Антипролиферативный эффект комплексов 2 и 5 на порядок выше для MRC-5, для комплексов 1, 3 и 4 сравним для обеих линий. Цитотоксическая активность всех соединений для 3D-HepG2 ниже, чем для 2D-HepG2 за исключением комплекса с метилникотинатом (4). Фотоактивация влияла на активность только комплекса 1: цитотоксическая активность снижалась, а антипролиферативная активность возрастала. Нитрозокомплексы рутения 1–4 являются индукторами CYP3A4 и CYP2C19, комплекс с  $\gamma$ -пиколином (5) — индуктором CYP3A4. Среди изученных нитрозокомплексов рутения наиболее перспективным потенциальным противоопухолевым соединением является соединение рутения с метилникотинатом (4).

**Ключевые слова:** нитрозокомплексы рутения; 3D-культура; HepG2; цитотоксичность; антипролиферативная активность; P450

**DOI:** 10.18097/PBMC20247001033

### ВВЕДЕНИЕ

Применение координационных соединений в качестве терапевтических противоопухолевых агентов вызывает всё больший интерес [1–3]. Комплексы платины (II), прежде всего цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин, широко используются в качестве противоопухолевых препаратов [4]. Однако они воздействуют не только на опухолевые, но и на другие быстро делящиеся клетки (клетки костного мозга, слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и др.), что приводит к различным осложнениям [5]. В настоящее время ведётся поиск новых координационных соединений на основе платины, золота, меди, железа, рутения и других металлов с улучшенными противоопухолевыми свойствами и новыми механизмами действия [6, 7].

Среди комплексов рутения наиболее известны НАМИ-А  $\{(\text{ImH})[\text{транс-Ru}(\text{ДМСО})(\text{Im})\text{Cl}_4]\}$ , Im — имидазол, KP1019  $\{(\text{IndH})[\text{транс-Ru}(\text{Ind})_2\text{Cl}_4]\}$ , Ind — индазол и KP1339  $\{\text{Na}[\text{транс-Ru}(\text{Ind})_2\text{Cl}_4]\}$ , дошедшие до клинических испытаний [8]. Особый

интерес вызывают нитрозокомплексы рутения, так как после фотоактивации или восстановления они способны выделять молекулы NO [9], которые в свою очередь участвуют в канцерогенезе и ингибировании роста опухоли [10]. Важно отметить, что небольшое изменение структуры нитрозокомплекса рутения может привести к изменению биологического эффекта, который можно дополнительно модулировать световым излучением [11].

В ранее проведённых исследованиях нитрозокомплексы рутения ос- $[\text{RuNOCl}_3\text{L}_2]$  (где L — метиловый/этиловый эфир никотиновой/изоникотиновой кислоты или  $\gamma$ -пиколин) проявили значительный дозозависимый цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток [12, 13]. Однако влияние этих соединений на неопухолевые клетки и на систему метаболизма не изучалось.

Клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) человека HepG2 является широко распространённой клеточной моделью для исследований специфических метаболических путей, связанных с опухолями печени, а также

тестирования кандидатов в противоопухолевые препараты, в том числе для оценки индуцирующего действия на цитохромы P450 (CYP). При этом клетки HepG2 могут быть менее чувствительны к воздействию индукторов CYP по сравнению с первичными гепатоцитами человека (PHH) [14], что связано со сниженным содержанием P450 в образцах опухолей ГЦК по сравнению с окружающей их неопухолевой (эталонной) тканью [15]. Как и другие заболевания, ГЦК оказывает влияние на активность CYP, отвечающих за метаболизм ксенобиотиков и лекарственных средств. Действительно, CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4, в основном локализующиеся в печени, являются прогностическими маркерами ГЦК [16, 17]. Показано, например, что низкая экспрессия генов CYP2C9 и CYP2C19 связана с неблагоприятным прогнозом развития гепатоцеллюлярной карциномы [16], а подавление CYP3A4 является предиктором её раннего рецидива [17]. Кроме того, цитохромы подсемейств CYP2C и CYP3A индуцируются многими препаратами и влияют на фармакокинетику и фармакодинамику большого количества лекарственных средств [18]. Поэтому на ранней стадии разработки лекарственных препаратов регулярно проводится оценка потенциальных взаимодействий между цитохромами P450 и новыми соединениями [19].

Целью данного исследования было изучение цитотоксической и антипролиферативной активности нитрозокомплексов рутения ос-[RuNOCl<sub>3</sub>L<sub>2</sub>] на 2D- и 3D-культурах HepG2 и неопухолевых фибробластах лёгких человека MRC-5, оценка влияния фотоактивирующего излучения на активность исследуемых соединений и изучение модулирующего действия на цитохромы P450 — CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4.

## МЕТОДИКА

### Исследуемые соединения

Исследовали нитрозокомплексы рутения с метиловым/этиловым эфиром никотиновой/изоникотиновой кислоты и γ-пиколином: [RuNOCl<sub>3</sub>(InicEt)<sub>2</sub>] (1), [RuNOCl<sub>3</sub>(InicMe)<sub>2</sub>] (2), [RuNOCl<sub>3</sub>(NicEt)<sub>2</sub>] (3), [RuNOCl<sub>3</sub>(NicMe)<sub>2</sub>] (4) и

[RuNOCl<sub>3</sub>(γ-Pic)<sub>2</sub>] (5), где InicEt — этилизоникотинат, InicMe — метилизоникотинат, NicEt — этилникотинат, NicMe — метилникотинат и γ-Pic — γ-пиколин (рисунк). Комплексы [12, 13] были предоставлены научной группой лаборатории химии редких платиновых металлов Института неорганической химии СО РАН (ИНХ СО РАН) (д. хим. н. Г.А. Костин). Применяемые в клинической практике препараты карбоплатин и цисплатин использовали в качестве препаратов сравнения цитотоксической и антипролиферативной активности, а дексаметазон (DEX) и рифампицин (RIF) — в качестве положительного контроля индукции CYP.

### Клеточные линии, условия культивирования и обработки соединениями

Клеточные линии человека HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома) и MRC-5 (фибробласты лёгкого) были предоставлены коллегами из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии “Вектор” (Россия). Клетки HepG2 культивировали в среде IMDM, фибробласты MRC-5 — в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media, “Sigma-Aldrich”, США) с 10% содержанием в них эмбриональной бычьей сыворотки в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. Клетки высевали на 96-луночные (по 5×10<sup>3</sup> клеток на лунку) или на 12-луночные (по 4×10<sup>4</sup> клеток на лунку) планшеты в соответствующей среде. В качестве 3D-модели использовали сфероиды. Для получения сфероидов клетки HepG2 высевали на 96-луночные низкоадгезивные U-образные планшеты (“Thermo Fisher Scientific”, США) по 1,5×10<sup>3</sup> клеток на лунку и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. Обработку клеток применяемыми в клинике препаратами и исследуемыми комплексами проводили через 24 ч после посева.

Для исследования цитотоксической и антипролиферативной активности клетки инкубировали с нитрозокомплексами рутения 1–5 (0,5–25 мкМ или 1–50 мкМ), цисплатином и карбоплатином (1–50 мкМ) в течение 48 ч. Для изучения фотоиндуцированных эффектов клетки дополнительно подвергали воздействию светодиода (длина волны 445 нм, мощность 30 мВт)

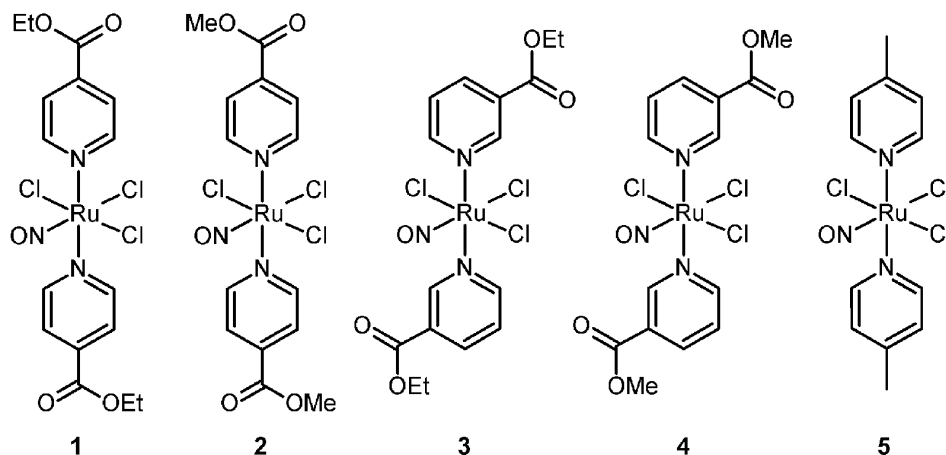


Рисунок. Структурные формулы исследуемых нитрозокомплексов рутения.

в течение 30 мин через 4 ч после добавления препаратов, затем снова помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 48 ч. Для оценки модулирующих эффектов на цитохромы P450 клетки HepG2 инкубировали с нитрозокомплексами рутения 1–5 (0,1–5 мкМ), DEX (10 мкМ, 100 мкМ) и RIF (25 мкМ, 100 мкМ) в течение 48 ч с заменой среды и добавлением соединений каждые 24 ч. Конечная концентрация растворителя (ДМСО) в среде не превышала 1% (объём/объём).

#### Фенотипический скрининг

Жизнеспособность и пролиферацию клеток оценивали методом двойного окрашивания Hoechst/пропидий йодид (PI). 2D-культуры окрашивали смесью флуоресцентных красителей Hoechst 33342 (“Sigma-Aldrich”, Швейцария) и PI (“Invitrogen”, США) в течение 30 мин [20]. Сфероиды — в течение 3 ч [21] при 37°C. Цитотоксическую активность (LC<sub>50</sub>, концентрацию при которой % живых клеток снижен на 50% по сравнению с контролем) и антипролиферативную активность (IC<sub>50</sub>, концентрацию, при которой % количества клеток снижен на 50% по сравнению с контролем) рассчитывали после аппроксимации нелинейной функцией кривой экспериментальной зависимости живых клеток (%) и количества клеток (%) соответственно от концентрации соединения (мкМ). Параметр IC<sub>50</sub> для 3D-модели рассчитывали после аппроксимации нелинейной функцией кривой экспериментальной зависимости площади сфероида (%) от концентрации соединения (мкМ).

#### Целевой скрининг

Экспрессию *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19* на уровне мРНК определяли с помощью набора ViewRNA Cell Plus Assay Kit (“Invitrogen”) в соответствии с инструкциями производителя. мРНК *CYP3A4*, *CYP2C9* и *CYP2C19* детектировали с использованием флуоресцентных зондов ViewRNA типа 1 (*CYP3A4*, VA1-10196-VCP), типа 4 (*CYP2C9*, VA4-3084099-VCP) и типа 6 (*CYP2C19*, VA6-3169546-VCP). Ядра клеток окрашивали DAPI. Экспрессию *CYP3A4* на уровне белка оценивали с помощью иммунофлуоресцентного анализа [22]. Клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 мин, проводили пермобилизацию 0,1% раствором Triton X-100 в течение 15 мин, блокировку 1% бычьим сывороточным альбумином — в течение 30 мин. Клетки инкубировали с первичными моноклональными антителами *CYP3A4* (“Invitrogen”, MA5-17064) в течение 1 ч (1:200), с вторичными антителами (“Invitrogen”, A-10631), меченными Alexa Fluor™ 488, в течение 1 ч при комнатной температуре. За 5 мин до окончания инкубации с вторичными антителами добавляли Hoechst 33342 для визуализации ядер.

#### Получение и анализ изображений

Съемку проводили на приборе IN Cell Analyzer 2200 (“GE Healthcare”, Великобритания). Изображения 2D-культур получали по 4 поля на лунку

с увеличением 200×. Для сфероидов получали z-стопки изображений с увеличением 100× в светлом поле и флуоресцентных каналах (7–11 изображений, разделённых по оси z 15 мкм, начиная со дна). Изображения анализировали с использованием программного обеспечения IN Cell Investigator (“GE Healthcare”). Для сфероидов отдельные z-плоскости сегментировали и анализировали как 2D-изображения для подсчёта ядер живых/мёртвых клеток, затем суммировали объекты, смещённые относительно друг друга в каждой плоскости (максимальное смещение ядер 5–10 мкм) [21].

#### ОТ-ПЦР анализ *CYP3A4* в реальном времени

РНК выделяли с помощью набора RealBest Extraction 100 (“Вектор-Бест”, Россия), обрабатывали ДНКазой (“Promega”, США) и осаждали. 1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции с использованием олиго(dT)18 праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV-RH (“Биолабмикс”, Россия). Уровень мРНК оценивали в реакционной смеси BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2×) (“Биолабмикс”) на CFX96 (“Bio-Rad Laboratories”, США). Образцы анализировали в трёх повторах (технические повторы) и в трёх повторах эксперимента. Изменение кратности мРНК *CYP3A4* рассчитывали методом 2<sup>-ΔΔCt</sup> относительно генов домашнего хозяйства (*GADPH* и *RPLP0*).

Использовали следующие праймеры: *CYP3A4* человека, 5'-CATTCCTCATCCCAATCTTGAAGT-3' (прямой) и 5'-CCACTCGGTGCTTTTGTGTATCT-3' (обратный); *GAPDH* человека, 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCC-3' (прямой) и 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAG-3' (обратный); *RPLP0* человека, 5'-TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT-3' (прямой) и 5'-CAATCTGCAGACAGACACTGG-3' (обратный).

#### Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica 8. Данные по цитотоксической и цитостатической активности выражены как среднее трёх независимых экспериментов (12 значений в каждом эксперименте) ± среднееквадратическое отклонение (M±σ). Статистическую значимость близко лежащих средних значений проверяли, применяя *t*-критерий Стьюдента. Данные о влиянии соединений на экспрессию цитохромов P450 представлены в виде медианы и интерквартильного интервала Me [Q1–Q3]. Статистическую значимость различий оценивали, применяя непараметрический критерий Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при *p*<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние нитрозокомплексов рутения [RuNOCl<sub>3</sub>(InicEt)<sub>2</sub>] (1), [RuNOCl<sub>3</sub>(InicMe)<sub>2</sub>] (2), [RuNOCl<sub>3</sub>(NicEt)<sub>2</sub>] (3), [RuNOCl<sub>3</sub>(NicMe)<sub>2</sub>] (4) и [RuNOCl<sub>3</sub>(γ-Pic)<sub>2</sub>] (5) на жизнеспособность клеток человека MRC-5 и 2D- и 3D-культур HepG2 без фотоактивации и с фотоактивацией

## СВОЙСТВА НИТРОЗОКОМПЛЕКСОВ РУТЕНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HepG2

исследовали с помощью фенотипического скрининга. В таблицах 1 и 2 приведены значения  $LC_{50}$  и  $IC_{50}$  после 48 ч инкубации клеток с соединениями.

Для гепатоцеллюлярной карциномы (2D-модель) цитотоксическая активность комплексов на основе  $\gamma$ -пиколина (5) и изоникотиновой кислоты (1, 2) была выше, чем для комплексов на основе никотиновой кислоты (3, 4), почти в 4 раза ( $t$ -критерий Стьюдента,  $p<0,05$ ), наличие этилового/метилового эфира не влияет на их активность. Фотоиндукция (445 нм, 30 мВт, 30 мин) снижает цитотоксический эффект комплекса 1 в 2 раза ( $t$ -критерий Стьюдента,  $p<0,05$ ), на остальные не оказывает влияния. Для неопухолевых фибробластов наиболее активен комплекс 2 с метилизоникотинамом в структуре, его токсичность выше для MRC-5, чем для HepG2, а токсичность комплексов 1, 3 и 4, наоборот, меньше для MRC-5, чем для HepG2 ( $t$ -критерий Стьюдента,  $p<0,05$ ). Для сфероидов HepG2 все комплексы были менее токсичны почти в 2 раза, чем для 2D-HepG2, за исключением комплекса с метилникотинамом (4) — его активность для сфероидов выше ( $t$ -критерий Стьюдента,  $p<0,05$ ).

Антипролиферативная активность комплексов рутения с метилизоникотинамом (2) и с  $\gamma$ -пиколином (5) была значительно выше (почти в 6 раз)

для неопухолевых клеток, чем для опухолевых ( $t$ -критерий Стьюдента,  $p<0,05$ ), активность на 2D-HepG2 до и после облучения была сопоставима. Активность комплексов с никотинамом (3, 4) была выше для MRC-5, фотоактивация усиливает активность комплексов 4 и 1. Комплекс с этилникотинамом (1) был наименее активен для 2D-HepG2 без облучения ( $t$ -критерий Стьюдента,  $p<0,05$ ).

Результаты по оценке уровней мРНК *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19* гибридизацией *in situ* представлены в таблице 3. Комплексы 1–4 проявляли индуцирующий эффект на мРНК *CYP3A4* и *CYP2C19*, комплекс 5 — на мРНК *CYP3A4* в меньшем диапазоне концентраций, чем классические индукторы DEX и RIF. Статистически значимых изменений мРНК *CYP2C9* для исследуемых нитрозокомплексов рутения не обнаружено. Среди соединений на основе никотиновой кислоты комплекс с метилникотинамом (4) активнее для *CYP3A4*, чем с этилникотинамом (3). Результаты экспрессии мРНК *CYP3A4* также подтверждены ОТ-ПЦР в реальном времени и совпадают с оценкой методом гибридизации *in situ* (данные не представлены). Экспрессия *CYP3A4* на уровне белка (табл. 3) сравнима для всех соединений, за исключением комплекса с  $\gamma$ -пиколином.

Таблица 1. Цитотоксическая активность ( $LC_{50}$ ) нитрозокомплексов рутения после 48 ч инкубации (n=3)

Соединение	$LC_{50}$ , мкМ			
	MRC-5	2D-HepG2		3D-HepG2
		Без фотоактивации	После фотоактивации	
[RuNOCl <sub>3</sub> (InicEt) <sub>2</sub> ] (1)	10,0±0,2	2,9±0,2	6,5±0,4	9,2±0,2
[RuNOCl <sub>3</sub> (InicMe) <sub>2</sub> ] (2)	1,8±0,2	3,6±0,3	3,8±0,2	7,4±0,1
[RuNOCl <sub>3</sub> (NicEt) <sub>2</sub> ] (3)	24,7±0,5	13,2±2,5	17,1±1,0	38,8±1,5
[RuNOCl <sub>3</sub> (NicMe) <sub>2</sub> ] (4)	>25	12,8±0,3	14,2±0,7	8,0±0,2
[RuNOCl <sub>3</sub> ( $\gamma$ -Pic) <sub>2</sub> ] (5)	2,8±0,2	3,5±0,2	4,2±0,3	7,0±0,2
Карбоплатин	35,7±0,3	32,2±2,1	—	>50
Цисплатин	>50	33,0±5,4	—	49,0±1,3

Таблица 2. Антипролиферативная активность ( $IC_{50}$ ) нитрозокомплексов рутения после 48 ч инкубации (n=3)

Соединение	$IC_{50}$ , мкМ			
	MRC-5	2D-HepG2		3D-HepG2
		Без фотоактивации	После фотоактивации	
[RuNOCl <sub>3</sub> (InicEt) <sub>2</sub> ] (1)	3,7±0,1	7,4±0,3	2,9±0,2	5,0±0,2
[RuNOCl <sub>3</sub> (InicMe) <sub>2</sub> ] (2)	0,42±0,04	3,8±0,3	3,9±0,4	4,8±0,3
[RuNOCl <sub>3</sub> (NicEt) <sub>2</sub> ] (3)	6,8±0,1	10,2±0,6	9,8±0,3	10,8±0,3
[RuNOCl <sub>3</sub> (NicMe) <sub>2</sub> ] (4)	5,9±0,1	8,7±0,2	7,1±0,3	7,3±0,4
[RuNOCl <sub>3</sub> ( $\gamma$ -Pic) <sub>2</sub> ] (5)	0,45±0,04	3,3±0,3	3,6±0,3	6,6±0,2
Карбоплатин	6,0±0,3	3,8±0,2	—	10,6±0,3
Цисплатин	5,8±0,2	3,6±0,2	—	11,6±0,2

Таблица 3. Кратное изменение интенсивности флуоресценции мРНК CYP и белка CYP3A4 в 2D-культуре HepG2 относительно уровня в контроле при воздействии соединений после 48 ч инкубации, ME [Q1–Q3] (n=12)

Соединение	Концентрация, мкМ	Кратное изменение интенсивности флуоресценции			
		мРНК			Белок
		CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4	CYP3A4
[RuNOCl <sub>3</sub> (InicEt) <sub>2</sub> ] (1)	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]
[RuNOCl <sub>3</sub> (InicMe) <sub>2</sub> ] (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]
[RuNOCl <sub>3</sub> (NicEt) <sub>2</sub> ] (3)	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]
[RuNOCl <sub>3</sub> (NicMe) <sub>2</sub> ] (4)	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]
[RuNOCl <sub>3</sub> (γ-Pic) <sub>2</sub> ] (5)	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]
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]
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]

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

## ОБСУЖДЕНИЕ

Некоторые комплексы рутения демонстрируют ярко выраженные противоопухолевые свойства, что способствует повышению интереса к соединениям на его основе [7]. Интерес к нитрозокомплексам рутения обусловлен ещё и тем, что их активность можно дополнительно модулировать световым излучением [11]. Наше предыдущее исследование выявило несколько соединений рутения, которые потенциально могут действовать как эффективные цитотоксические препараты. В частности, было показано, что комплексы **1–3** и **5** одинаково активны для разных опухолевых клеток человека Hep2 (карцинома гортани) и HepG2, в то время как активность комплекса **4** для разных линий отличается [12, 13].

В настоящем исследовании показано, что цитотоксическая активность нитрозокомплекса рутения с метилникотинатом (**4**) значительно выше для ГЦК HepG2, чем для неопухолевых фибробластов MRC-5. Кроме того, цитотоксическая активность для 2D-HepG2 (в 2 раза) и 3D-HepG2 (более чем в 6 раз) выше, чем у цисплатина и карбоплатина, но антипролиферативная активность сравнима для обеих линий клеток, а также с препаратами цисплатин и карбоплатин. Цитотоксическая активность соединения **4** выше для сфероидов, чем для 2D-культуры и не меняется при воздействии фотоиндуцирующего излучения. В диапазоне концентраций, не влияющих на жизнеспособность HepG2, комплекс индуцировал CYP3A4 на уровне мРНК и белка и CYP2C19 на уровне мРНК, начиная с концентрации 1 мкМ,

и не влиял на экспрессию мРНК *CYP2C9*. Показано, что низкая экспрессия генов *CYP2C9* и *CYP2C19* связана с неблагоприятным прогнозом развития гепатоцеллюлярной карциномы [16], а подавление *CYP3A4* — предиктор её раннего рецидива [17].

Действие комплекса с этилникотинатом (**3**) на жизнеспособность HepG2 и MRC-5 сравнимо с цисплатином и карбоплатином, а антипролиферативная активность также сравнима с комплексом **4**. Комплекс **3** является более слабым индуктором *CYP3A4* по сравнению с комплексом **4** и не влияет на экспрессию *CYP2C9*. Комплексы с метилизоникотинатом (**2**) и  $\gamma$ -пиколином (**5**) проявляют сравнимый цитотоксический и антипролиферативный эффекты как для 2D-, так и для 3D-HepG2, но на порядок активнее для MRC-5. На уровне мРНК комплекс с метилизоникотинатом (**2**) индуцирует *CYP3A4* и *CYP2C19*, комплекса с  $\gamma$ -пиколином (**5**) индуцировал *CYP3A4*. При фотоактивации комплекс с этилizonикотинатом (**1**) менял свою активность: его цитотоксическая активность снижалась, а антипролиферативная увеличивалась. Несмотря на то, что механизмы действия цитотоксического и антипролиферативного эффектов химических соединений часто перекрываются, в них могут быть выявлены и некоторые различия [23]. Эффект снижения цитотоксической и увеличения антипролиферативной активности комплекса **1** после фотоактивации, вероятно, связан с тем, что механизм действия фотопродуктов комплекса на клетки существенно отличается от механизма действия самого комплекса. Обнаружена также селективность комплекса **1** для HepG2 и MRC-5: цитотоксическая активность в 3 раза выше для HepG2, а антипролиферативная активность наоборот ниже. Влияние на рост клеток для 2D- и 3D-HepG2 сравнимо, а вот цитотоксический эффект в три раза ниже для 3D-модели. Комплекс **1** также индуцирует *CYP3A4* и *CYP2C19*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нитрозокомплекс рутения с метилникотинатом (**4**) является наиболее перспективным соединением с точки зрения потенциальной противоопухолевой активности среди всех изученных комплексов. Он проявляет дозозависимую цитотоксическую активность, которая выше, чем у цисплатина и карбоплатина, и специфична для опухолевых клеточных линий. Однако следует отметить, что антипролиферативная активность для опухолевых клеток сравнима с таковой для неопухолевых фибробластов MRC-5. Фотоактивация не влияет на активность комплекса. Соединение **4** одинаково эффективно как на 2D-, так и на 3D-культуре HepG2. Комплекс индуцирует *CYP3A4* на уровне мРНК и белка, *CYP2C19* на уровне мРНК и не влияет на экспрессию мРНК *CYP2C9*.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории химии редких платиновых металлов

ИНХ СО РАН Е.Д. Столяровой и Г.А. Костину за любезно предоставленные нитрозокомплексы рутения. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Протеомный анализ” Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90129. Работа была поддержана бюджетным финансированием (регистрационный номер 122032200236-1).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gasser G., Ott I., Metzler-Nolte N. (2011) Organometallic anticancer compounds. J. Med. Chem., **54**(1), 3-25. DOI: 10.1021/jm100020w
2. Zhang P., Sadler P.J. (2017) Advances in the design of organometallic anticancer complexes. J. Organomet. Chem., **839**, 5-14. DOI: 10.1016/j.jorgchem.2017.03.038
3. Singh V.K., Singh V.K., Mishra A., Varsha, Singh A.A., Prasad G., Singh A.K. (2023) Recent advancements in coordination compounds and their potential clinical application in the management of diseases: An up-to-date review. Polyhedron, **241**, 116485. DOI: 10.1016/j.poly.2023.116485
4. Tsvetkova D., Ivanova S. (2022) Application of approved cisplatin derivatives in combination therapy against different cancer diseases. Molecules, **27**(8), 2466. DOI: 10.3390/molecules27082466
5. Barabas K., Milner R., Lurie D., Adin C. (2008) Cisplatin: A review of toxicities and therapeutic applications. Veterinary Comparative Oncology, **6**(1), 1-18. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2007.00142.x
6. Sun Y., Lu Y., Bian M., Yang Z., Ma X., Liu W. (2021) Pt(II) and Au(III) complexes containing Schiff-base ligands: A promising source for antitumor treatment. Eur. J. Med. Chem., **211**, 113098. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.113098
7. Leijen S., Burgers S.A., Baas P., Pluim D., Tibben M., van Werkhoven E., Alessio E., Sava G., Beijnen J.H., Schellens J.H.M. (2015) Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. Investigational New Drugs, **33**(1), 201-214. DOI: 10.1007/s10637-014-0179-1

8. Alessio E., Messori L. (2019) NAMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face: A case story in medicinal inorganic chemistry. *Molecules*, **24**(10), 1995. DOI: 10.3390/molecules24101995
9. Stepanenko I., Zalibera M., Schaniel D., Telser J., Arion V.B. (2022) Ruthenium-nitrosyl complexes as NO-releasing molecules, potential anticancer drugs, and photoswitches based on linkage isomerism. *Dalton Transactions*, **51**(14), 5367-5393. DOI: 10.1039/D2DT00290F
10. Ridnour L.A., Thomas D.D., Switzer C., Flores-Santana W., Isenberg J.S., Ambs S., Roberts D.D., Wink D.A. (2008) Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide — Biol. Chem.*, **19**(2), 73-76. DOI: 10.1016/j.niox.2008.04.006
11. Bocé M., Tassé M., Mallet-Ladeira S., Pillet F., da Silva C., Vicendo P., Lacroix P.G., Malfant I., Rols M.-P. (2019) Effect of trans(NO, OH)-[RuFT(Cl)(OH)NO](PF<sub>6</sub>) ruthenium nitrosyl complex on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Sci. Rep.*, **9**(1), 4867. DOI: 10.1038/s41598-019-41222-0
12. Makhinya A.N., Eremina J.A., Sukhikh T.S., Baidina I.A., Il'in M.A., Klyushova L.S., Lider E.V. (2019) Cytotoxicity and crystal structures of nitrosoruthenium complexes mer-[Ru(NO)Py<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>] and mer-[Ru(NO)(γ-Pic)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>]. *ChemistrySelect*, **4**(19), 5866-5871. DOI: 10.1002/slct.201900111
13. Rechitskaya E.D., Kuratieva N.V., Lider E.V., Eremina J.A., Klyushova L.S., Eltsov I.V., Kostin G.A. (2020) Tuning of cytotoxic activity by bio-mimetic ligands in ruthenium nitrosyl complexes. *J. Mol. Struct.*, **1219**, 128565. DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.128565
14. Choi J.M., Oh S.J., Lee S.Y., Im J.H., Oh J.M., Ryu C.S., Kwak H.C., Lee J.-Y., Kang K.W., Kim S.K. (2015) HepG2 cells as an *in vitro* model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.*, **38**(5), 691-704. DOI: 10.1007/s12272-014-0502-6
15. Nekvindova J., Mrkvicova A., Zubanova V., Hyrslova Vaculova A., Anzenbacher P., Soucek P., Radova L., Slaby O., Kiss I., Vondracek J., Spicakova A., Bohovicova L., Fabian P., Kala Z., Palicka V. (2020) Hepatocellular carcinoma: Gene expression profiling and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochromes P450. *Biochem. Pharmacol.*, **177**, 113912. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113912
16. Wang X., Yu T., Liao X., Yang C., Han C., Zhu G., Huang K., Yu L., Qin W., Su H., Liu X., Peng T. (2018) The prognostic value of CYP2C subfamily genes in hepatocellular carcinoma. *Cancer Medicine*, **7**(4), 966-980. DOI: 10.1002/cam4.1299
17. Ashida R., Okamura Y., Ohshima K., Kakuda Y., Uesaka K., Sugiura T., Ito T., Yamamoto Y., Sugino T., Urakami K., Kusuhara M., Yamaguchi K. (2017) CYP3A4 gene is a novel biomarker for predicting a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics*, **14**(6), 445-453. DOI: 10.21873/cgp.20054
18. Zanger U.M., Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.*, **138**(1), 103-141. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007
19. Lu C., Di L. (2020) *In vitro* and *in vivo* methods to assess pharmacokinetic drug-drug interactions in drug discovery and development. *Biopharmaceutics Drug Disposition*, **41**(1-2), 3-31. DOI: 10.1002/bdd.2212
20. Solovieva A.O., Vorotnikov Y.A., Trifonova K.E., Efremova O.A., Krasilnikova A.A., Brylev K.A., Vorontsova E.V., Avrorov P.A., Shestopalova L.V., Poveshchenko A.F., Mironov Y.V., Shestopalov M.A. (2016) Cellular internalisation, bioimaging and dark and photodynamic cytotoxicity of silica nanoparticles doped by {Mo<sub>6</sub>I<sub>8</sub>}<sup>4+</sup> metal clusters. *J. Materials Chem. B*, **4**(28), 4839-4846. DOI: 10.1039/c6tb00723f
21. Sirenko O., Mitlo T., Hesley J., Luke S., Owens W., Cromwell E.F. (2015) High-content assays for characterizing the viability and morphology of 3D cancer spheroid cultures. *Assay Drug Development Technologies*, **13**(7), 402-414. DOI: 10.1089/adt.2015.655
22. Mancio-Silva L., Fleming H.E., Miller A.B., Milstein S., Liebow A., Haslett P., Sepp-Lorenzino L., Bhatia S.N. (2019) Improving drug discovery by nucleic acid delivery in engineered human microlivers. *Cell Metabolism*, **29**(3), 727-735. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.02.003
23. Mervin L.H., Cao Q., Barrett I.P., Firth M.A., Murray D., McWilliams L., Haddrick M., Wigglesworth M., Engkvist O., Bender A. (2016) Understanding cytotoxicity and cytostaticity in a high-throughput screening collection. *ACS Chemical Biology*, **11**(11), 3007-3023. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00538

Поступила в редакцию: 29. 11. 2023.  
После доработки: 25. 12. 2023.  
Принята к печати: 26. 12. 2023.

THE CYTOTOXIC AND ANTIPROLIFERATIVE PROPERTIES  
OF RUTHENIUM NITROSYL COMPLEXES AND THEIR MODULATION EFFECT  
ON CYTOCHROME P450 IN THE HepG2 CELL LINE

*L.S. Klyushova\*, V.A. Vavilin, A.Yu. Grishanova*

Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine,  
2/12 Timakova str., Novosibirsk, 630060 Russia; \*e-mail: klyushovals@mail.ru

Ruthenium nitrosyl complexes are actively investigated as antitumor agents. Evaluation of potential interactions between cytochromes P450 (CYPs) with new compounds is carried out regularly during early drug development. In this study we have investigated the cytotoxic and antiproliferative activities of ruthenium nitrosyl complexes with methyl/ethyl esters of nicotinic and isonicotinic acids and  $\gamma$ -picoline against 2D and 3D cultures of human hepatocellular carcinoma HepG2 and non-cancer human lung fibroblasts MRC-5, assessed their photoinduced activity at  $\lambda_{\text{rad}} = 445$  nm, and also evaluated their modulating effect on CYP3A4, CYP2C9, and CYP2C19. The study of cytotoxic and antiproliferative activities against 2D and 3D cell models was performed using phenotypic-based high content screening (HCS). The expression of *CYP3A4*, *CYP2C9*, and *CYP2C19* mRNAs and CYP3A4 protein was examined using target-based HCS. The results of *CYP3A4* mRNA expression were confirmed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The ruthenium nitrosyl complexes exhibited a dose-dependent cytotoxic effect against HepG2 and MRC-5 cells. The cytotoxic activity of complexes with ethyl isonicotinate (**1**) and nicotinate (**3**, **4**) was significantly lower for MRC-5 than for HepG2, for a complex with methyl isonicotinate (**2**) it was higher for MRC-5 than for HepG2, for a complex with  $\gamma$ -picoline (**5**) it was comparable for both lines. The antiproliferative effect of complexes **2** and **5** was one order of magnitude higher for MRC-5; for complexes **1**, **3**, and **4** it was comparable for both lines. The cytotoxic activity of all compounds for 3D HepG2 was lower than for 2D HepG2, with the exception of **4**. Photoactivation affected the activity of complex **1** only. Its cytotoxic activity decreased, while the antiproliferative activity increased. The ruthenium nitrosyl complexes **1–4** acted as inducers of *CYP3A4* and *CYP2C19*, while the complex with  $\gamma$ -picoline (**5**) induced of *CYP3A4*. Among the studied ruthenium nitrosyl complexes, the most promising potential antitumor compound is the ruthenium compound with methyl nicotinate (**4**).

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

**Key words:** ruthenium nitrosyl complexes; 3D cell culture; HepG2; cytotoxicity; antiproliferative activity; P450

**Funding.** The study was carried out with financial support from the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-34-90129). The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. 122032200236-1).

Received: 29.11.2023; revised: 25.12.2023; accepted: 26.12.2023.