

ВТОРИЧНАЯ МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ КАК МЕХАНИЗМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГИБРИДНЫХ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

М.А. Додохова

к.м.н., доцент, кафедра биомедицины и психофизиологии и общей и клинической биохимии № 2,
Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону, Россия)
E-mail: dodohova@mail.ru

А.В. Сафроненко

д.м.н., профессор, кафедра фармакологии и клинической фармакологии,
Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону, Россия)
E-mail: andrejsaf@mail.ru

И.М. Котиева

д.м.н., профессор, кафедра патологической физиологии,
Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону, Россия)
E-mail: kukulik70@mail.ru

Е.Р. Милаева

д.х.н., профессор, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия)
E-mail: helenamilaeva@mail.ru

Д.Б. Шпаковский

к.х.н., ст. науч. сотрудник, научно-исследовательская лаборатория биоэлементоорганической химии,
кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия)
E-mail: dmshpak@mail.ru

В.Г. Трепель

к.м.н., филиал г. Ростова-на-Дону ФГБУ «Информационный центр по экспертизе, учету и анализу
обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора (г. Ростов-на-Дону, Россия)
E-mail: vartantrepel.61@gmail.com

М.С. Алхусейн-Кулягинова

ст. лаборант, кафедра химии,
Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону, Россия)
E-mail: rita.kuljaginva@rambler.ru

В.М. Котиева

студентка, лечебно-профилактический факультет,
Ростовский государственный медицинский университет (г. Ростов-на-Дону, Россия)
E-mail: kotieva.violetta@mail.ru

Изучено влияние гибридных оловоорганических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, на уровень митохондриальной дисфункции в митохондриях печени и первичном опухолевом узле животных-опухоленосителей (меланома В16).

Цель исследования – оценка некоторых биохимических маркеров окислительного повреждения и развития апоптотических процессов в митохондриях при пятикратном внутривенном введении бис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me3) и (3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Me5) мышам линии С57В1/6 через 48 ч после перевивки опухолевого материала (подкожно) на моделях перевиваемых опухолей меланомы В16 в максимально эффективных дозах: 375 и 250 мг/кг соответственно.

На основании полученных результатов исследования можно сделать выводы, что изучаемые вещества бис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me3) и (3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Me5) вызывают изменение интенсивности окислительного повреждения в клетке и активности апоптотических процессов в митохондриях печени животных-опухоленосителей с меланомой В16. Полученные данные полностью коррелируют с изменением роста первичного очага и активностью метастазирования опухолевого процесса. Одной из основных клеточных мишеней воздействия гибридных оловоорганических соединений Me3 и Me5 является митохондрия.

Ключевые слова: оловоорганические соединения, митохондрии, митохондриальная дисфункция, противоопухолевые средства.

Для цитирования: Додохова М.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Милаева Е.Р., Шпаковский Д.Б., Трпель В.Г., Алхусейн-Кулягинова М.С., Котиева В.М. Вторичная митохондриальная дисфункция как механизм противоопухолевого и анти-метастатического действия гибридных оловоорганических соединений. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(11):28–33. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-11-05>

Появление митохондриальной фармакологии злокачественных новообразований как перспективного направления при разработке новых лекарственных препаратов обусловлено расширением представлений о роли митохондриальной дисфункции в патогенезе опухолевого процесса [1]. Митохондрии в типичной клетке являются источником макроэргических соединений, поддерживают окислительно-восстановительный и про/антиоксидантный баланс, осуществляют регуляцию апоптоза, универсального механизма гибели клетки [2]. Митохондриальная дисфункция выявлена при развитии злокачественных новообразований различного типа и локализации. Окислительный стресс в митохондриях активно способствует прогрессированию опухоли и увеличивает метастатический потенциал злокачественных клеток [3].

Оловоорганические соединения (ООС) проявили себя как высокоэффективные противоопухолевые и антиметастатические агенты на модельных системах *in vitro* и *in vivo* [4, 5]. Для преодоления избыточной токсичности, отмеченной многими авторами, при направленном синтезе гибридные молекулы ООС были модифицированы введением защитного фрагмента 2,6-ди-*трет*-бутилфенола. Исследуемые ООС обладают и про- и антиоксидантным потенциалом. Изучение влияния гибридных ООС на митохондриальный метаболизм на репрезентативной модели опухолевого роста позволит расширить представление о роли антиоксидантных и проапоптотических механизмов воздействия данного класса соединений в качестве противоопухолевых и антиметастатических агентов.

Меланома кожи – одно из самых агрессивных, непредсказуемых и наиболее трудно поддающихся лечению злокачественных новообразований. Известно, что меланома характеризуется высоким метастатическим потенциалом, причем одной из мишеней для метастазирования является печень [6].

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – оценка некоторых биохимических маркеров окислительного повреждения и апоптотических процессов в митохондриях печени и первичного опухолевого узла при пятикратном внутривенном введении бис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензилтиолат)

диметиллолова (Me₃) и (3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензилтиолат) трифениллолова (Me₅) мышам линии С57В1/6 через 48 ч после перевивки опухолевого материала (подкожно) на модели перерываемой опухоли меланомы В16 в максимально эффективной дозе 375 и 250 мг/кг соответственно.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Состав и структура исследованных органических соединений олова общей формулы Me₂Sn(SR)₂ (Me₃) и Ph₃SnSR (Me₅) приведены на рис. 1.

Исследование выполняли на 48 мышах линии С57В1/6 (самки) массой 21–22 г. Лабораторные животные получены из сертифицированного питомника НИЦ «Курчатовский институт» ПЛЖ «Рапполово». Исследования проводили в соответствии с «Директивой 2010/63/ ЕС Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях». По истечении 14 суток, необходимых для адаптации животных к новым условиям, все особи были стандартизированы по весу и рандомизированы с применением таблицы случайных чисел.

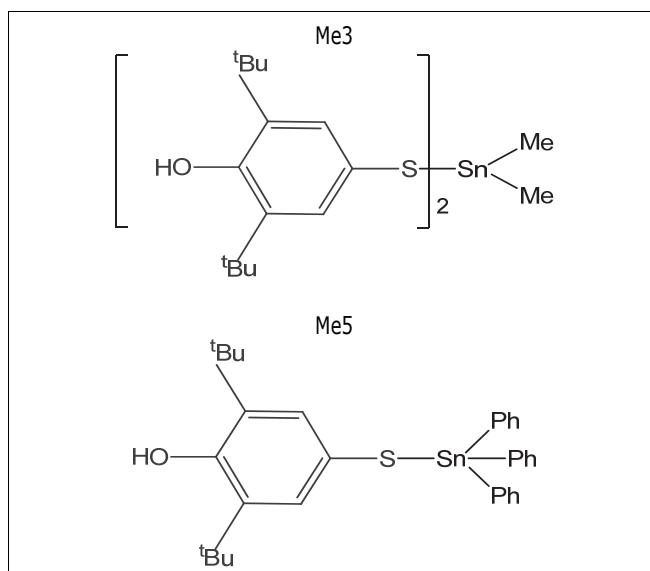


Рис. 1. Структурные формулы оловоорганических соединений, содержащих 2,6-ди-*трет*-бутилфенола. Обозначение радикалов: tBu – *трет*-бутил, Me – метил, Ph – фенил)

Для моделирования опухолевого процесса выбрали универсальную перевиваемую опухоль со спонтанным метастазированием – меланому В16. Культура клеток была получена из банка опухолевых материалов Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Поддержание клеток и перевивку выполняли по общепринятыми методикам, подкожно в правую подмышечную область [7]. В работе использовали четвертый пассаж клеток. Через 48 ч после перевивки опухолевого материала мышам-самкам линии С57В1/6 соединения Me3 и Me5 вводили 1 раз в сутки в течение пяти дней, внутрибрюшинно [8] в максимально эффективных суммарных дозах (375 и 250 мг/кг соответственно), определенных в предварительном исследовании. Животным контрольных групп вводили однопроцентный водный желатиновый раствор в аналогичных режимах и объемах. Число особей во всех группах было одинаковым ($n=12$). Растворы для введения готовили непосредственно перед введением животным.

Эвтаназию проводили декапитацией на гильотине на 18-е сутки после перевивки (Протокол локального независимого этического комитета ФГБОУ ВО «РостГМУ» Минздрава России №.10/20 от 28.05.2020).

Под митохондриальной дисфункцией принято понимать типовой патологический процесс, который не имеет этиологической или нозологической специфики и характеризуется, в первую очередь, изменением энергообразующей и апоптоз-запускающей функции митохондрий. Митохондрии выделяли из тканей печени и первичного опухолевого узла по методу Егоровой, Афанасьева (2011) [9]. Для оценки изменения апоптотических и прооксидантных биохимических маркеров в митохондриях анализировали следующие показатели: цитохром С (нг/г белка) («Bioscience», Австрия), каспазу-9 (нг/г белка) («Bioscience», Австрия), 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG) (нг/г белка) («Enzo Life Sciences», Швейцария), малоновый диальдегид (МДА) (нМ/г белка) («BlueGene Biotech», Китай); биохимическим методом – количество белка (мг/мл) – биуретовый метод («Ольвекс Диагностикум», Россия) на автоматическом анализаторе «ChemWell» («Awareness Technology INC», США).

Результаты исследования выражали в виде средней величины \pm ошибка средней. Совокупность показателей в группе проверяли на нормальность распределения посредством теста Андерсона–Дарлингга. Различия между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента и считали статистически значимыми при $p<0,05$. Для анализа применяли пакет программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении исследования из широкого диапазона доз для Me3 и Me5 были выбраны максимально эффективные суммарные дозы: 375 и 250 мг/кг соответственно. В качестве критериев оценки эффективности противоопухолевой и антиметастатической терапии использовали следующие показатели: процент торможения роста опухоли по массе и индекс ингибирования метастазирования [10]. Оба соединения при пятикратном внутрибрюшинном применении значительно снижали интенсивность и степень метастазирования. Рост первичного очага опухоли снижался в меньшей степени. Процент торможения роста опухоли по массе во всех опытных группах составлял 27% (Me3) и 23% (Me5). Индекс ингибирования метастазирования был равен от 54% (Me3) до 36% (Me5). Полученные данные указывают на большую избирательность воздействия Me3 на меланомную прогрессию.

Группы животных были сформированы следующим образом: группа 1 – меланома В16, Me3; группа 2 – меланома В16, Me5; группа 3 – контрольная, меланома В16 без лечения; группа 4 – контрольная (интактные животные).

Результаты изменения некоторых биохимических маркеров окислительного стресса и апоптотических процессов в митохондриях отображены в табл. 1.

При конструировании гибридных ООС Me3 и Me5 в процессе направленного синтеза удалось соединить в одной молекуле два компонента: прооксидантный, содержащий олово (IV), и антиоксидантный, содержащий фрагмент 2,6-ди-*трет*-бутилфенола. Сложный радикал обладает способностью захватывать свободные электроны и препятствовать образованию свободных радикалов и таким образом проявляет свои антиоксидантные свойства [11].

Таблица 1. Количество биохимических маркеров митохондриальной дисфункции ($M \pm m, p$)

Модель опухолевого процесса и суммарная доза вводимого соединения	Малоновый диальдегид, нМ/г белка	8-Гидрокси-2'-дезоксигуанозин, нг/г белка	Цитохром С, нг/г белка	Каспаза-9, нг/г белка
<i>Печень</i>				
Меланома В16, Ме3 в суммарной дозе 375 мг/кг	7,21±0,35 <i>p</i> <0,05*	7,22±0,5	5,37±0,5	0,42±0,05
Меланома В16, Ме5 в суммарной дозе 250 мг/кг	13,22±0,5 <i>p</i> <0,05*	9,36±0,5 <i>p</i> <0,05	8,21±0,6 <i>p</i> <0,05*	0,50±0,08 <i>p</i> <0,05*
Меланома В16 без лечения	12,92±0,6 <i>p</i> <0,05*	10,11±0,7 <i>p</i> <0,05*	7,34±0,4 <i>p</i> <0,05*	0,21±0,04 <i>p</i> <0,05*
Интактные животные	8,7±0,3	6,45±0,5	4,45±0,37	0,38±0,09
<i>Первичный опухолевый очаг</i>				
Меланома В16, Ме3 в суммарной дозе 375 мг/кг	14,36±0,5 <i>p</i> <0,05**	6,22±0,6 <i>p</i> <0,05**	5,22±0,44 <i>p</i> <0,05**	0,32±0,08 <i>p</i> <0,05**
Меланома В16, Ме5 в суммарной дозе 250 мг/кг	19,2±1,14 <i>p</i> <0,05**	8,73±0,64 <i>p</i> <0,05**	6,14±0,5 <i>p</i> <0,05**	0,27±0,07 <i>p</i> <0,05**
Меланома В16 без лечения	9,0±0,5	4,26±0,35	3,18±0,33	0,17±0,04

Примечание: различие статистически значимо с вероятностью 95%: * – по отношению к значениям у интактных животных; ** – по отношению к значениям у животных-опухоленосителей без лечения.

Прооксидантное действие ООС инициирует в митохондриях повреждение липидов и ДНК. При запуске апоптотического пути гибели клетки повышается концентрация цитохрома С, прокаспаз-2, -3, -9, фактора, индуцирующего апоптоз (apoptosis inducing factor). Далее, аналогично цепи реакций во внешнем пути передачи сигнала, с участием цитохрома С формируется апоптосома, в которой происходит активация инициирующей каспазы-9. Активная (активированная) каспаза-9 взаимодействует с эффекторной прокаспазой-3, активирует ее, запуская каспазный каскад для реализации дальнейших реакций эффекторной фазы апоптоза.

Анализ биохимических маркеров окислительного стресса в митохондриях печени животных-опухоленосителей без лечения выявил статистически значимое, по сравнению с таковыми у интактных особей, увеличение всех изучаемых показателей в случае развития опухолевого процесса. Данные результаты свидетельствуют о вовлечении печени в метастатический процесс меланомы В16 при отсутствии вторичных макроскопических очагов. Необходимо отметить выраженное снижение (44,8%) активности каспазы-9, зафиксированное на 18-е сутки после перевивки опухолевого материала. При окислительном повреждении липидов, нуклеиновых кислот и нарушении проницаемости мембран митохондрий, не происходит в полной мере активации инициирующей фазы

апоптоза. Это создает благоприятные условия для дальнейшей диссеминации опухолевого процесса. Ме3, содержащий два фрагмента 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, ожидаемо проявил себя как более активный антиоксидант, чем Ме5. Снижая активность окислительных процессов, Ме3 создает условия для снижения пролиферации метастатических клеток меланомы В16 в печени. Ме5 является промотором окислительных повреждений с активацией каспазы-9, что тоже препятствует активному метастазированию [12].

Более выраженная активация окислительных процессов в первичном опухолевом узле при введении Ме3 и Ме5, предположительно, связаны с избирательным транспортом ООС через биологические мембраны в опухолевой клетке. Одним из функциональных различий между нормальными и опухолевыми тканями является то, что в опухолях межклеточное пространство представляет собой более кислую среду по сравнению с внутриклеточной средой. Низкое значение рН во внеклеточном пространстве стимулирует инвазию и метастазирование [13]. В более кислой среде и Ме3 и Ме5 обладают большей липофильностью, что объясняет избирательную проницаемость и, опосредованно, достаточно выраженный противоопухолевый и антиметастатический эффект и невысокую токсичность данных соединений. Увеличение проницаемости мембраны опухолевой клетки для

гибридных ООС будет способствовать поступлению в клетки противоопухолевых средств на основе органических соединений олова (IV).

ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов исследования можно заключить, что изучаемые соединения бис(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметиллолова (Me3) и (3,5-дитрет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифениллолова (Me5) вызывают изменение интенсивности окислительного повреждения в клетке и активности апоптотических процессов в митохондриях печени животных-опухоленосителей с меланомой В16. Полученные данные полностью коррелируют с изменением роста первичного очага и активностью метастазирования опухолевого процесса. Одной из основных мишеней воздействия гибридных оловоорганических соединений Me3 и Me5 является митохондрия.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (20-03-00471) и РНФ (грант 19-13-00084).

ЛИТЕРАТУРА

1. Gasparre G., Rossignol R., Sonveaux P. Mitochondria in Cancer. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2017; 1858(8): 553–732. doi:10.1016/j.bbabi.2017.05.004.
2. Luo Y., Ma J., Lu W. The Significance of Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21(16): 5598. doi:10.3390/ijms21165598.
3. Emily I. Chen. Mitochondrial dysfunction and cancer metastasis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 2012; 44: 619–622. doi: 10.1007 / s10863-012-9465-9.
4. Милаева Е.Р., Додохова М.А., Шпаковский Д.Б., Антоненко Т.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Комарова Е.Ф., Ганцгорн Е.В., Алхусейн–Кулягинова М.С. Механизмы цитотоксического действия оловоорганических соединений. *Биомедицина.* 2021; 17(2): 88–99.
5. Додохова М.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Сухорукова Н.В., Ганцгорн Е.В., Алхусейн–Кулягинова М.С., Комарова Е.Ф., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р. Оценка фармакотерапевтического потенциала оловоорганических соединений *in vivo*. *Биофармацевтический журнал.* 2021. 13(3): 11–15.
6. Бандовкина В.А., Нескубина И.В., Франциянц Е.М., Ткаля Л.Д., Пржедецкий Ю.В. Влияние роста перевивной меланомы v16/f10 на функционирование системы перекисного окисления липидов в печени самок мышей C57BL/6. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки.* 2017; 3–2 (195-2): 4–10.
7. Котиева И.М., Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Третьяки Л.К., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Бликян М.В. Влияние хронической боли на уровень половых гормонов, пролактина и гонадотропных гормонов в сыворотке крови и патологически измененной коже у самок мышей в динамике роста злокачественной меланомы. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки.* 2018; № 2(198): 106–116.
8. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). М.: Медицина; 1980.
9. Егорова М.В., Афанасьев С.А. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические приемы. *Сибирский медицинский журнал.* 2011; 26(1): 22–28.
10. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005; 832 с.
11. Дергачева Д.И., Кляйн О.И., Мариничев А.А., Гесслер Н.Н., Теплова В.В., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И. Антиоксидантное действие природных полифенолов на митохондрии печени крыс с токсическим гепатитом. *Биологические мембраны.* 2020; 37(3): 197–207.
12. Вострикова С.М., Гринев А.Б., Гогвадзе В.Г. Активные формы кислорода и антиоксиданты в канцерогенезе и терапии опухолей. *Биохимия.* 2020; 85(10): 1474–1488.
13. Кобляков В.А. Механизмы протонирования межклеточного пространства в опухолях. *Успехи молекулярной онкологии.* 2015; 2(3): 21–29.

Поступила после доработки 1 октября 2021 г.

MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AS A MECHANISM OF ANTITUMOR AND ANTIMETASTATIC ACTION OF HYBRID ORGANOTIN COMPOUNDS

© Authors, 2021

M.A. Dodokhova

Ph.D. (Med.), Associate Professor, Department of Biomedicine and Neuroscience, and General and Clinical Biochemistry № 2, Rostov State Medical University (Rostov-on-Don, Russia)
E-mail: dodokhova@mail.ru

A.V. Safronenko

Dr.Sc. (Med.), Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Rostov State Medical University (Rostov-on-Don, Russia)
E-mail: andrejsaf@mail.ru