

Амозова Вера Игоревна, Терехова А.А.

Научный руководитель: к.б.н., в.н.с. Балакина А.А.

Редокс-регулируемые механизмы цитотоксического действия нитрозильных комплексов железа – активаторов транскрипционного фактора Nrf2

Отдел кинетики химических и биологических процессов

Транскрипционный фактор Nrf2 играет ключевую роль в регуляции работы антиоксидантной системы всех клеток организма, основная функция которой – поддержание окислительно-восстановительного баланса. В физиологических условиях Nrf2 находится в цитозоле и постоянно ингибирован белком Keap-1. В условиях окислительного стресса комплекс Nrf2/Keap1 распадается. Nrf2 перемещается в ядро и усиливает экспрессию генов, кодирующих белки, реализующие детоксикацию молекул окислителей, таких, например, как активные формы кислорода (АФК). В конечном счете, комплекс этих процессов способствует выживанию клетки и препятствует развитию злокачественных новообразований, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний.

Действие транскрипционного фактора Nrf2 в клетках опухолей также направлено на инактивацию АФК. Различие заключается в измененном метаболизме опухолевых клеток, генерация АФК в которых изначально выше, чем в здоровых, что приводит к сверхэкспрессии Nrf2 и их усиленной пролиферации. На сегодняшний день существует две основных точки зрения относительно активности Nrf2 в клетках опухолей. Одни исследования говорят об отрицательных эффектах, появлении агрессивных фенотипов и резистентности к химиотерапевтическим препаратам, действие которых основано на провокации окислительного стресса. Другие, наоборот, показывают, что активация Nrf2 в некоторых типах опухолевых клеток, способствует их гибели.

Таким образом, Nrf2 является перспективной мишенью для изучения метаболических процессов нормальных и опухолевых клеток, что будет способствовать улучшению качества разрабатываемых лекарственных препаратов.

Проведено исследование ряда различных по строению нитрозильных комплексов железа (НКЖ), как соединений, обладающих потенциальной способностью активировать Nrf2, из которых наибольший интерес представляли водорастворимые комплексы $\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)(\text{NHC}_2\text{H}_5))_2(\text{NO})_2\text{Cl}^*[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)(\text{NHC}_2\text{H}_5))\text{Cl}(\text{NO}_2)]$ (1); $[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_2(\text{NO})_2][\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]$ (2); $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3). Изученные НКЖ являются синтетическими аналогами нитрозильных [1Fe-2S] кластеров, а также проявляют NO-донорные свойства.

Целью работы стало изучение влияния НКЖ на редокс-регулируемые процессы в опухолевых клетках.

В ходе исследования было показано, что механизмы действия комплексов различны. Установлено, что все комплексы в значительной степени увеличивают количество свободных радикалов. Действие комплекса 1, вызывавшего накопление NO и АФК в меньшей степени и с более низкой скоростью, по сравнению с другими изучаемыми соединениями, приводило к гибели опухолевых клеток путем апоптоза. Комплексы 2 и 3, действие которых отличалось более высокой скоростью и уровнем накопления в клетках свободных радикалов, вызывало преимущественно некротическую гибель клеток. Также было установлено, что ферроптоз, как железозависимый путь клеточной гибели, не реализовывался при действии исследованных НКЖ.

Изучение влияния НКЖ непосредственно на активацию антиоксидантной системы показало, что комплекс 1 имеет ярко выраженный Nrf2-зависимый характер действия. В опухолевых клетках 1 вызывает увеличение количества транскрипционного фактора Nrf2 как в ядрах, так и в цитозоле, что сопровождается увеличением экспрессии

антиоксидантных белков как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. В ответе антиоксидантной системы при действии комплекса главную роль играет гемоксигеназа-1. Также **1** приводит к подавлению экспрессии гена *KEAP1* и стабилизации Nrf2 путем фосфорилирования его по Ser40, при этом фосфорилированная форма белка имеет преимущественно ядерную локализацию. Активация Nrf2 сопровождается подавлением NF-κB-зависимых провоспалительных генов и белков.

Действие комплекса **2**, также приводящее к увеличению экспрессии транскрипционного фактора Nrf2 и ряда его генов-мишеней, вызывало активацию провоспалительного транскрипционного фактора NF-κB. Комплекс **3**, несмотря на существенное повышение внутриклеточного содержания свободных радикалов, не активировал редокс-зависимые механизмы, связанные с транскрипционными факторами Nrf2 и NF-κB.

Таким образом, из ряда исследованных нитрозильных комплексов железа был выявлен комплекс **1** с N-этилтиомочевинной, проявивший свойства активатора транскрипционного фактора Nrf2, вызывающего апоптотическую гибель опухолевых клеток. В ходе исследования было выяснено, что цитотоксическое действие **1** не связано с его NO-донорными свойствами. Основной ответ опухолевых клеток на действие комплекса сопровождается реализацией Keap1-независимой регуляцией активности Nrf2. При этом индукция связанных с Nrf2 защитных механизмов ослабляет нежелательные в терапии опухолей провоспалительные реакции, опосредованные NF-κB.

Впервые показано, что нитрозильные комплексы железа, обладающие противоопухолевым потенциалом, могут являться активаторами транскрипционного фактора Nrf2. Предполагается, что возможность влиять на редокс-регулируемые процессы зависит не столько от NO-донорной активности НКЖ, сколько от особенностей их структуры и последующей биотрансформации в клетках. Полученные данные позволяют рассматривать НКЖ как возможные активаторы Nrf2-зависимых клеточных процессов, что может повысить перспективность их исследования в качестве потенциальных лекарственных средств.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание № 124020500019-2).

Публикации:

1. Амозова В.И., Балакина А.А., Мищенко Д.В., Санина Н.А. Влияние динитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной на уровни внутриклеточных АФК и NO, а также активность каспаз в опухолевых клетках HeLa // Известия академии наук. Серия химическая. 2023. №4. С. 1066-1074.

2. Балакина А.А., Амозова В.И., Санина Н.А. Активация транскрипционного фактора Nrf2 в клетках Hela при действии нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023. Т. 176, № 11. – С. 573-578. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-176-11-573-578.

3. Балакина А.А., Амозова В.И., Ступина Т.С., Санина Н.А. Редокс-регулируемые механизмы клеточного ответа на действие нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной в мезенхимальных стволовых клетках человека *in vitro* // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2024. №4. С. 218-227. DOI: 10.47056/1814-3490-2024-4-218-227.

Доклады на конференциях:

1. Амозова В.И., Ступина Т.С., Терентьев А.А., Санина Н.А., Балакина А.А. Влияние нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной на активацию Nrf2-зависимых процессов в опухолевых клетках // Международная научная конференция

«Современная химическая физика – на стыке физики, химии, и биологии», 29.11-3.12.21, Черногоровка, Россия.

2. Амозова В.И., Ступина Т.С., Санина Н.А., Балакина А.А. «Влияние нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной на активацию Nrf2-зависимых процессов в клетках глиобластомы» // XXVIII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022», 24-26 марта 2022 года, Санкт-Петербург, Россия.

3. Амозова В.И., Ступина Т.С., Санина Н. А., Балакина А.А. «Влияние нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной на активацию Nrf2-зависимых процессов в опухолевых клетках» // IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции», 20-22 апреля 2022 года, Москва, Россия.

4. Амозова В. И., Санина Н. А., Балакина А. А. Активация транскрипционного фактора Nrf2 в клетках глиобластомы при действии нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной // VII Всероссийская конференция по молекулярной онкологии», 21-23 декабря 2022, Москва, Россия.

5. Амозова В.И., Санина Н.А., Балакина А.А. Влияние нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной на активацию ключевых белков антиоксидантной системы в клетках глиобластомы // XVII Всероссийская научно-практическая конференция им. А.Ю. Барышникова с международным участием «Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы», 20-21 апреля 2023г., Москва, Россия.

6. Амозова В.И., Санина Н.А., Балакина А.А. Активация транскрипционного фактора Nrf2 в клетках глиобластомы при действии нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной // Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», 24-27 апреля 2023. Санкт-Петербург, Россия.

7. Терехова А.А., Амозова В.И., Ступина Т.С., Санина Н.А., Балакина А.А. Действие нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной вызывает активацию Nrf2/НО1-пути антиоксидантного ответа и гибель клеток глиобластомы // IX Всероссийская конференция по молекулярной онкологии, 18–20 декабря 2024 г., Москва, Россия.