

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-164

**СНИЖЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МОЛЕКУЛ NO⁺
В СИСТЕМЕ ПОНИЖАЕТ ЦИТО- И ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ NA-НИТРОПРУССИДА
ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ДИТИОНИТОМ NA
НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MCF-7**

**A DECREASE IN THE NUMBER OF NO⁺ MOLECULES
IN THE SYSTEM REDUCES THE CYTO- AND GENOTOXICITY
OF NA-NITROPRUSSIDE DURING THE REDUCTION
OF NA DITHIONITE ON MCF-7 CELL CULTURE**

Н. Е. Трифонова¹, Е. И. Некрасова²,
В. А. Тронов¹, А. Ф. Ванин¹

¹Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва

²Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

N. E. Trifonova¹, E. I. Nekrasova²,
V. A. Tronov¹, A. F. Vanin¹

¹N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics RAS, Moscow

²N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow

✉ natalia.trifonova@chph.ras.ru

Аннотация

Одним из доноров NO является нитропруссид натрия (SNP). SNP также проявляет цитотоксическое и генотоксическое действие. Цитотоксичность его во многом связана с продукцией катиона нитрозония (NO⁺), который высвобождаются при его метаболизме. Генотоксичность SNP проявлялась как способность SNP индуцировать мутации в генах. В работе исследуется влияние SNP на ДНК клеток MCF-7 и оценивается вклад иона нитрозония в цито- и генотоксичность.

Abstract

One of the NO donors is sodium nitroprusside (SNP). SNP also exhibits cytotoxic and genotoxic effects. Its cytotoxicity is largely related to the production of nitrosonium cation (NO⁺), which is released during its metabolism. The genotoxicity of SNP was manifested as the ability of SNP to induce mutations in genes. The paper investigates the effect of SNP on the DNA of MCF-7 cells and evaluates the contribution of nitrosonium ion to cyto- and genotoxicity.

Цели и задачи: провести исследование цито- и генотоксичности SNP и оценить вклад NO⁺ на клетках MCF-7.

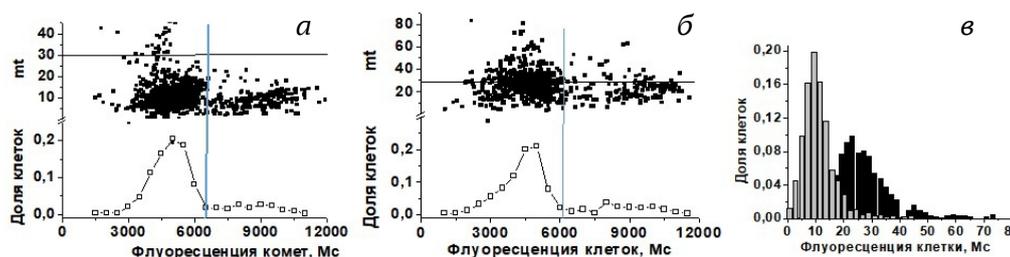
Материалы и методы

Реактивы: синтетический донор NO, нитрозильный комплекс железа с меркаптосукцинатом (ДНКЖ-МС), синтезирован в нашей лаборатории и хранился в виде концентрированного раствора при -20 °С. Кристаллы SNP и SDT (Sigma-Aldrich, США) хранились при -20 °С и растворялись непосредственно перед использованием в инкубационной среде. Оценку цитотоксичности проводили путем измерения снижения метаболической активности клеток с помощью МТТ-теста, основанного на определении активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ [1]. Целостность клеточной мембраны оценивали с использованием стандартной методики двойного окрашивания флуоресцентными красителями [2].

Генотоксичность и цитотоксичность взаимосвязаны через способность повреждения ДНК индуцировать гибель клетки, в процессе которой происходит ферментативная дегградация клеточной ДНК. Для регистрации этого и обратного процесса репарации ДНК, мы использовали метод ДНК-комет, параллельно отслеживая морфологические изменения в клетках и образование ДНК-комет, поскольку погибшие и погибающие клетки формируют определенный тип ДНК-комет, известный как кометы-ежики [3]. Применялся нейтральный вариант метода комет [4]. Клетки, фиксированные на предметных стеклах, подвергали лизису при нейтральном рН и электрофорезу, после чего полученные изображения ДНК-комет и их распределение по параметру поврежденности ДНК анализировали в отдельных клетках [5].

Результаты и их обсуждение

Горизонтальная линия на графиках (см. рисунок) отражает уровень повреждения ДНК в клетках $mt = 30$. В интактной популяции 83 % клеток находятся в фазе G0/G1 клеточного цикла [6] (слева от вертикальной линии), 17 % представлены клетками в S+G2/M-фазах цикла (справа от вертикальной линии); в популяции обработанной SNP это 80 и 20 %.



Двумерные распределения в плоскости координат — флуоресценция комет (ось X) и повреждение ДНК (ось Y) экспериментальных точек, полученных для интактных клеток, $N = 1070$ (а) и после 90 мин инкубации с SNP 100 мкМ, $N = 992$ (б); под ними рассчитанные из этих распределений частотные распределения клеток по интенсивности их флуоресценции (содержанию ДНК в них, Мс); в — частотные гистограммы распределения по поврежденности ДНК (mt) в интактных клетках (серые, $mt = 12$) и в инкубированных с SNP (черные, $mt = 27$); по средним показателям распределения достоверно различаются $p < 0,05$, СКС

В результате инкубации с SNP 100 мкМ в течение 90 минут, доля клеток, получивших двунитевые разрывы (ДР) ДНК, достигает 25-30%. Это может быть вызвано апоптозом, инициируемым нитропруссидом через митохондрии и генотоксичностью самого SNP как донора NO^+ , более цитотоксичного по сравнению с NO [7, 8]. Для определения вклада NO^+ в образование ДР в ДНК использовался эффект структурной перестройки SNP под действием дитионита натрия (SDT), преобразующего SNP из донора NO^+ в донора только NO. В их взаимодействия образуется ДНКЖ с тиосульфатом, с меньшим количеством NO^+ , что приводит к снижению генотоксичности SNP.

Заключение

Морфологические изменения в клетках под действием SNP представляют характерную деградацию ядерной ДНК. Генотоксичность SNP не зависит от стадии клеточного цикла, поскольку доли поврежденных клеток в разных стадиях приблизительно одинаковы: $29 \pm 7\%$ и $27 \pm 6\%$. В результате 90 мин инкубации с SNP 100 мкМ доля клеток, получивших сильные повреждения в виде ДР ДНК, составляет 25-30 %, что близко доле нежизнеспособных клеток по результатам МТТ-теста на 24 и 48 ч инкубации ($22 \pm 4\%$). Это позволяет связать раннее накопление ДР ДНК и цитотоксический эффект SNP на клетках MCF-7.

Восстановление SNP сопровождается его распадом и образованием М-ДНКЖ с тиосульфатом. Такие комплексы могут выступать донорами NO и NO^+ , что определяет частичное сохранение цитотоксичности. Добавление SDT к SNP достоверно снижало мембранную цитотоксичность. МТТ-тест показал, что цитотоксичность микса SNP и SDT ниже суммы цитотоксичностей компонентов смеси, измеренных по отдельности, что говорит о снижении цитотоксичности от взаимодействия компонентов смеси. Снижение количества молекул NO^+ в системе достоверно снижало генотоксичность SNP, что подтвердилось методом ДНК-комет по выходу ДР ДНК в клетках MCF-7. Невозможно полностью снять цитотоксическое действие NO^+ , входящего в состав SNP, путем его одноэлектронного восстановления до NO из-за способности живых организмов образовывать при участии ионов Fe^{2+} и молекул NO — ДНКЖ, всегда присутствующие в организмах.

Литература

1. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity // Journal of Immunological Methods. 1983. Vol. 16 (1-2). P. 55-63.
2. Atale N. et al. Cell-death assessment by fluorescent and non-fluorescent cytosolic and nuclear staining techniques // Journal of Microscopy. 2014. P. 1-13.
3. Chandna S. Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death // Cytometry Part A. 2004. Vol. 61A. P. 127-133.
4. Тронов В.А., Некрасова Е.И. Повреждение ДНК и белка p53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевины // Биофизика. 2020. Т. 65, № 3. С. 543-551.

-
5. Tronov V.A., et al. Geno- and cytotoxic action of dinitrosyl iron complex with mercaptosuccinate on MCF-7 cells // *Cell and Tissue Biology*. 2023. Vol. 17, № 1. P. 48–55.
 6. Nunez R., Garay N., Villafane C., Bruno A., Lindgren V. Description of a flow cytometry approach based on SYBR-14 staining for the assessment of DNA content, cell cycle analysis, and sorting of living normal and neoplastic cells // *Experimental and Molecular Pathology*. 2004. Vol. 76, № 1. P. 29–36.
 7. Vanin A.F., et al. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione: electron paramagnetic resonance and optical studies // *NitricOxide – Biol.Chem.* 2011. Vol. 23. P. 136.
 8. Ванин А.Ф., Ткачев Н. А. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами как источники универсальных цитотоксинов — катионов нитрозония // *Биофизика*. 2023. Т. 68. С. 329–340.