

БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ БИОЛОГИЯ BIOLOGY AND MEDICAL BIOLOGY

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСОВ Cu(II) С ПРОИЗВОДНЫМИ ЕНАМИНА И ТЕТРАЗОЛА НА CYP2C И CYP3A И ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА В СФЕРОИДАХ HepG2

Клюшова Л.С.¹,
Голубева Ю.А.²,
Вавилин В.А.¹,
Гришанова А.Ю.¹

¹ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12, Россия)

² ФГБНУ Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН (630090, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 3, Россия)

Автор, ответственный за переписку:

Клюшова Любовь Сергеевна,
e-mail: klyushovals@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Цитохромы CYP2C и CYP3A индуцируются множеством соединений и влияют на фармакокинетику и фармакодинамику большого количества лекарственных средств. В настоящее время активно исследуется возможность применения координационных соединений меди в противоопухолевой терапии. Оценка потенциальных взаимодействий между новыми молекулами и цитохромами P450 необходима на ранней стадии разработки лекарств. **Цель исследования.** Изучить модулирующее действие комплексов Cu(II) с производными енамина и тетразола на CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4 и их цитотоксические и антипролиферативные свойства на нормальных фибробластах лёгких человека MRC-5 и 3D-культуре гепатоцеллюлярной карциномы HepG2.

Материалы и методы. Цитотоксическую и антипролиферативную активность комплексов меди(II) – $[CuL_2]$ (**1**), $[Cu_2(bipy)_2(ФТ)_4]$ (**2**), $[Cu_2(phen)_2(ФТ)_4]$ (**3**) и $\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot nH_2O\}$ (**4**) (где L – анион 2-анилинометилиден-5,5-диметилциклогексан-1,3-диола; ФТ – 5-фенилтетразолат-анион; MT – 5-метилтетразолат-анион; bipy – 2,2'-бипиридин; phen – 1,10-фенантролин) – исследовали на 2D- и 3D-культурах с помощью фенотипического скрининга на основе флуоресценции. Модулирующее действие на CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4 изучали с помощью целевого скрининга на основе флуоресценции. Результаты экспрессии CYP3A4 подтверждали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией в реальном времени.

Результаты. Комплекс (**1**) повышает экспрессию CYP3A4 и не влияет на экспрессию CYP2C9 и CYP2C19. Комплекс (**2**) не оказывает модулирующего действия на CYP2C, CYP3A. Комплексы с 1,10-фенантролином (**3**) и (**4**) индуцируют CYP3A4, ингибируют CYP2C9 и не влияют на экспрессию CYP2C19. Все соединения проявляют дозозависимый цитотоксический эффект на HepG2 и MRC-5: соединение с 5-метилтетразолат-анионом (**4**) одинаково воздействует на клеточные линии, соединения с 5-фенилтетразолат-анионом (**2**) и (**3**) – селективно. Комплексы с 1,10-фенантролином эффективны как на 2D-, так и на 3D-модели.

Заключение. Комплекс $[Cu_2(phen)_2(ФТ)_4]$ (**3**) можно использовать как основу для создания противоопухолевого соединения, но необходима дальнейшая модификация структуры для повышения селективности к опухолевым клеткам.

Ключевые слова: координационные соединения меди(II), MRC-5, HepG2, 3D-модель, цитотоксичность, антипролиферативная активность, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4

Для цитирования: Клюшова Л.С., Голубева Ю.А., Вавилин В.А., Гришанова А.Ю. Модулирующее действие комплексов Cu(II) с производными енамина и тетразола на CYP2C и CYP3A и их цитотоксические и антипролиферативные свойства в сфероидах HepG2. Acta biomedica scientifica. 2022; 7(5-2): 31-41. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-2.4

Статья поступила: 23.06.2022

Статья принята: 22.09.2022

Статья опубликована: 08.12.2022

MODULATING EFFECT OF Cu(II) COMPLEXES WITH ENAMINE AND TETRAZOLE DERIVATIVES ON CYP2C AND CYP3A AND THEIR CYTOTOXIC AND ANTIPROLIFERATIVE PROPERTIES IN HepG2 SPHEROIDS

Klyushova L.S.¹,
Golubeva Yu.A.^{1,2},
Vavilin V.A.¹,
Grishanova A.Yu.¹

¹ Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (Timakova str. 2/12, Novosibirsk 630060, Russian Federation)

² Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Lavrentieva ave. 3, Novosibirsk 630090, Russian Federation)

Corresponding author:

Lubov S. Klyushova,
e-mail: klyushoval@mail.ru

ABSTRACT

CYP2C and CYP3A cytochromes are induced by a variety of compounds and affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of a large number of drugs. Currently, the possibility of using copper coordination compounds in antitumor therapy is being actively studied. Evaluation of potential interactions between new molecules and P450 cytochromes is necessary at an early stage of drug design.

The aim. To study the modulating effect of Cu(II) complexes with enamine and tetrazole derivatives on CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 and their cytotoxic and antiproliferative properties on normal human lung fibroblasts MRC-5 and a 3D model of hepatocellular carcinoma HepG2.

Materials and methods. Cytotoxic and antiproliferative activities of copper(II) complexes – $[CuL_2]$ (**1**), $[Cu_2(bipy)_2(PT)_4]$ (**2**), $[Cu_2(phen)_2(PT)_4]$ (**3**), $\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O\}_n$ (**4**) (L – anion of 2-anilinomethylidene-5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione; PT – 5-phenyltetrazolate anion; MT – 5-methyltetrazolate anion; bipy – 2,2'-bipyridine; phen – 1,10-phenanthroline) – were examined in 2D and 3D models using fluorescence-based phenotypic screening. The modulating effect on CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 was studied using fluorescence-based targeted screening. The results of CYP3A4 expression were confirmed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results. Complex (**1**) increases the CYP3A4 expression and does not affect CYP2C9 and CYP2C19 expression. Complex (**2**) has no modulating effect on CYP2C and CYP3A. Complexes with 1,10-phenanthroline (**3**) and (**4**) induce CYP3A4, inhibit CYP2C9 and do not affect CYP2C19 expression. All compounds have a dose-dependent cytotoxic effect on HepG2 and MRC-5: the compound with 5-methyltetrazolate anion (**4**) has the same effect on cell lines, compounds with 5-phenyltetrazolate anion (**2**) and (**3**) have selective effect. Complexes with 1,10-phenanthroline are effective on both 2D and 3D models.

Conclusion. The $[Cu_2(phen)_2(FT)_4]$ complex (**3**) can be used as a basis for creating an antitumor compound, but further modification of the structure is required to increase the selectivity to tumor cells.

Key words: copper(II) coordination compounds, MRC-5, HepG2, 3D model, cytotoxicity, antiproliferative activity, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4

Received: 23.06.2022

Accepted: 22.09.2022

Published: 08.12.2022

For citation: Klyushova L.S., Golubeva Yu.A., Vavilin V.A., Grishanova A.Yu. Modulating effect of Cu(II) complexes with enamine and tetrazole derivatives on CYP2C and CYP3A and their cytotoxic and antiproliferative properties in HepG2 spheroids. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-2): 31-41. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-2.4

ВВЕДЕНИЕ

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) – наиболее распространённая первичная злокачественная опухоль печени с плохой выживаемостью среди пациентов [1]. ГЦК относится к числу опухолевых заболеваний, для которых имеющийся арсенал химиотерапевтических препаратов имеет низкую эффективность. Терапия на основе доксорубина, гемцитабина, фторпиримидинов и препаратов платины иногда позволяет получить положительные эффекты, но в целом не увеличивает общую выживаемость пациентов с ГЦК [2]. Наиболее известными комплексами металлов, используемыми в противоопухолевой терапии, являются цисплатин и его производные [3]. В настоящее время рассматривается возможность применения координационных соединений на основе других металлов, таких как рутений, золото, медь и железо, для уменьшения общей токсичности и усиления противоопухолевого действия [4].

Медь играет огромную роль в различных клеточных процессах, включая энергетический метаболизм, рост и развитие клетки [5]. Ионы меди могут стимулировать клеточную пролиферацию и активировать некоторые проангиогенные факторы: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α , tumor necrosis factor α), интерлейкин 1 (IL-1, interleukin 1) и другие [6]. Опухолевым клеткам обычно требуется больше меди для их роста и метаболизма, чем нормальным покоящимся клеткам [7]. Повышенное содержание меди было определено в сыворотке пациентов с различными видами злокачественных опухолей, в том числе с гепатоцеллюлярной карциномой [8]. Поэтому соединения, влияющие на гомеостаз меди, представляют интерес для противоопухолевой терапии.

Механизмы противоопухолевой активности соединений меди разнообразны. Хелатирующие агенты, истощающие эндогенные запасы меди в результате комплексообразования, являются многообещающим средством для поддержания концентрации меди на физиологическом уровне и подавления процессов канцерогенеза [9]. Кроме того, медные комплексы, образующиеся в результате взаимодействия хелатора и эндогенной меди, могут обладать цитотоксической и антипролиферативной активностью и действовать избирательно на опухолевые клетки с высоким содержанием меди, оказывая небольшую токсичность на нормальные клетки [10]. Ионофоры меди, напротив, вызывают внутриклеточное накопление меди, что приводит к клеточной гибели в результате продукции активных форм кислорода или вытеснения других металлов из металлосодержащих ферментов [11]. Некоторые медные комплексы являются ингибиторами протеасом [12] и индуцируют апоптоз преимущественно в трансформированных клетках за счёт подавления передачи сигналов транскрипционного фактора κ B (NF- κ B, nuclear factor κ B) [13].

Показано, что ГЦК влияет на активность цитохромов P450 (CYP). Низкая экспрессия генов CYP2C9 и CYP2C19 связана с неблагоприятным прогнозом развития гепатоцеллюлярной карциномы [14], а подавление CYP3A4 является предиктором её раннего рецидива [15]. Помимо фи-

зиологической и патофизиологической регуляции, активность цитохромов подсемейств CYP2C и CYP3A возрастает или снижается под воздействием многих лекарств [16], что влияет на фармакокинетику и фармакодинамику большого количества лекарственных средств. Поэтому потенциальные взаимодействия между новыми молекулами и цитохромами P450 регулярно оцениваются на ранней стадии разработки лекарственных препаратов [17].

Линии опухолевых клеток, такие как HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека), представляют особый интерес для исследований *in vitro* по развитию и терапии ГЦК. Эта клеточная модель позволяет изучать метаболические пути, участвующие в гепатоканцерогенезе, и тестировать кандидатов в противоопухолевые препараты [18]. Также клетки HepG2 являются полезной моделью для оценки модулирующих эффектов потенциальных лекарств на CYP при первичном скрининге. В последнее время особое внимание уделяется моделям *in vitro* с клетками, расположенными в трёхмерной (3D) структуре (сфероидах), которая демонстрирует улучшенную печёночную функциональность по сравнению с традиционными двумерными (2D) моделями и лучше имитирует ответы на лечение у людей [19]. Поэтому гепатоциты, растущие в сфероидах, стали предпочтительной моделью по сравнению с 2D-культурами.

В ранее проведённых исследованиях комплексы Cu(II) с производными енамина и тетразола проявили дозозависимый цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток [20, 21]. Однако влияние этих соединений на нормальные клетки, на опухолевые клетки в 3D-модели и на систему метаболизма лекарственных средств не изучалось.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить модулирующее действие комплексов Cu(II) с производными енамина и тетразола на CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4 и их цитотоксические и антипролиферативные (цитостатические) свойства на нормальных фибробластах человека MRC-5 и в сфероидах HepG2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые соединения. Исследовали комплексы меди(II) с производными енамина и тетразола: [CuL₂] (**1**), [Cu₂(bipy)₂(ФТ)₄] (**2**), [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄] (**3**), {[Cu(phen)(MT)₂]_n·H₂O}_n (**4**), где L – анион 2-анилинометилден-5,5-диметилциклогексан-1,3-диола; ФТ – 5-фенилтетразолат-анион; MT – 5-метилтетразолат-анион; bipy – 2,2'-бипиридин; phen – 1,10-фенантролин (рис. 1). Синтез и подробная характеристика полученных комплексов были опубликованы ранее [20, 22]. Карбоплатин (Pharmachemie B.V., Нидерланды), цисплатин (Sigma-Aldrich, Швейцария), дексаметазон (DEX, ElfaLaboratories, Индия) и рифампицин (RIF, Белмедпрепараты, Беларусь) использовались как препараты сравнения. Исходные растворы готовили в ДМСО (Биолот, Россия).

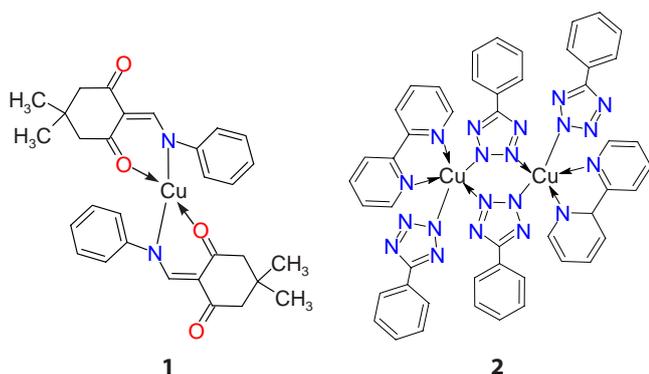


РИС. 1.

Структурные формулы исследуемых комплексов меди(II)

Клеточные культуры. Клеточные линии человека HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома) и MRC-5 (фибробласты лёгкого) были предоставлены коллегами из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (пос. Кольцово). Клетки HepG2 культивировали в среде IMDM, фибробласты MRC-5 – в среде DMEM с 10%-м содержанием в них эмбриональной бычьей сыворотки (Cytiva, США) в CO₂-инкубаторе при 37 °C.

Для получения 2D-модели клетки высевали на 96-луночные планшеты (Corning, 3599) по 5 × 10³ клеток на лунку или на 12-луночные планшеты (Corning, 3512) по 4 × 10⁴ клеток на лунку в соответствующей среде. В качестве 3D-модели использовали сфероиды. Для получения сфероидов клетки HepG2 высевали на 96-луночные низкоадгезивные U-образные планшеты (ThermoFisher, 174925) по 1,5 × 10³ клеток на лунку и культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C. Обработку клеток клиническими препаратами и исследуемыми комплексами проводили через 24 часа после посева.

Для исследования цитотоксической и антипролиферативной активности клетки инкубировали с исследуемыми комплексами (1) – (4) (0,5–25 или 1–50 мкМ) и клиническими препаратами цисплатином и карбоплатином (1–50 мкМ) в течение 48 часов. Для оценки модулирующих эффектов на цитохромы P450 клетки инкубировали с комплексами Cu(II) (1) – (4) (0,1–5 мкМ) и индукторами CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19 дексаметазоном (10, 100 мкМ) и рифампицином (25, 100 мкМ) в течение 48 часов с заменой среды и добавлением соединений каждые 24 часа. Конечная концентрация ДМСО в среде не превышала 1 %.

Фенотипический скрининг

Оценка цитотоксического и антипролиферативного эффектов. Жизнеспособность и пролиферацию клеток оценивали методом двойного окрашивания Hoechst/пропидий йодид (PI). Окрашивание 2D-модели смесью флуоресцентных красителей Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Швейцария) и PI (Invitrogen, США) проводили в течение 30 мин [18], сфероидов – в течение 3 часов [23] при 37 °C.

Цитотоксическую активность определяли как полумаксимальную летальную концентрацию (LC₅₀), рассчитанную после аппроксимации нелинейной функцией кривых экспериментальной зависимости живых клеток (%) от кон-

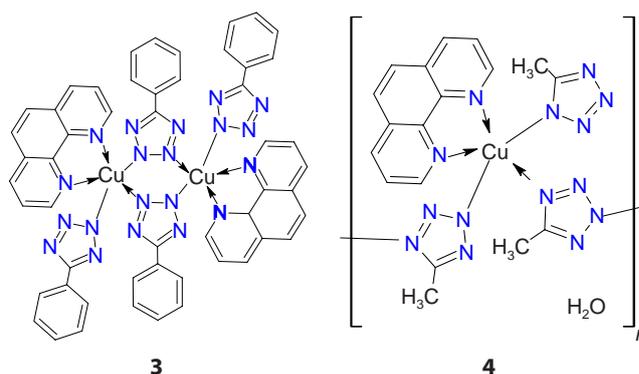


FIG. 1.

Structural formulas of the studied copper(II) complexes

центрации препарата (мкМ). Антипролиферативную (цитостатическую) активность определяли как полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC₅₀), рассчитанную после аппроксимации нелинейной функцией кривой экспериментальной зависимости количества клеток (%) от концентрации (мкМ). Параметр IC₅₀ для 3D-модели рассчитывали после аппроксимации нелинейной функцией кривой экспериментальной зависимости площади сфероида (%) от концентрации соединения (мкМ).

Целевой скрининг

Оценка уровней мРНК CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19.

Экспрессию генов цитохромов CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 на уровне мРНК определяли с помощью набора View RNA CellPlus Assay Kit (Invitrogen, 88-19000-99) в соответствии с инструкциями производителя; мРНК CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19 детектировали с использованием флуоресцентных зондов View RNA типа 1 (CYP3A4, VA1-10196-VCP), типа 4 (CYP2C9, VA4-3084099-VCP) и типа 6 (CYP2C19, VA6-3169546-VCP). Ядра клеток окрашивали DAPI.

Оценка уровня белка CYP3A4. Экспрессию CYP3A4 на уровне белка оценивали с помощью иммунофлуоресцентного анализа [24] с некоторыми изменениями. Клетки фиксировали 4%-м раствором параформальдегида в течение 10 мин, пермобилизацию 0,1%-м раствором TritonX100 проводили в течение 15 мин. Блокировали 1%-м 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), мечеными AlexaFluor™ 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. Изображения в светлом поле и флуоресцентных каналах получали с помощью системы визуализации INCell Analyzer 2200 (GE Healthcare, Великобритания). Анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения INCell Investigator (GE Healthcare, Великобритания).

Изображения 2D-культуры получали по 4 поля с увеличением 200×. В соответствии с морфологическими изменениями клетки классифицировали как живые (нор-

мальные ядра – неконденсированный хроматин, равномерно распределённый по всему ядру), апоптотические (круглые клетки, конденсированный или фрагментированный хроматин) и мёртвые (окрашенные PI из-за повреждения клеточной мембраны). Для 3D-культуры [23] получали z-стопки изображений сфероидов с увеличением 100x в светлом поле и флуоресцентных каналах (7–11 изображений, разделённых по оси z 15 мкм, начиная со дна). 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). На рисунке 2 представлены репрезентативные изображения отдельных z-плоскостей сфероидов HepG2.

ОТ-ПЦР анализ экспрессии CYP3A4 с детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР РВ). РНК выделяли с помощью набора RealBest Extraction 100 (Вектор-Бест, Новосибирск) согласно инструкции производителя, обрабатывали ДНКазой (Promega, США) и осаждали. Затем РНК (1 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием олиго(dT)18 праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV-RH (Биолабмикс, Новосибирск) в соответствии с инструкцией производителя. Уровень мРНК оценивали в реакционной смеси BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2x) (Биолабмикс, Новосибирск) на CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве генов домашнего хозяйства использовали *GADPH* и *RPLP0*. Образцы анализировали в трёх повторах (технические повторы) и в трёх повторах эксперимента. Изменение количества мРНК *CYP3A4* относительно генов *GADPH* и *RPLP0* рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Использовали следующие праймеры: *CYP3A4* человека, 5'-CATTCCTCATCCCAATTCTTGAAGT-3' (прямой) и 5'-CCACTCGGTGCTTTTGTGTATCT-3' (обратный); *GAPDH* человека, 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCC-3' (прямой) и 5'-AGTCCTCCACGATACCAAAG-3' (обратный); *RPLP0*

человека, 5'-TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT-3' (прямой) и 5'-CAATCTGCAGACAGACACTGG-3' (обратный).

Статистический анализ. Графики зависимости количества клеток, живых, апоптотических и мёртвых клеток строили в Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp., США). Значения LC_{50} и IC_{50} получали аппроксимацией нелинейной функцией кривых в Origin 8.0 (OriginLab, США). Количественные данные выражены как среднее трёх независимых экспериментов \pm среднеквадратическое отклонение ($M \pm \sigma$). Статистическая обработка данных экспрессии *CYP* проводилась с использованием программного пакета Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Полученные результаты исследования представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей [Q_1 – Q_3]. Статистическую значимость различий оценивали, применяя непараметрический критерий Манна – Уитни. Результаты считали статистически значимыми при достижении уровня значимости различий $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование цитотоксической и антипролиферативной активности

Оценка влияния комплексов $[Cu(L)_2]$ (**1**), $[Cu_2(bipy)_2(ФТ)_4]$ (**2**), $[Cu_2(phen)_2(ФТ)_4]$ (**3**), $\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O\}_n$ (**4**) на жизнеспособность клеток человека MRC-5 и HepG2 показала, что все исследуемые соединения, за исключением комплекса $[Cu(L)_2]$ (**1**), ингибировали пролиферацию клеток MRC-5 и вызывали дозозависимую клеточную гибель в концентрациях, достижимых в условиях *in vivo*. Существенно, что гибель происходит в результате апоптоза (рис. 3).

Значения LC_{50} для 2D-культур демонстрируют на порядок более высокую токсичность комплекса $[Cu_2(phen)_2(ФТ)_4]$ (**3**) для нормальных фибробластов MRC-

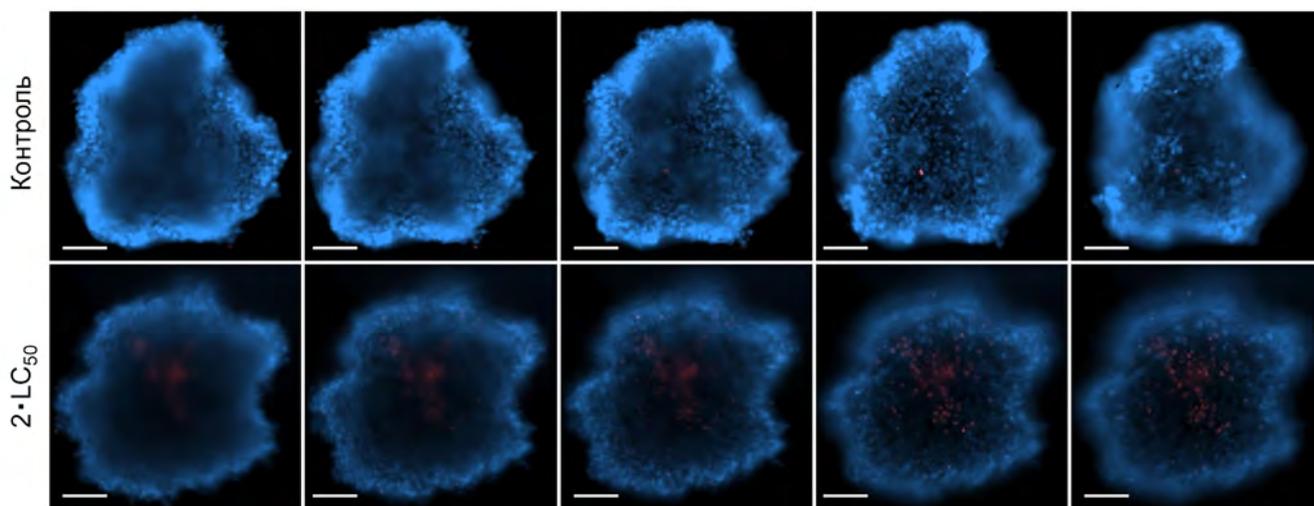


РИС. 2. Репрезентативные изображения отдельных z-плоскостей (слева направо) сфероидов HepG2 после 48 ч инкубации с 40 мкМ $[Cu_2(bipy)_2(ФТ)_4]$. Масштаб шкалы – 100 мкм

FIG. 2. Representative images of individual z-planes (left to right) of HepG2 spheroids after 48 hours of incubation with 40 μ M of $[Cu_2(bipy)_2(FT)_4]$. The size of the scale bar – 100 μ m

5, чем для HepG2 (табл. 1). Цитотоксическая активность комплексов (1), (2) и (4) оказалась сравнима для обеих линий. Цитотоксическая активность комплексов (2) – (4) выше, чем у клинически одобренных препаратов цисплатина и карбоплатина.

Антипролиферативная активность $[CuL_2]$ (1) в 2 раза выше для фибробластов, чем для HepG2 (табл. 2). Сопоставление данных таблицы 2 и рисунка 3 показывает, что количество клеток MRC-5 снижено на ~20 % по сравнению с контролем при воздействии 10 мкМ комплекса $[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$ (2) (рис. 2), тогда как для HepG2 такая концентрация приводит к снижению количества клеток на 50 % ($IC_{50} = 10,2 \pm 4$ мкМ; табл. 2). Это свидетельствует о том, что цитостатическая активность этого комплекса выше для гепатоцеллюлярной карциномы. Цитостатическую активность комплексов $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ (3) и $\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O\}_n$ (4) сравнить не удалось из-за высокой цитотоксической активности (рис. 3).

нению с контролем при воздействии 10 мкМ комплекса $[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$ (2) (рис. 2), тогда как для HepG2 такая концентрация приводит к снижению количества клеток на 50 % ($IC_{50} = 10,2 \pm 4$ мкМ; табл. 2). Это свидетельствует о том, что цитостатическая активность этого комплекса выше для гепатоцеллюлярной карциномы. Цитостатическую активность комплексов $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ (3) и $\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O\}_n$ (4) сравнить не удалось из-за высокой цитотоксической активности (рис. 3).

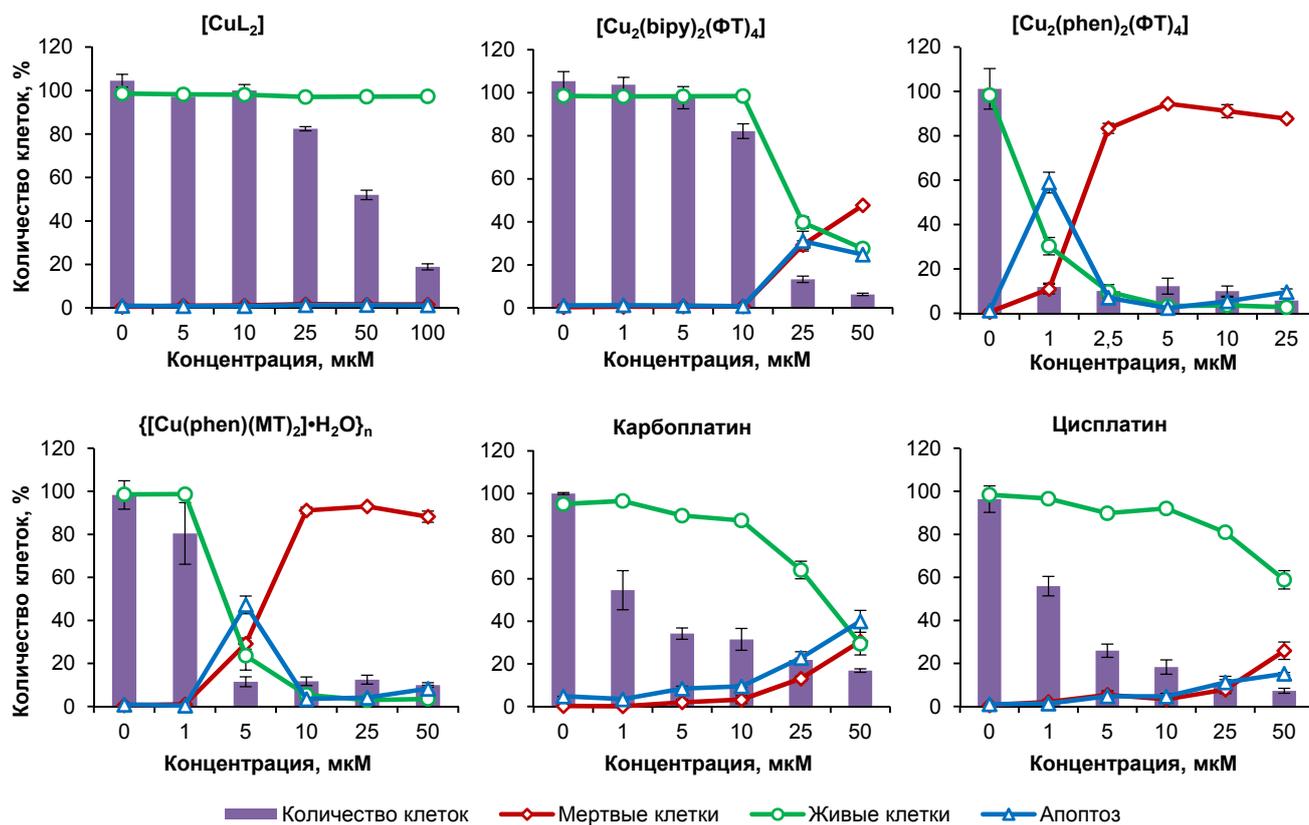


РИС. 3. Оценка влияния соединений на жизнеспособность фибробластов MRC-5 после 48 ч инкубации методом двойного окрашивания Hoechst/PI

FIG. 3. Assessment of the compounds effect on the viability of MRC-5 fibroblasts after 48 h of incubation using Hoechst/PI double staining

ТАБЛИЦА 1
ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ ПОСЛЕ 48 Ч ИНКУБАЦИИ

TABLE 1
CYTOTOXIC ACTIVITY OF COMPOUNDS AFTER 48 H OF INCUBATION

Соединения	LC_{50} , мкМ		
	MRC-5	HepG2	HepG2
$[CuL_2]$ (1)	> 100	> 100	> 100
$[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$ (2)	$27,2 \pm 0,5$	$21,7 \pm 0,4$	> 100
$[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ (3)	$0,60 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,8$
$\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O\}_n$ (4)	$3,0 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$
Карбоплатин	$35,7 \pm 0,3$	$32,2 \pm 2,1$	> 50
Цисплатин	> 50	$33,0 \pm 5,4$	$49,0 \pm 1,3$

В целом активность исследуемых соединений меди(II) для 2D-культур возрастает в порядке (1) < (2) < (4) < (3).

Сравнение активности комплексов Cu(II) на 2D-и 3D-моделях гепатоцеллюлярной карциномы показало, что сфероиды устойчивы к воздействию комплекса (2) с 2,2'-бипиридином, тогда как комплексы (3) и (4) с 1,10-фенантролином проявляют цитотоксическую активность на 3D-модели, сравнимую с активностью на 2D-модели (табл. 1, 2). При этом комплекс с 5-метилтетразолат-анионом (4) активнее комплекса с 5-фенилтетразолат-анионом (3). Для сфероидов активность комплекса (4) выше почти в два раза, чем для 2D-культуры HepG2, в то время как для комплекса (3) – почти в два раза ниже. Значения IC₅₀ для этих комплексов не были посчитаны из-за разрушения сфероидов в результате клеточной гибели.

Исследование влияния комплексов Cu(II) на экспрессию цитохромов P450

Влияние комплексов [Cu(L)₂] (1), [Cu₂(bipy)₂(ФТ)₄] (2), [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄] (3) и {[Cu(phen)(MT)₂]·H₂O}_n (4) на экспрессию CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 в клетках 2D HepG2 исследовали с помощью гибридизации *in situ*. Рифампицин и дексаметазон использовали в качестве положительного контроля. Репрезентативные изображения одновременного обнаружения мРНК в клетках HepG2 представлены на рисунке 4, результаты по оценке уровней мРНК CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 гибридизацией *in situ* – в таблице 3. Оценки экспрессии CYP3A4, полученные методом гибридизации *in situ*, подтверждали методом ОТ-ПЦР РВ и выявили их совпадение.

ТАБЛИЦА 2
АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ (ЦИТОСТАТИЧЕСКАЯ) АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ ПОСЛЕ 48 Ч ИНКУБАЦИИ

Соединения	IC ₅₀ , мкМ		
	2D-культура MRC-5	HepG2	3D-культура HepG2
[CuL ₂] (1)	53,1 ± 0,5	101 ± 1	> 100
[Cu ₂ (bipy) ₂ (ФТ) ₄] (2)	> 10	10,2 ± 4	> 100
[Cu ₂ (phen) ₂ (ФТ) ₄] (3)	–	0,98 ± 0,06	–
{[Cu(phen)(MT) ₂]·H ₂ O} _n (4)	> 1	3,7 ± 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

TABLE 2
ANTIPROLIFERATIVE (CYTOSTATIC) ACTIVITY OF COMPOUNDS AFTER 48 H OF INCUBATION

ТАБЛИЦА 3
КРАТНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ мРНК В КЛЕТКАХ HepG2 ПОСЛЕ 48 Ч ИНКУБАЦИИ, МЕ [Q₁-Q₃]

Соединения	Концентрация, мкМ	Кратное изменение интенсивности флуоресценции мРНК		
		CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4
[CuL ₂] (1)	5	1,05 [0,97–1,23]	1,44 [0,90–1,77]	1,36 [1,07–1,63]
	25	0,97 [0,64–1,25]	1,35 [0,91–1,62]	1,97 [1,48–2,29]*
[Cu ₂ (bipy) ₂ (ФТ) ₄] (2)	0,2	0,80 [0,69–1,20]	1,30 [1,01–1,75]	1,03 [0,67–1,25]
	1	1,12 [0,74–1,24]	1,92 [0,84–1,03]	1,04 [0,89–1,32]
[Cu ₂ (phen) ₂ (ФТ) ₄] (3)	0,2	0,79 [0,67–1,09]	1,03 [0,74–1,30]	0,84 [0,67–1,13]
	1	0,62 [0,55–0,66]	0,80 [0,62–1,21]	3,10 [2,26–3,87]*
{[Cu(phen)(MT) ₂]·H ₂ O} _n (4)	0,2	0,56 [0,47–0,76]	1,12 [0,96–1,45]	2,25 [2,05–2,81]*
	1	0,44 [0,36–0,66]	1,00 [0,76–1,19]	2,62 [1,96–3,43]*
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]
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]*

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

Можно видеть (табл. 3), что ни один из комплексов не оказывает статистически значимого эффекта на экспрессию *CYP2C19*. Под воздействием комплексов с 1,10-фенантролином (**3**) и (**4**) наблюдается тенденция к снижению экспрессии *CYP2C9*. При этом комплекс с 5-метилтетразолат-анионом имеет более сильный эффект, так как снижение экспрессии *CYP2C9* наблюдается с концентрации 0,2 мкМ, а под воздействием комплекса с 5-фенилтетразолат-анионом – только с 1 мкМ.

Комплексы $[\text{Cu}_2(\text{phen})_2(\text{ФТ})_4]$ (**3**) и $\{[\text{Cu}(\text{phen})(\text{MT})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}\}_n$ (**4**) индуцируют *CYP3A4* (табл. 3), причём в низких концентрациях (1 и 0,2 мкМ соответственно). Комплекс $[\text{CuL}_2]$ (**1**) также индуцирует *CYP3A4*, но в гораздо более высокой концентрации по сравнению с комплексами (**3**) и (**4**) (25 мкМ). Комплекс с 2,2'-бипиридином не оказывает влияния на экспрессию *CYP*. Оценка уровня белка *CYP3A4* после 48 ч инкубации клеток показала, что индуцирующий эффект у комплексов (**3**) и (**4**) сопоставим с RIF и DEX (табл. 4).

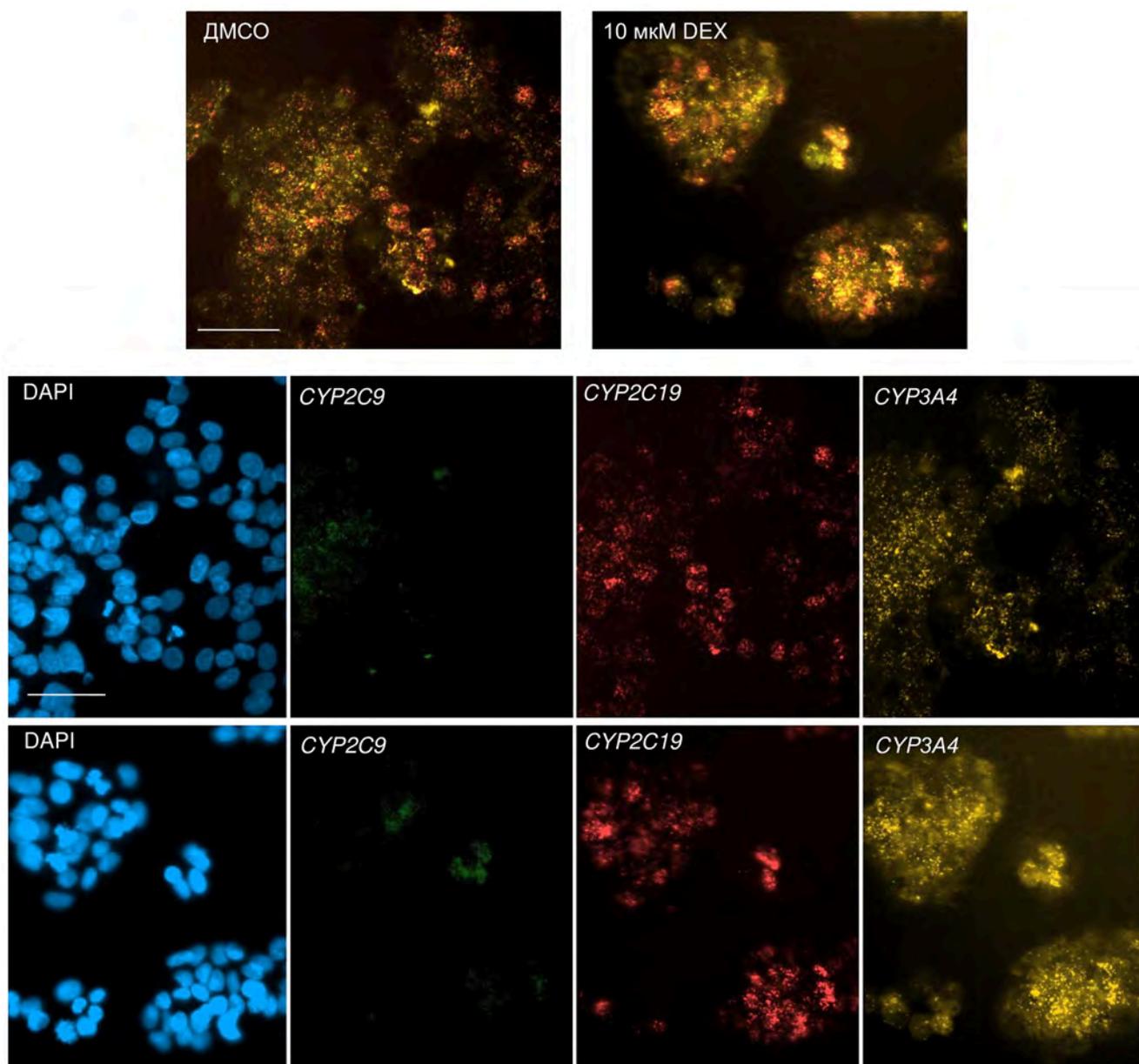


РИС. 4. Мультиплексное одновременное обнаружение мРНК в клетках HeG2 с использованием набора для анализа ViewRNA Cell Plus. мРНК *CYP3A4*, *CYP2C9* и *CYP2C19* детектировали с использованием флуоресцентных зондов ViewRNA типа 1 (жёлтый, *CYP3A4*), типа 4 (зелёный, *CYP2C9*) и типа 6 (красный, *CYP2C19*). Ядра окрашивали DAPI (синий). Масштаб шкалы – 100 мкм

Fig. 4. Multiplexed simultaneous detection of mRNA in HeG2 cells using the ViewRNA Cell Plus assay kit. *CYP3A4*, *CYP2C9* and *CYP2C19* mRNAs was detected using type 1 (yellow, *CYP3A4*), type 4 (green, *CYP2C9*) and type 6 (red, *CYP2C19*) fluorescent ViewRNA probes. Nuclei were stained with DAPI (blue). The size of the scale bar – 100 μm

ТАБЛИЦА 4
КРАТНОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛКА В КЛЕТКАХ HepG2
ПОСЛЕ 48 Ч ИНКУБАЦИИ, МЕ [Q₁-Q₃]

Соединения	Концентрация, мкМ	Кратное изменение интенсивности флуоресценции белка CYP3A4
[CuL ₂] (1)	25	1,77 [1,47–1,86]*
[Cu ₂ (bipy) ₂ (ФТ) ₄] (2)	1	1,03 [0,88–1,16]
[Cu ₂ (phen) ₂ (ФТ) ₄] (3)	1	1,87 [1,67–2,25]*
{[Cu(phen)(MT) ₂]-H ₂ O} _n (4)	1	1,95 [1,89–2,32]*
Дексаметазон	100	1,75 [1,48–2,24]*
Рифампицин	100	1,84 [1,49–2,48]*

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

TABLE 4
FOLD CHANGES IN THE CYP3A4 PROTEIN FLUORESCENCE
INTENSITY IN HepG2 CELLS AFTER 48 H OF INCUBATION,
ME [Q₁-Q₃]

ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирование и индукция цитохрома P450 являются основными механизмами, вызывающими фармакокинетическое взаимодействие лекарственных средств. Представители подсемейства CYP2C и CYP3A4 индуцируются многими препаратами, включая фенобарбитал, фенитоин, рифампицин и клинически одобренные глюкокортикоиды [16], и являются, как и CYP1A2, CYP2D6 и CYP2E1, наиболее важными ферментами, влияющими на фармакокинетику лекарственных средств [25]. Изоферменты CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4 в основном локализируются в печени и являются прогностическими маркерами гепатоцеллюлярной карциномы [26].

В данной работе было исследовано влияние четырёх комплексов меди(II) – [CuL₂] (1), [Cu₂(bipy)₂(ФТ)₄] (2), [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄] (3) и {[Cu(phen)(MT)₂]-H₂O}_n (4) – на CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4. Комплекс [CuL₂] (1) имеет низкую активность и индуцирует CYP3A4 в более высоких концентрациях по сравнению с остальными исследуемыми комплексами (25 мкМ и 1 мкМ соответственно). Он не влияет на уровни экспрессии CYP2C9 и CYP2C19. Воздействие комплекса с 2,2'-бипиридином (2) не приводит к изменениям экспрессии CYP. Комплексы с 1,10-фенантролином (3) и (4) индуцируют CYP3A4 и ингибируют CYP2C9. По сравнению с классическими индукторами рифампицином и дексаметазоном, комплексы меди(II) (3) и (4) индуцируют CYP3A4 в более низких концентрациях.

Согласно данным, изменения уровней экспрессии CYP3A4 могут модулировать активность CYP2C9 *in situ* в гепатоцитах человека посредством белок-белковых взаимодействий [27]. Эти две изоформы могут напрямую взаимодействовать через свои N-концы таким образом, что активность CYP2C9 снижается до 84 % [28]. Таким образом, повышение уровня экспрессии CYP3A4 комплексами меди(II) с 1,10-фенантролином (3) и (4) может приводить к одновременному ингибированию CYP2C9 и снижению его активности, что в свою очередь может привести к негативным последствиям в случае ГЦК, так как низ-

кий уровень экспрессии CYP2C9 является предиктором неблагоприятного прогноза ГЦК [14].

Ранее было проведено исследование цитотоксической активности новых комплексов на 2D-культурах опухолевых клеточных линий человека. Комплекс [CuL₂] (1) показал низкую активность относительно клеточной линии Hep-2 (карцинома гортани) [20]. В настоящей работе показано, что комплекс [CuL₂] (1) имеет низкую активность также относительно опухолевых клеток HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома). Комплексы с 5-фенилтетразолат-анионом (2) и (3) оказывали избирательное воздействие на клеточные линии человека разного происхождения (Hep-2, HepG2 и MCF-7 – рак молочной железы) [21]. Комплекс с 2,2'-бипиридином (2) был менее активен для HepG2 и Hep-2 по сравнению с MCF-7 – в ~2 и в ~4 раза соответственно. Цитотоксическая активность комплекса с 1,10-фенантролином (3) была сравнима для линий Hep-2 и HepG2 и превышала активность для MCF-7 в ~2 раза. Комплекс с 5-метилтетразолат-анионом оказывал одинаковое влияние на линии Hep-2 и MCF-7.

Цитотоксичность, наблюдаемая в отношении опухолевых клеток, требует ответа на вопрос, является ли она результатом противоопухолевой либо общей токсичности, ответ на который можно получить путём её сравнения с токсичностью для здоровых клеток [29]. Поэтому в данной работе было исследовано влияние новых комплексов меди(II) на нормальные фибробласты человека MRC-5. Комплекс [CuL₂] (1) имеет низкую цитотоксическую активность относительно нормальных фибробластов человека MRC-5, но его антипролиферативная активность ниже в два раза для опухолевой линии HepG2, чем для MRC-5 (101 ± 1 и 53,1 ± 0,5 мкМ соответственно). Комплексы с 5-фенилтетразолат-анионом (2) и (3) оказались токсичными для MRC-5. Комплекс [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄] (3) на порядок токсичнее для фибробластов, чем для HepG2; цитотоксическая активность (2) оказалась сравнима для обеих линий. Воздействие комплекса с 5-метилтетразолат-анионом (4) на MRC-5 (LC₅₀ = 3,0 ± 0,1 мкМ) также сравнимо с действием комплекса на опухолевые линии HepG2 (LC₅₀ = 3,2 ± 0,1 мкМ), Hep-2 и MCF-7. Таким образом, мож-

но сделать вывод, что комплекс $\{[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O\}_n$ (**4**) вызывает гибель клеток независимо от клеточной линии.

Комплексы с производными тетразола (**2**), (**3**) и (**4**) индуцируют апоптоз в клетках MRC-5. Для опухолевых клеток высокий уровень апоптоза наблюдался только при воздействии комплексов с 5-фенилтетразолат-анионом (**2**) и (**3**) на Her-2 и MCF-7 соответственно. В остальных случаях уровень апоптоза обработанных соединениями клеток не отличался от уровня в контроле, что позволяет допустить возможность реализации других путей клеточной гибели.

На протяжении двух последних десятилетий сложилось понимание того, что стандартные 2D-культуры недостаточно точно отражают процессы жизнедеятельности, и часто соединения, показавшие высокую активность в условиях *in vitro*, не проявляют таковой в условиях *in vivo* из-за ограниченной межклеточной сигнализации, отсутствия градиентов и изменённой клеточной морфологии [30]. 3D-модели клеточных культур позволяют лучше приблизиться к ситуации *in vivo*. Поэтому нами было проведено исследование цитотоксического эффекта новых соединений на сфероиды HerG2. Среди исследованных комплексов только соединения с 1,10-фенантролином (**3**) и (**4**) сохраняют свою активность в отношении клеточных сфероидов, в то время как остальные не оказывают существенного влияния на их жизнеспособность после 48 ч воздействия. Комплекс (**3**) менее активен для сфероидов, чем для 2D-культуры ($LC_{50} = 6,4 \pm 0,8$ мкМ и $2,5 \pm 0,1$ мкМ соответственно), а к воздействию комплекса (**4**) клетки в сфероиде оказались чувствительнее, чем в монослое ($LC_{50} = 1,7 \pm 0,2$ мкМ и $3,2 \pm 0,1$ мкМ соответственно).

Таким образом, комплекс $[Cu_2(phen)_2(ФТ)_4]$ (**3**) представляет интерес для дальнейшего исследования, так как причина его селективности к клеткам различного происхождения может определить дальнейшие модификации его структуры для создания противоопухолевого соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди изученных комплексов меди(II) наиболее перспективным с точки зрения потенциальных противоопухолевых соединений является комплекс $[Cu_2(phen)_2(ФТ)_4]$ (**3**). Он проявляет дозозависимую цитотоксическую активность в отношении изученных клеточных линий, зависящую от происхождения клеток; но следует отметить, что этот эффект не является специфичным для опухолевых линий и выше для нормальных фибробластов MRC-5. Активность комплекса (**3**) выше, чем у цисплатина и карбоплатина, и сохраняется на 3D-модели HerG2. Комплекс индуцирует CYP3A4 на уровне мРНК и белка, ингибирует CYP2C9 и не влияет на экспрессию CYP2C19. Соединение (**3**) можно использовать как основу для создания противоопухолевого соединения, но необходима дальнейшая модификация структуры для повышения селективности к опухолевым клеткам или же разработка средства/способа направленной доставки (например, липосомы) с той же целью.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90129. Работа была поддержана бюджетным финансированием (проект FGMU-2022-0004, регистрационный номер 1021050601082-2-1.6.4;3.1.6). Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-73-10207).

Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rumgay H, Ferlay J, de Martel C, Georges D, Ibrahim AS, Zheng R, et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype. *Eur J Cancer*. 2022; 161: 108-118. doi: 10.1016/j.ejca.2021.11.023
2. Le Grazie M, Biagini MR, Tarocchi M, Polvani S, Galli A. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future. *World J Hepatol*. 2017; 9(21): 907-920. doi: 10.4254/wjh.v9.i21.907
3. Tsvetkova D, Ivanova S. Application of approved cisplatin derivatives in combination therapy against different cancer diseases. *Molecules*. 2022; 27(8): 2466. doi: 10.3390/molecules27082466
4. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther*. 2017; 11: 599-616. doi: 10.2147/DDDT.S119488
5. Hordyjewska A, Popiolek L, Kocot J. The many "faces" of copper in medicine and treatment. *Biomaterials*. 2014; 27(4): 611-621. doi: 10.1007/s10534-014-9736-5
6. Nasulewicz A, Mazur A, Opolski A. Role of copper in tumour angiogenesis – Clinical implications. *J Trace Elem Med Biol*. 2004; 18(1): 1-8. doi: 10.1016/j.jtemb.2004.02.004
7. Lelièvre P, Sancey L, Coll JL, Deniaud A, Busser B. The multifaceted roles of copper in cancer: A trace metal element with dysregulated metabolism, but also a target or a bullet for therapy. *Cancers*. 2020; 12(12): 3594. doi: 10.3390/cancers12123594
8. Fang AP, Chen PY, Wang XY, Liu ZY, Zhang DM, Luo Y, et al. Serum copper and zinc levels at diagnosis and hepatocellular carcinoma survival in the Guangdong Liver Cancer Cohort. *Int J Cancer*. 2019; 144(11): 2823-2832. doi: 10.1002/ijc.31991
9. Baldari S, Di Rocco G, Toietta G. Current biomedical use of copper chelation therapy. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(3): 1069. doi: 10.3390/ijms21031069
10. Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, et al. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(16): 1813-1825. doi: 10.2174/138161210791209009
11. Denoyer D, Masaldan S, La Fontaine S, Cater MA. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics*. 2015; 7(11): 1459-1476. doi: 10.1039/c5mt00149h

12. Zhang Z, Wang H, Yan M, Wang H, Zhang C. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment (Review). *Mol Med Rep*. 2017; 15(1):3-11. doi: 10.3892/mmr.2016.6022
13. Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, et al. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther*. 2018; 11: 2063-2073. doi: 10.2147/OTT.S161109
14. Wang X, Yu T, Liao X, Yang C, Han C, Zhu G, et al. The prognostic value of CYP2C subfamily genes in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med*. 2018; 7(4): 966-980. doi: 10.1002/cam4.1299
15. Ashida R, Okamura Y, Ohshima K, Kakuda Y, Uesaka K, Sugiura T, et al. CYP3A4 gene is a novel biomarker for predicting a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017; 14(6): 445-453. doi: 10.21873/cgp.20054
16. Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician*. 2007; 76(3): 391-396.
17. Lu C, Di L. *In vitro* and *in vivo* methods to assess pharmacokinetic drug-drug interactions in drug discovery and development. *Biopharm Drug Dispos*. 2020; 41: 3-31. doi: 10.1002/bdd.2212
18. Choi JM, Oh SJ, Lee SY, Im JH, Oh JM, Ryu CS, et al. HepG2 cells as an *in vitro* model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Arch Pharm Res*. 2015; 38(5): 691-704. doi: 10.1007/s12272-014-0502-6
19. Kyffin JA, Sharma P, Leedale J, Colley HE, Murdoch C, Mistry P, et al. Impact of cell types and culture methods on the functionality of *in vitro* liver systems – A review of cell systems for hepatotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro*. 2018; 48: 262-275. doi: 10.1016/j.tiv.2018.01.023
20. Eremina JA, Lider EV, Sukhikh TS, Eltsov IV, Kuratieva NV, Zakharov BA, et al. Synthesis, crystal structures, spectroscopic, and cytotoxicity study of Cu(II), Co(II), Ni(II) and Pd(II) complexes with 2-anilinomethylidene-5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione. *Polyhedron*. 2020; 178. doi: 10.1016/j.poly.2019.114325
21. Eremina JA, Ermakova EA, Smirnova KS, Klyushova LS, Berezin AS, Sukhikh TS, et al. Cu(II), Co(II), Mn(II) complexes with 5-phenyltetrazole and polypyridyl ligands: Synthesis, characterization and evaluation of the cytotoxicity and antimicrobial activity. *Polyhedron*. 2021; 206. doi: 10.1016/j.poly.2021.115352
22. Eremina JA, Lider EV, Kuratieva NV, Samsonenko DG, Klyushova LS, Sheven' DG, et al. Synthesis and crystal structures of cytotoxic mixed-ligand copper(II) complexes with alkyl tetrazole and polypyridine derivatives. *Inorganica Chim Acta*. 2021; 516. doi: 10.1016/j.ica.2020.120169
23. Sirenko O, Mitlo T, Hesley J, Luke S, Owens W, Cromwell EF. High-content assays for characterizing the viability and morphology of 3D cancer spheroid cultures. *Assay Drug Dev Technol*. 2015; 13(7): 402-414. doi: 10.1089/adt.2015.655
24. Mancio-Silva L, Fleming HE, Miller AB, Milstein S, Liebow A, Haslett P, et al. Improving drug discovery by nucleic acid delivery in engineered human microlivers. *Cell Metab*. 2019; 29(3): 727-735. e3. doi: 10.1016/j.cmet.2019.02.003
25. Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutr Metab (Lond)*. 2008; 5: 27. doi: 10.1186/1743-7075-5-27
26. Wang X, Liao X, Yang C, Huang K, Yu T, Yu L, et al. Identification of prognostic biomarkers for patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Oncol Rep*. 2019; 41(3): 1586-1602. doi: 10.3892/or.2019.6953
27. Ramsden D, Tweedie DJ, Chan TS, Tracy TS. Altered CYP2C9 activity following modulation of CYP3A4 levels in human hepatocytes: an example of protein-protein interactions. *Drug Metab Dispos*. 2014; 42(11): 1940-1946. doi: 10.1124/dmd.114.057901
28. Subramanian M, Tam H, Zheng H, Tracy TS. CYP2C9-CYP3A4 protein-protein interactions: Role of the hydrophobic N terminus. *Drug Metab Dispos*. 2010; 38(6): 1003-1009. doi: 10.1124/dmd.109.030155
29. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 77(6): 1103-1124. doi: 10.1007/s00280-016-2976-z
30. Langhans SA. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front Pharmacol*. 2018; 9(6): 14. doi: 10.3389/fphar.2018.00006

Сведения об авторах

Клюшова Любовь Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории биохимии чужеродных соединений, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», e-mail: klyushovals@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4820-2536>

Голубева Юлия Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории металл-органических координационных полимеров, ФГБНУ Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, e-mail: julia1995@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5404-5357>

Вавилин Валентин Андреевич – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», e-mail: drugsmet@niimbb.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9769-6512>

Гришанова Алевтина Юрьевна – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биохимии чужеродных соединений, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», e-mail: agrish@niimbb.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5894-1159>

Information about the authors

Lubov S. Klyushova – Junior Research Officer at the Laboratory of Xenobiotic Biochemistry, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, e-mail: klyushovals@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4820-2536>

Yuliya A. Golubeva – Junior Research Officer at the Laboratory of Cluster and Supramolecular Compounds, Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: julia1995@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5404-5357>

Valentin A. Vavilin – Dr. Sc. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, Director, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, e-mail: drugsmet@niimbb.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9769-6512>

Alevtina Yu. Grishanova – Dr. Sc. (Biol.), Professor, Chief Research Officer at the Laboratory of Xenobiotic Biochemistry, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, e-mail: agrish@niimbb.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5894-1159>