

РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРРОПТОЗА МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА ДОНОРАМИ ОКСИДА АЗОТА

DOI: 10.17691/stm2025.17.3.04

УДК 616–092.18:576.36

Поступила 28.10.2024 г.

© **И.И. Власова**, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник отдела современных биоматериалов;
М.Д. Юрканова, лаборант лаборатории смарт-нанотехнологий;
А.А. Золотопуп, лаборант лаборатории смарт-нанотехнологий;
Т.О. Ключерев, младший научный сотрудник лаборатории смарт-нанотехнологий;
П.С. Тимашев, д.х.н., профессор Института регенеративной медицины;
научный руководитель Научно-технологического парка биомедицины

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
(Сеченовский университет), ул. Трубецкая, 8/2, Москва, 119991

Ферроптоз — программируемая форма клеточной гибели, в которой основным звеном является железозависимое перекисное окисление липидов. Макрофаги — основные клетки иммунной системы, они функционируют в проокислительной среде, поэтому изучение их предрасположенности к ферроптозу и поиск подходов к его регуляции имеют важное значение.

Цель исследования — изучить особенности ферроптоза макрофагов, дифференцированных из клеток миелоидной лейкемии THP-1, и сравнить влияние доноров NO с разным временем полураспада на степень развития ферроптоза.

Материалы и методы. Для индукции ферроптоза THP-1-макрофагов были использованы ингибиторы глутатионпероксидазы 4 (GPX4) — RSL3 и ML-162, а также ингибитор цистин-глутаматного обмена эрастин. За развитием ферроптоза следили с помощью трех независимых методов: восстановление живыми клетками аламарового синего, измерение лактатдегидрогеназы в среде, LIVE/DEAD-тест. Ферроптотическая гибель клеток была доказана с помощью специфического ингибитора ферростатина-1, а также путем выявления окисления липидов в клетках с использованием флуоресцентного зонда BODIPY 581/591 C11.

Результаты. RSL3 и ML-162 дозозависимо индуцировали ферроптоз клеток. Ферроптоз THP-1-макрофагов — медленный процесс, он начинается через ~5 ч после добавления индуктора. Эрастин является слабым индуктором ферроптоза, однако он усиливал ферроптоз, вызванный ингибиторами GPX4. Мы сравнили способность двух доноров NO с разным временем полураспада влиять на ферроптоз THP-1-макрофагов: DEA NONOate (2 мин) и DPTA NONOate (3 ч). Доноры добавляли однократно после индуктора в концентрации 100–120 мкМ или несколько раз до достижения заданной концентрации. DEA не влиял на ферроптоз THP-1-макрофагов, тогда как DPTA полностью ингибировал ферроптоз.

Заключение. DPTA — донор NO со временем полураспада 3 ч при 37°C — может быть использован для ингибирования ферроптоза THP-1-макрофагов, который развивается в течение 17–19 ч. Следовательно, существуют механизмы пролонгирования действия NO, которые необходимо изучать с целью использования доноров NO для регуляции ферроптоза клеток.

Ключевые слова: ферроптоз; THP-1-макрофаги; доноры оксида азота.

Как цитировать: Vlasova I.I., Yurkanova M.D., Zolotopup A.A., Klyucherev T.O., Timashev P.S. Regulation of ferroptosis in human macrophages by nitric oxide donors. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2025; 17(3): 41, <https://doi.org/10.17691/stm2025.17.3.04>

Для контактов: Власова Ирина Ивановна, e-mail: vlasova_i_i@staff.sechenov.ru

Regulation of Ferroptosis in Human Macrophages by Nitric Oxide Donors

I.I. Vlasova, PhD, Leading Researcher, Department of Modern Biomaterials;
M.D. Yurkanova, Laboratory Assistant, Laboratory of Clinical Smart Nanotechnologies;
A.A. Zolotopup, Laboratory Assistant, Laboratory of Clinical Smart Nanotechnologies;
T.O. Klyucherev, Junior Researcher, Laboratory of Clinical Smart Nanotechnologies;
P.S. Timashev, DSc, Professor, Institute of Regenerative Medicine; Scientific Director,
Scientific and Technological Park of Biomedicine

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St.,
Moscow, 119991, Russia

Ferroptosis is a programmed form of cell death in which iron-dependent lipid peroxidation is the main feature. Macrophages are the major cells of the immune system, they function in a pro-oxidative environment, so the study of their susceptibility to ferroptosis and the search for approaches to its regulation are important.

The aim of the study was to investigate ferroptosis in macrophages differentiated from THP-1 myeloid leukemia cells and to compare the effect of NO donors with different half-lives on the degree of ferroptosis development.

Materials and Methods. RSL3 and ML-162, inhibitors of glutathione peroxidase 4 (GPX4), and erastin, an inhibitor of cystine/glutamate transport, were used to induce ferroptosis in THP-1 macrophages. The progression of ferroptosis was monitored using three independent methods: reduction of Alamar blue by live cells, measurement of lactate dehydrogenase in the medium, and the LIVE/DEAD assay. Ferroptotic cell death was proven by using the specific inhibitor ferrostatin-1 and by detecting lipid oxidation in cells using the BODIPY 581/591 C11 fluorescent probe.

Results. RSL3 and ML-162 dose-dependently induced ferroptosis in cells. THP-1 macrophage ferroptosis is a slow process and begins ~5 h after inducer addition. Erastin was a weak ferroptosis inducer; however, it enhanced ferroptosis induced by GPX4 inhibitors. We compared the ability of two NO donors with different half-lives to affect THP-1 macrophage ferroptosis: DEA NONOate (2 min) and DTPA NONOate (3 h). Donors were added either once after the inducer at a concentration of 100–120 μ M or repeatedly until reaching the final concentration. DEA had no effect on THP-1 macrophage ferroptosis, whereas DTPA completely inhibited ferroptosis.

Conclusion. DTPA, being an NO donor with a half-life of 3 h at 37°C, can be used to inhibit ferroptosis in THP-1 macrophages, which develops within 17–19 h. Therefore, there are mechanisms of prolongation of NO action in cells that should be studied to use NO donors for regulation of cellular ferroptosis.

Key words: ferroptosis; THP-1 macrophages; nitric oxide donors.

Введение

Ферроптоз — это особый тип регулируемой программируемой гибели клеток в результате нарушения трех метаболических процессов: концентрации глутатиона в клетке, метаболизма железа и регуляции перекисного окисления липидов [1, 2]. Перекисное окисление липидов было признано фундаментальным звеном ферроптоза [3, 4]. В настоящее время хорошо известна связь ферроптоза с различными патологиями: начиная от нейродегенеративных заболеваний и повреждений, вызванных ишемией–реперфузией, до заболеваний почек и резистентных видов рака [5–7]. Это стимулирует поиск новых механизмов изменения устойчивости клеток к ферроптозу.

Глутатионпероксидаза 4 (GPX4) катализирует восстановление гидроперекисей липидов (PLOOH) в соответствующие гидроксильные производные (PLOH) за счет окисления тиоловых групп глутатиона (GSH) [8]. Ингибирование GPX4 специфическими ингибиторами RSL3 или ML-162 является стандартной экс-

периментальной моделью для изучения ферроптоза. В качестве альтернативного индуктора ферроптоза в лабораторных исследованиях широко используют эрастин — ингибитор цистин-глутаматной антипортерной системы Xc⁻.

Макрофаги — основные клетки врожденного иммунитета, которые участвуют во всех стадиях иммунного ответа при повреждении тканей или воздействиях патогенов, а также координируют действия других клеток. Они продуцируют провоспалительные цитокины и активные формы кислорода, создавая проокислительную среду, которая может способствовать развитию ферроптоза в клетках [9–11]. THP-1 представляет собой моноцитарную линию лейкоза человека, активация этих клеток фторбол-12-миристан-13-ацетатом приводит к их дифференцировке в макрофагоподобные клетки [12]. Данная клеточная линия является распространенной моделью изучения иммуномодулирующих свойств моноцитов/макрофагов как в области фундаментальной иммунологии, так и в качестве *in vitro* модели различных заболеваний, в патогенез кото-

рых вовлечены макрофаги (например, сердечно-сосудистых заболеваний, нейровоспаления, рака и инфекционных заболеваний) [13–15]. Несмотря на то, что большая часть исследований механизмов ферроптоза макрофагов проводилось на мышиных макрофагах — клеточной линии RAW 264.7 и макрофагах, полученных из костного мозга, в последние годы THP-1 также активно изучаются в контексте заболеваний, где клеточная гибель происходит по ферроптоз-зависимым механизмам. Повышенная концентрация железа при эндометриозе индуцирует ферроптоз у THP-1-макрофагов, что приводит к снижению фагоцитирующей способности этих клеток, а также вызывает усиление секреции ангиогенных цитокинов, таких как фактор роста эндотелия сосудов А и интерлейкин 8. Данные факторы способствуют усилению эндометриоза [16]. Ингибирование ферроптоза у THP-1-макрофагов с помощью байкалеина, который является потенциальным средством против ферроптоза благодаря способности повышать экспрессию GPX4, восстанавливало фагоцитирующую активность клеток. Данное соединение рассматривается как перспективный препарат для терапии эндометриоза посредством ослабления ферроптоза макрофагов [16]. Исходя из этого, можно утверждать, что THP-1-макрофаги представляют собой важную модель для изучения ферроптоз-зависимой клеточной гибели, а также фармакологических соединений, нацеленных на модуляцию процесса ферроптоза в макрофагах.

GSH/GPX4 является преобладающей системой детоксикации гидропероксидов фосфолипидов в клетках млекопитающих [8]. Однако недавно были обнаружены независимые от GPX4 регуляторы ферроптоза, такие как белок-супрессор ферроптоза 1 [17] и Ca^{2+} -независимая фосфолипаза A2 β [18]. Ряд природных или синтетических перехватчиков свободных радикалов — от членов семейства витаминов Е до разнообразных ароматических аминов и фенольных соединений — действуют как ингибиторы ферроптоза [19]. Показано, что клетки макрофагов мышей RAW 264.7 способны стимулировать антиферроптотический механизм, управляемый индуцированной NO-синтазой (iNOS), для того чтобы заблокировать перекисное окисление липидов и защитить клетки от гибели [20]. Причем макрофаги могут защитить не только себя, но и клетки легочного эпителия в экспериментах по кокультивированию [21].

Известно, что NO $\cdot$ представляет собой активную молекулу, продуцируемую семейством белков iNOS [22]. Во-первых, NO $\cdot$ является мощной сигнальной молекулой, способной действовать паракринно во время расслабления гладких мышц или расширения сосудов, а также как внутриклеточный вторичный мессенджер, регулирующий антиоксидантный ответ клеток [23]. NO $\cdot$ напрямую связывает и инактивирует Fe-содержащие ферменты и может реагировать

с супероксидным анион-радикалом с образованием высокореакционного пероксинитрита, который участвует в защите от патогенов [24]. Кроме того, способность NO $\cdot$ взаимодействовать с различными радикалами (включая промежуточные липидные радикалы), появляющимися в процессе ферроптоза, может облегчить посттрансляционное нитрозилирование белков и липидов, модифицирующее их активность, стабильность или локализацию. Доноры NO — вещества стабильные в органических растворителях или при сильнощелочных pH, в которых готовятся их stock-растворы. Однако, попадая в среду с pH=7,4, они диспропорционируют с высвобождением газобразного NO.

В настоящей работе мы изучили ферроптоз THP-1-макрофагов и показали возможность его регулирования: усиление за счет одновременного действия индукторов разной природы и ингибирование донором оксида азота.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клетки моноцитов человека THP-1 культивировали в среде RPMI 1640 без L-глутамата, с 2 mM Glutamax, 10% термически инактивированной фетальной бычьей сывороткой (FBS), пенициллином (100 Ед./мл) и стрептомицином (100 мкг/мл) при 37°C и 5% CO $_2$. Дифференцировку в макрофаги осуществляли путем инкубации в течение 48 ч с форбол-12-миристан-13-ацетатом, добавленным в количестве 75 нг/мл. Через 2 дня среду заменяли и клетки культивировали без форбола-12-миристана-13-ацетата еще сутки, после чего делали добавки к клеточной среде. Для экспериментов по определению жизнеспособности клеток их высаживали в 48-луночный планшет по 150 тыс. клеток на 1 лунку в 350 мл среды. В качестве индукторов ферроптоза использовали ингибиторы GPX4 — RSL3 и ML-162, которые добавляли в среду инкубации в концентрации 0,5–2,5 мкМ и инкубировали в течение 5–22 ч с последующим анализом гибели клеток. Кроме того, для инициации гибели клеток использовали блокатор цистин-глутаматной антипортерной системы эрастин. Для доказательства ферроптотической формы гибели клеток эксперименты проводили с добавлением в среду культивирования ингибитора ферроптоза ферростатина-1 (Fer-1), который предотвращает образование гидроперекисей липидов, в дозе 5 мкМ. В экспериментах использовали доноры: Diethylamine NONOate sodium salt hydrate (DEA NONOate) — NO-донор с периодом полураспада 2 мин при 37°C и 15 мин при 22–25°C и Dipropyleneetriamine NONOate (DPTA NONOate) — NO-донор с периодом полураспада 3 ч при 37°C и 5 ч при 22–25°C (0,1 М фосфатный буфер, pH=7,4). Первую добавку делали в течение 5–15 мин после добавления индуктора ферроптоза, далее добавляли реагент через определенные промежутки времени.

Характеристика клеточной гибели. Клеточную гибель оценивали количественно с помощью трех независимых методов:

1. Определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в среде клеток проводили с помощью стандартных наборов детекции ЛДГ (Thermo Fisher Scientific, США). К 50 мкл среды (контроль — среда без инкубации с макрофагами) добавляли 50 мкл реакционного буфера, инкубировали 30 мин. После добавления 50 мкл стоп-реагента измеряли поглощение раствора при 490 и 680 нм. Процент гибели клеток рассчитывали как $(\text{ЛДГ}_{\text{проба}}/\text{ЛДГ}_{\text{контроль}}) \cdot 100\%$.

2. Аламаровый синий добавляли к клеткам в концентрации 10 мг/мл; инкубирование проводили при температуре 37°C в течение 2 ч с последующим измерением флуоресценции на спектрофлуориметре VICTOR Nivo (PerkinElmer, США), E_x — 580/20 нм, E_m — 625/20 нм.

3. LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) — стандартный тест для характеристики жизнеспособности клеток, который позволяет отличить живые клетки от мертвых путем одновременного окрашивания зеленым кальцеином АМ и красным флуоресцентным гомодимером-1 пропидий йодида. После замены среды к клеткам добавляли реагенты LIVE/DEAD-теста и 1 мкМ Hoechst для окрашивания ядер. Окрашивание проводили в течение 30 мин при температуре 37°C и 5% CO_2 согласно инструкции производителя, после чего меняли среду. Живые и мертвые клетки визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, США) с установленным диапазоном длин волн для возбуждения и регистрации флуоресценции красителей: для Hoechst 33342 ($E_{x\text{max}}$ — 351 нм, $E_{m\text{max}}$ — 461 нм) использовали канал DAPI (возбуждение при длине волны 357 ± 44 нм; излучение регистрируется в диапазоне 447 ± 30 нм); для кальцеина АМ ($E_{x\text{max}}$ — 494 нм, $E_{m\text{max}}$ — 517 нм) использовали канал GFP (возбуждение при длине волны 470 ± 22 нм; излучение регистрируется в диапазоне 525 ± 25 нм); для пропидий йодида ($E_{x\text{max}}$ — 535 нм, $E_{m\text{max}}$ — 617 нм) использовали канал RFP (возбуждение при длине волны 531 ± 40 нм, излучение регистрируется в диапазоне 593 ± 20 нм).

Визуализация окисления липидов клеток с помощью маркера окисления липидов BODIPY. THP-1-клетки сеяли в 48-луночный планшет, через сутки после замены среды к клеткам добавляли зонд BODIPY 581/591 C11 (Invitrogen, США) в концентрации 15 мкМ и инкубировали при 37°C и 5% CO_2 , спустя 30 мин к экспериментальным клеткам добавляли индуктор ферроптоза RSL3 в концентрации 1,25 мкМ. Через 17–19 ч меняли среду, после чего образцы анализировали, используя EVOS M5000. Зонд, встраиваясь в мембрану клеток, имеет флуоресценцию в красной области ($E_{x\text{max}}$ — 581, $E_{m\text{max}}$ — 591, канал GFP), но при окислении параметры флюо-

ресценции молекулы сдвигаются в зеленую область ($E_{x\text{max}}$ — 488, $E_{m\text{max}}$ — 510; канал RFP).

Статистика. Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism 9.0.5. Порог значимости был установлен на уровне $p < 0,05$. Группы сравнивали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (two-way ANOVA) и однофакторного анализа ANOVA с пост-хок тестом Тьюки.

Результаты

Индукторы ферроптоза RSL3 или ML-162 были добавлены в среду культивирования THP-1-макрофагов в разных концентрациях — 0,5; 1,25 и 2,5 мкМ. За нативностью клеток следили при помощи светового микроскопа, а также ряда биохимических методов: 1) наиболее точным параметром, который позволяет количественно охарактеризовать гибель клеток, является концентрация фермента ЛДГ, вышедшего из мертвых клеток в среду инкубации; 2) простой и наглядный метод на основе аламарового синего позволяет оценить метаболическую активность живых клеток, которые способны восстанавливать аламаровый синий (резазулин) до флуоресцирующего резорфина; 3) LIVE/DEAD-тест на основе двух красителей позволяет визуально различить живые и мертвые клетки.

Время развития ферроптоза и количество погибших клеток зависят от концентрации индукторов ферроптоза и времени инкубации. На рис. 1 показано, что количество ЛДГ в среде THP-1-макрофагов повышалось с увеличением концентрации индуктора ферроптоза и времени инкубации клеток с индуктором. При наших экспериментальных условиях гибель клеток начинается через 5–9 ч инкубации и достигает максимума через 13–19 ч в зависимости от концентрации индуктора.

На рис. 2 показаны результаты эксперимента, в котором сравнивали гибель клеток, измеренную с помощью ЛДГ и аламарового синего. Увеличение концентрации ЛДГ сопровождалось уменьшением количества живых клеток, способных восстановить резазулин. Для приведенного эксперимента наблюдалось хорошее соответствие результатов, полученных двумя независимыми методами. Однако в ряде экспериментов результаты с аламаровым синим не соответствовали реальности (результаты не представлены), что может быть обусловлено окислительной активностью макрофагов или их переходом в среду вследствие инициации гибели. В связи с этим в качестве основного метода количественной характеристики перекисного окисления липидов был выбран метод на основе LDH.

Визуализацию клеточной гибели проводили с использованием LIVE/DEAD-теста (рис. 3). В контроле клетки были окрашены в зеленый цвет; живые клетки восстанавливают кальцеин АМ до флуоресцирую-

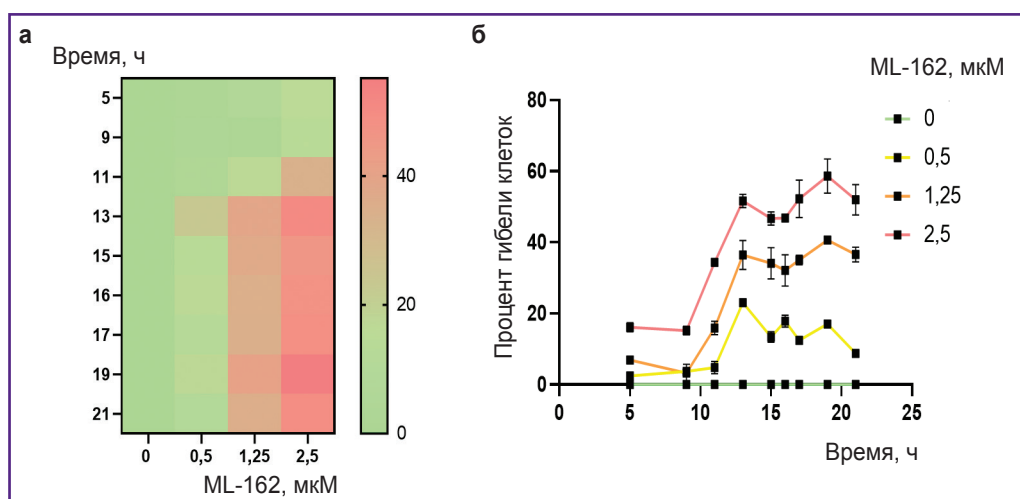
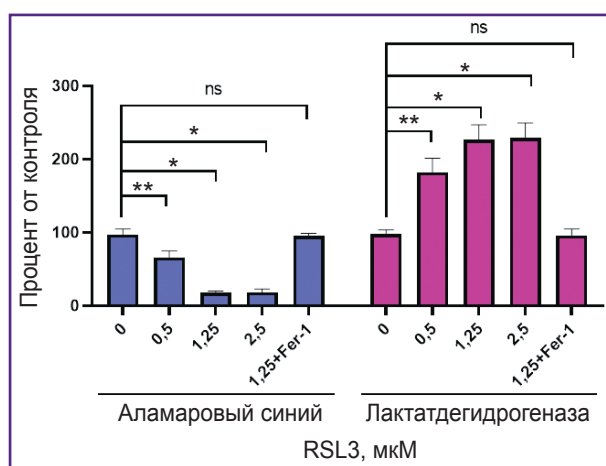


Рис. 1. Зависимость ферроптоза THP-1-макрофагов от концентрации индуктора ML-162 и времени инкубации:

а — тепловая карта развития ферроптоза во времени для разных концентраций индуктора ML-162; **б** — зависимость процента гибели клеток от времени инкубации для трех концентраций ML-162

Рис. 2. Количественная характеристика ферроптоза THP-1-клеток, индуцированного RSL3, с помощью аламарового синего и измерения лактатдегидрогеназы в среде клеток

Время инкубации с индуктором составляло 19 ч. Fer-1 — специфический ингибитор ферроптоза — в концентрации 5 мкМ полностью ингибирует клеточную гибель; * $p < 0,0001$, ** $p < 0,0005$, ns $p > 0,05$



щего кальцеина. Добавление индуктора ферроптоза RSL3 дозозависимо приводит к уменьшению количества живых клеток и к росту числа клеток, окрашенных пропидий иодидом, который может проникать только в мертвые клетки.

Для доказательства ферроптотической формы гибели клеток мы использовали специфический ингибитор ферроптоза Fer-1 (5 мкМ), который полностью ингибировал клеточную гибель (см. рис. 2). Окисление липидов мембраны клетки — ключевое звено ферроптоза. Чтобы дополнительно доказать, что изучаемая нами гибель клеток является ферроптозом, мы применяли специфический флуоресцентный маркер окисления липидов BODIPY C11 (рис. 4). В наших экспериментах наблюдалось дозозависимое изменение флуоресценции BODIPY: уменьшение флуоресценции в красной области и увеличение в зеленой при повышении концентрации RSL3.

Эрастин слабо влиял на жизнеспособность THP-1-макрофагов, гибель клеток при добавлении 10 мкМ эрастина составила $23 \pm 7\%$ от контроля. Если клетки одновременно были обработаны индукторами ферроптоза с разными механизмами действия, наблюдалось усиление их гибели, которое превышает суммарное действие используемых индукторов (рис. 5).

В качестве донора оксида азота применяли DPTA NONOate. DPTA полностью ингибирует ферроптоз THP-1-клеток в концентрации 100 мкМ. Ингибирование не зависело от того, сделана ли указанная добавка один раз или 2 раза по 50 мкМ (рис. 6, а). Влияние донора NO на ферроптоз THP-1-клеток показано также с помощью LIVE/DEAD-теста (см. рис. 3). Присутствие в среде 100 мкМ DPTA полностью ингибирует ферроптоз даже при максимальной концентрации RSL3 (2,5 мкМ): на снимках нет клеток, в которые проникал пропидий иодид.

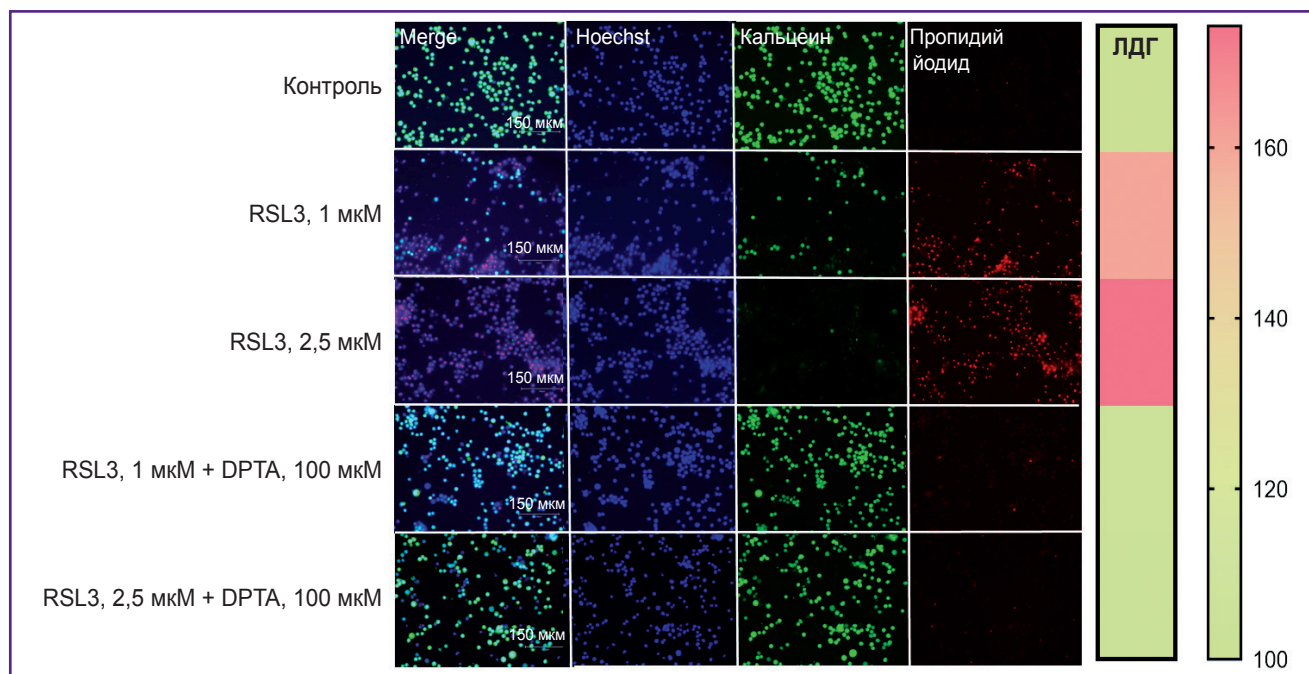


Рис. 3. Микрофотографии THP-1 после добавок реагентов LIVE/DEAD-теста, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS M5000 (20×)

Зеленый канал — кальцеин (Ex — 488 нм), красный канал — пропидий йодид (Ex — 561 нм), синий канал — Hoechst (Ex — 405 нм). После 17 ч культивирования клеток с индуктором ферроптоза к ним была добавлена смесь красителей LIVE/DEAD-теста и 1 мкМ Hoechst (окраска ядер). Через 30 мин инкубации были получены снимки клеток: соответствующие добавки в лунки указаны возле снимков. Справа приведены результаты измерения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в пробах (отн. ед.)

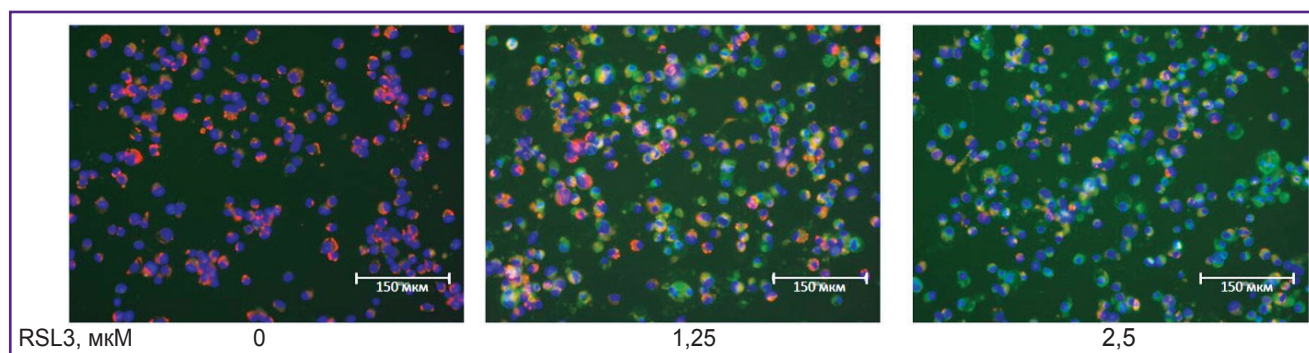


Рис. 4. Визуализация окисления липидов THP-1-макрофагов, обработанных разными концентрациями RSL3, с помощью маркера окисления липидов BODIPY C11

Инкубация 17 ч, 20×. Флуоресценцию BODIPY регистрировали в красной области после возбуждения при 561 нм, в зеленой области — при возбуждении 488 нм; для окраски ядер использовали 1 мкг/мл Hoechst

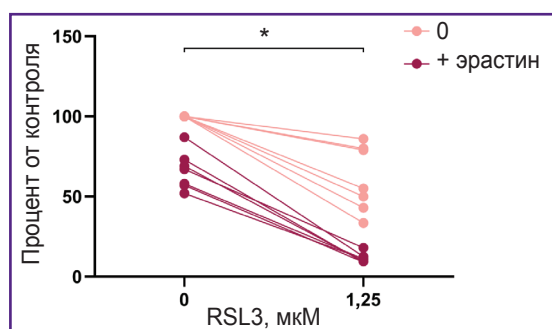


Рис. 5. Сравнение количества живых THP-1-макрофагов (процент от контроля), инкубированных с RSL3 или с RSL3 + эрастин

Концентрации реагентов: 1,25 мкМ RSL3 и 10 мкМ эрастин; * $p < 0,0001$

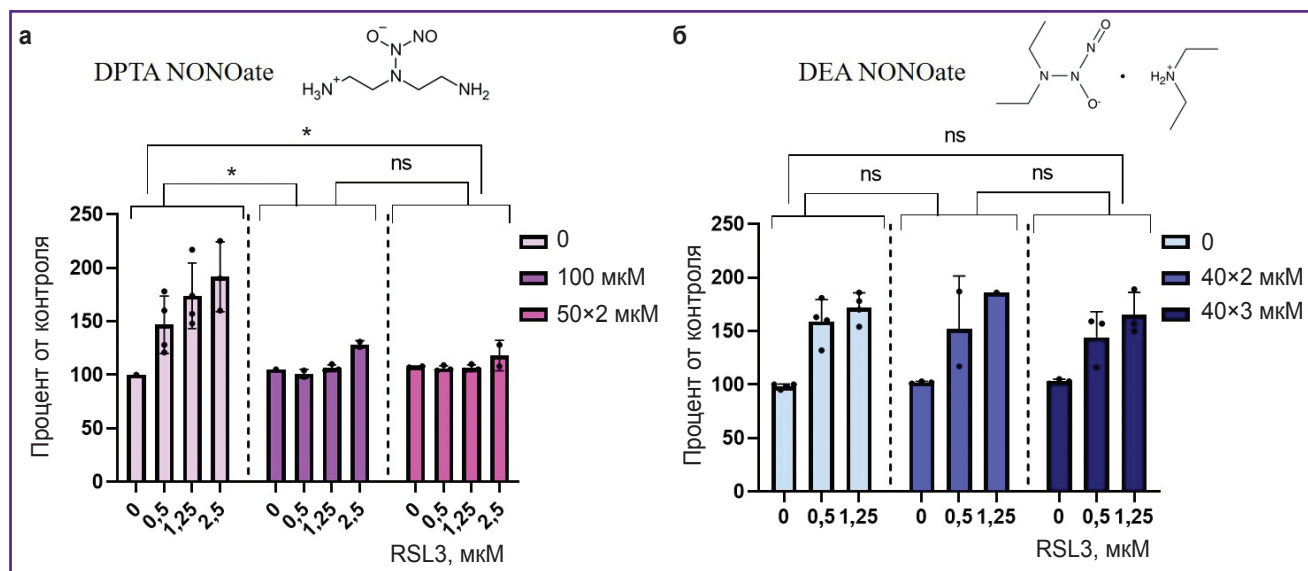


Рис. 6. Концентрация лактатдегидрогеназы в среде THP-1-макрофагов, обработанных индуктором ферроптоза (RSL3) и донорами NO с разным временем полураспада
 а — DPTA NONOate в концентрации 100 мкМ (добавлено однократно после индуктора) и 50 мкМ (добавки сделаны два раза: после индуктора и через 4 ч); б — DEA NONOate добавляли несколько раз по 40 мкМ с интервалом 3 ч. Инкубация 17–19 ч. Вставки — химические формулы доноров NO. * $p < 0,0001$; $^{ns} p > 0,05$

В экспериментах был также использован донор DEA NONOate. Добавки донора делали после индуктора ферроптоза 2–3 раза по 40 мкМ с интервалом 3 ч. DEA NONOate не влиял на развитие ферроптоза ни при какой концентрации индуктора (рис. 6, б).

Обсуждение

Ферроптоз — это неапоптотический процесс гибели клеток, фундаментальным звеном которого является Fe-зависимое накопление гидроперекисей липидов. Ферроптотическая гибель клеток лежит в основе ряда заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, поражения печени и сердца при ишемии–реоксигенации и др. [5, 25]. В связи с этим поиск ингибиторов ферроптоза представляется важной задачей, решение которой поможет в терапии ферроптоз-зависимых патологий [16, 26].

Ферроптотическая форма клеточной гибели показана для многих типов клеток, однако для макрофагов человека эта форма гибели изучена мало. Исследования выполнены в основном для макрофагов мышей [9, 20]. В настоящей работе мы использовали THP-1-макрофаги как модель макрофагов человека [27]. Ферроптоз THP-1-макрофагов — медленный процесс, он начинается развиваться через ~5 ч после добавки индукторов RSL3 или ML-162. Степень развития ферроптоза зависит от дозы добавленного индуктора и достигает максимума через 17–19 ч после инициации программы смерти (см. рис. 1). Развитие ферроптоза характеризовали тремя независимыми методами: измерение ЛДГ в

кондиционированной среде клеток, восстановление аламарового синего до резорфина живыми клетками и стандартный LIVE-DEAD-тест с кальцеином AM и пропидий иодидом (см. рис. 2, 3). Результаты разных методов хорошо совпадали, но наиболее простым и достоверным является измерение ЛДГ. Специфический ингибитор ферроптоза Fer-1 полностью ингибирует действие индукторов ферроптоза в концентрации 5 мкМ. Дополнительно доказательство ферроптотической формы гибели клеток было получено с помощью флуоресцентного маркера окисления липидов BODIPY C11. В мембране клеток BODIPY флуоресцирует в красной области, но если проходит массовое окисление липидов, липидные радикалы окисляются BODIPY, что сопровождается сдвигом флуоресценции в зеленую область в клетках, обработанных индуктором ферроптоза. Количество клеток, несущих на себе маркер с зеленой окраской, зависело от дозы индуктора, добавленного в среду инкубации (см. рис. 4).

Результаты для двух индукторов ферроптоза — RSL3 и ML-162, которые являются ингибиторами GPX4, не отличались; индукция ферроптоза THP-1-клеток наблюдалась уже при концентрации реагентов 0,5 мкМ. Ингибитор цистин-глутаматного обмена эрастин, который уменьшает концентрацию GSH в клетках, является слабым индуктором ферроптоза в случае THP-1-макрофагов, в отличие от ингибиторов GPX4. Это также было показано ранее для макрофагов RAW 264.7 [20]. Гибель клеток при добавлении 10 мкМ эрастина составляла $23 \pm 11\%$ от контроля. Однако одновременное добавление двух

типов индукторов приводило к усилению ферроптоза. Эффект не являлся аддитивным (см. рис. 5).

Ранее было показано, что устойчивость к ферроптозу провоспалительных макрофагов M1 RAW 264.7 обусловлена экспрессией индуцибельной iNOS и, соответственно, продукцией NO [20]. Оксид азота может быть добавлен к клеткам в виде доноров NO — веществ, которые высвобождают газообразный NO при попадании в среду с pH=7,4. Авторы использовали доноры NO с большим временем полураспада — DPTA (3 ч при 37°C) и Diethylenetriamine NONOate (20 ч при 37°C), тогда как время развития ферроптоза составляло 5 ч. Добавление доноров NO к мышинным макрофагам увеличивало их устойчивость к ферроптозу. Поскольку макрофаги человека продуцируют мало NO [28], мы поставили задачу изучить, как экзогенные доноры NO влияют на ферроптоз THP-1-макрофагов.

Мы сравнили эффекты доноров с разными временами полураспада при 37°C — с малым временем полураспада DEA NONOate (2 мин) и с относительно большим временем полураспада DPTA NONOate (3 ч). Доноры добавляли однократно после индуктора в концентрации 100 мкМ или несколько раз до достижения заданной концентрации. DEA NONOate не влиял на ферроптоз THP-1-макрофагов, тогда как DPTA полностью ингибировал ферроптоз как в случае однократной добавки, так и при добавлении 50 мкМ два раза. Быстрый распад DEA NONOate приводит к тому, что продуцируемый NO, видимо, не успевает попасть в клетки. Ферроптоз THP-1-макрофагов начинается только через ~5 ч после добавления индуктора. Тот факт, что однократная добавка DPTA (100 мкМ) в начале эксперимента полностью ингибировала ферроптоз, позволяет предположить, что механизм действия NO может быть следующим: оксид азота либо модифицирует белки-участники ферроптоза (например, взаимодействует с железом в активном центре липоксигеназы-15), либо входит в состав динитрозильных комплексов железа с последующим медленным высвобождением [29].

Заключение

Тремя независимыми методами анализа жизнеспособности клеток было показано, что ингибиторы GPX4 дозозависимо индуцируют клеточную гибель THP-1-макрофагов. Ингибирование смерти специфическим ингибитором Fer-1, а также детекция окисления липидов мембран клеток флуоресцентным маркером BODIPY C11 доказывают, что клетки погибают путем программируемой ферроптотической формы смерти. Одновременная обработка клеток индукторами ферроптоза с разным механизмом действия усиливает ферроптоз. В результате проведенного исследования показано, что NO, продуцируемый DPTA NONOate с периодом полураспада 3 ч, ингибирует ферроптоз в макрофагах, который развивается око-

ло 17–19 ч. Следовательно, существуют механизмы пролонгирования действия NO в клетках. Изучение механизмов ингибирования ферроптоза донорами NO имеет важное значение для дальнейшего использования этих соединений с целью регуляции ферроптоз-зависимых патологий.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №23-25-00497 (<https://rscf.ru/project/23-25-00497/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Dixon S.J., Olzmann J.A. The cell biology of ferroptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024; 25(6): 424–442, <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00703-5>.
2. Stockwell B.R., Friedmann Angeli J.P., Bayir H., Bush A.I., Conrad M., Dixon S.J., Fulda S., Gascón S., Hatzios S.K., Kagan V.E., Noel K., Jiang X., Linkermann A., Murphy M.E., Overholtzer M., Oyagi A., Pagnussat G.C., Park J., Ran Q., Rosenfeld C.S., Salnikow K., Tang D., Torti F.M., Torti S.V., Toyokuni S., Woerpel K.A., Zhang D.D. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell* 2017; 171(2): 273–285, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>.
3. Yang W.S., Stockwell B.R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol* 2016; 26(3): 165–176, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>.
4. Kagan V.E., Tyurina Y.Y., Vlasova I.I., Kapralov A.A., Amoscato A.A., Anthonymuthu T.S., Tyurin V.A., Shrivastava I.H., Cinemre F.B., Lamade A., Epperly M.W., Greenberger J.S., Beezhold D.H., Mallampalli R.K., Srivastava A.K., Bayir H., Shvedova A.A. Redox epiphospholipidome in programmed cell death signaling: catalytic mechanisms and regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; 11: 628079, <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.628079>.
5. Stockwell B.R., Jiang X., Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis. *Trends Cell Biol* 2020; 30(6): 478–490, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.009>.
6. Jiang X., Stockwell B.R., Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; 22(4): 266–282, <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>.
7. Bayir H., Dixon S.J., Tyurina Y.Y., Kellum J.A., Kagan V.E. Ferroptotic mechanisms and therapeutic targeting of iron metabolism and lipid peroxidation in the kidney. *Nat Rev Nephrol* 2023; 19(5): 315–336, <https://doi.org/10.1038/s41581-023-00689-x>.
8. Toppo S., Flohé L., Ursini F., Vanin S., Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790(11): 1486–1500, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.007>.
9. Yang Y., Wang Y., Guo L., Gao W., Tang T.L., Yan M. Interaction between macrophages and ferroptosis. *Cell Death Dis* 2022; 13(4): 355, <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04775-z>.
10. Klyucherev T.O., Peshkova M.A., Revokatova D.P.,

Serejnikova N.B., Fayzullina N.M., Fayzullin A.L., Ershov B.P., Khristidis Y.I., Vlasova I.I., Kosheleva N.V., Svistunov A.A., Timashev P.S. The therapeutic potential of exosomes vs. matrix-bound nanovesicles from human umbilical cord mesenchymal stromal cells in osteoarthritis treatment. *Int J Mol Sci* 2024; 25(21): 11564, <https://doi.org/10.3390/ijms252111564>.

11. Suleimanov S.K., Efremov Y.M., Klyucherev T.O., Salimov E.L., Ragimov A.A., Timashev P.S., Vlasova I.I. Radical-generating activity, phagocytosis, and mechanical properties of four phenotypes of human macrophages. *Int J Mol Sci* 2024; 25(3): 1860, <https://doi.org/10.3390/ijms25031860>.

12. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K., Dockrell D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 2010; 5(1): e8668, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>.

13. Balon K., Wiatrak B. PC12 and THP-1 cell lines as neuronal and microglia model in neurobiological research. *Appl Sci* 2021; 11(9): 3729. <https://doi.org/10.3390/app11093729>.

14. Liang Y., Xu X.D., Xu X., Cai Y.B., Zhu Z.X., Zhu L., Ren K. Linc00657 promoted pyroptosis in THP-1-derived macrophages and exacerbated atherosclerosis via the miR-106b-5p/TXNIP/NLRP3 axis. *Int J Biol Macromol* 2023; 253(Pt 4): 126953, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126953>.

15. Rossi Á.D., Higa L.M., Herlinger A.L., Ribeiro-Alves M., de Menezes M.T., Giannini A.L.M., Cardoso C.C., Da Poian A.T., Tanuri A., Aguiar R.S. Differential expression of human microRNAs during dengue virus infection in THP-1 monocytes. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11: 714088, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.714088>.

16. Yi Z.H., Li S.Q., Ke J.Y., Wang Y., Zhao M.Z., Li J., Li M.Q., Zhu Z.L. Baicalein relieves ferroptosis-mediated phagocytosis inhibition of macrophages in ovarian endometriosis. *Curr Issues Mol Biol* 2022; 44(12): 6189–6204, <https://doi.org/10.3390/cimb44120422>.

17. Hadian K. Ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) and coenzyme Q10 cooperatively suppress ferroptosis. *Biochemistry* 2020; 59(5): 637–638, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00030>.

18. Sun X., Ou Z., Chen R., Niu X., Chen D., Kang R., Tang D. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2016; 63(1): 173–184, <https://doi.org/10.1002/hep.28251>.

19. Shah R., Margison K., Pratt D.A. The potency of diarylamine radical-trapping antioxidants as inhibitors of ferroptosis underscores the role of autoxidation in the mechanism of cell death. *ACS Chem Biol* 2017; 12(10): 2538–2545, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00730>.

20. Kapralov A.A., Yang Q., Dar H.H., Tyurina Y.Y., Anthony-muthu T.S., Kim R., St Croix C.M., Mikulska-

Ruminska K., Liu B., Shrivastava I.H., Tyurin V.A., Ting H.C., Wu Y.L., Gao Y., Shurin G.V., Artyukhova M.A., Ponomareva L.A., Timashev P.S., Domingues R.M., Stoyanovsky D.A., Greenberger J.S., Mallampalli R.K., Bahar I., Gabrilovich D.I., Bayir H., Kagan V.E. Redox lipid reprogramming commands susceptibility of macrophages and microglia to ferroptotic death. *Nat Chem Biol* 2020; 16(3): 278–290, <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0462-8>.

21. Dar H.H., Anthony-muthu T.S., Ponomareva L.A., Souryavong A.B., Shurin G.V., Kapralov A.O., Tyurin V.A., Lee J.S., Mallampalli R.K., Wenzel S.E., Bayir H., Kagan V.E. A new thiol-independent mechanism of epithelial host defense against *Pseudomonas aeruginosa*: iNOS/NO[•] sabotage of theft-ferroptosis. *Redox Biol* 2021; 45: 102045, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102045>.

22. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004; 75(6): 639–653, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>.

23. Korhonen R., Lahti A., Kankaanranta H., Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4(4): 471–479, <https://doi.org/10.2174/1568010054526359>.

24. Schairer D.O., Chouake J.S., Nosanchuk J.D., Friedman A.J. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence* 2012; 3(3): 271–279, <https://doi.org/10.4161/viru.20328>.

25. Martin-Sanchez D., Ruiz-Andres O., Poveda J., Carrasco S., Cannata-Ortiz P., Sanchez-Niño M.D., Ruiz Ortega M., Egido J., Linkermann A., Ortiz A., Sanz A.B. Ferroptosis, but not necroptosis, is important in nephrotoxic folic acid-induced AKI. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(1): 218–229, <https://doi.org/10.1681/ASN.2015121376>.

26. Zhang Y., Sun C., Zhao C., Hao J., Zhang Y., Fan B., Li B., Duan H., Liu C., Kong X., Wu P., Yao X., Feng S. Ferroptosis inhibitor SRS 16-86 attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury. *Brain Res* 2019; 1706: 48–57, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.10.023>.

27. Hoppenbrouwers T., Bastiaan-Net S., Garssen J., Pellegrini N., Willemsen L.E.M., Wichers H.J. Functional differences between primary monocyte-derived and THP-1 macrophages and their response to LCPUFAs. *PharmaNutrition* 2022; 22: 100322, <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100322>.

28. Schneemann M., Schoeden G. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *J Leukoc Biol* 2007; 81(3): 579; discussion 580, <https://doi.org/10.1189/jlb.1106702>. Erratum in: *J Leukoc Biol* 2007; 81(5): 1334, <https://doi.org/10.1189/jlb.81.5.1334>.

29. Shumaev K.B., Dudylina A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. Dinitrosyl iron complexes: formation and antiradical action in heart mitochondria. *Biofactors* 2018; 44(3): 237–244, <https://doi.org/10.1002/biof.1418>.