

## ФТОРХИНОЛОН-ИНДУЦИРОВАННОЕ ИСТОЩЕНИЕ NAD<sup>+</sup> КАК НОВЫЙ МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

И.В. Кузьминов\*, Д.И. Бояринцев, К.В. Брютова, А.В. Мельник, Ю.С. Родина

Тюменский государственный медицинский университет, 625023, Тюмень, ул. Одесская, 54; \*e-mail: kowendi3@gmail.com

Обнаружен новый потенциальный механизм цитотоксического и противоопухолевого эффекта фторхинолонов. По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии добавление к клеточной линии HCT-116wt соединений этой группы (норфлоксацина, цiproфлоксацина и офлоксацина) снижает выживаемость клеток и уровень NAD<sup>+</sup> в них. Значения IC<sub>50</sub> для эффекта на этот параметр составили 0.314 мМ (для норфлоксацина), 0.547 мМ (для цiproфлоксацина) и 0.612 мМ (для офлоксацина). По данным МТТ-теста исследования цитотоксичности и функционального состояния митохондрий клетки значения полумаксимальной ингибирующей концентрации составили 0.32 мМ (для норфлоксацина), 0.35 мМ (для цiproфлоксацина), 0.67 мМ (для офлоксацина). Результаты раскрывают новый потенциальный механизм цитотоксичности фторхинолонов на клетки за пределами их антимикробной активности.

**Ключевые слова:** фторхинолоны; механизм токсичности; энергетический метаболизм; метаболизм NAD<sup>+</sup>

DOI: 10.18097/BMCRM00294

### ВВЕДЕНИЕ

Фторхинолоны являются обширно используемыми антимикробными препаратами со сравнительно широким спектром действия, но их применение зачастую ограничивается серьезными побочными эффектами, оказывающими влияние почти на все системы организма [1]. Изучение механизмов развития побочных эффектов позволит при дальнейших исследованиях направленно изменять структуру соединений, что может привести к снижению выраженности нежелательных реакций без потери эффективности препаратов [2]. Поскольку проявление побочных эффектов затрагивает многие системы органов и тканей, в нашей работе мы сфокусировались на основном коферменте, который принимает участие в большинстве метаболических реакций- NAD<sup>+</sup>. Опираясь на информацию о противораковом потенциале фторхинолонов [3, 4], мы решили исследовать NAD<sup>+</sup> в контексте потенциальной мишени, при воздействии на которую может развиваться цитотоксический эффект данных соединений.

Фторхинолоны и их химически модифицированные молекулы активно изучаются в роли противоопухолевых агентов. На сегодняшний день основной механизм противоопухолевого действия позиционируется как остановка клеточного цикла на S или G<sub>2</sub>/M фазах [5]. Из других механизмов, можно отметить снижение активности миграции и инвазии опухолевых клеток за счет понижения активности матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типа [6, 7]. Отмечено, что фторхинолоны могут вызывать индукцию апоптоза, за счет активации ряда каспаз и белка BAX, более подробно о перечисленных механизмах противоопухолевого действия фторхинолонов и их дериватов описано в обзоре Asmaa E. Kassab [8].

### МЕТОДИКА

#### Определение выживаемости клеток

Клеточная линия HCT-116wt (рак толстой кишки, *Homo sapiens*) была предоставлена лабораторией молекулярной онкобиологии Научно-исследовательского института биологии гена РАН (Москва). Клетки культивировали в среде DMEM (“BioinnLabs”, Россия) с добавлением 10% (об/об) эмбриональной бычьей сыворотки (“Globe Kang”, Китай) и готовой смеси антибиотиков, содержащей пенициллин, стрептомицин и антимикотик – амфотерицин В (“BioinnLabs”). Клетки высаживали в количестве 20×10<sup>3</sup> клеток на лунку в 48-луночные планшеты (“Biologix”, Германия). Посадку клеток осуществляли на всю поверхность планшета за исключением крайних лунок, в которые был внесен фосфатный буферный раствор (PBS) (“BioinnLabs”), для дополнительного поддержания влажности, чтобы не допустить испарение сред и изменение объема среды в лунке, и как следствие, увеличение концентрации препарата. Клетки культивировали при стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Стандарты фторхинолонов, с чистотой 98%, цiproфлоксацин (IUPAC: 1-циклопропил-6-фтор-4-оксо-7-пиперазин-1-ил-хинолин-3-карбоновая кислота, молярная масса: 331.341 г/моль) (CIP), офлоксацин (IUPAC: (±)-9-Фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7Н-пиридо[1,2,3,-de]-1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота, молярная масса: 361.368г/моль) (OFL) и норфлоксацин (IUPAC: 1-этил-6-фтор-1,4-дигидро-4-оксо-7-(1-пиперазинил)-3-хинолинкарбоновая кислота, молярная масса: 319.331г/моль) (NOR) были приобретены у “Maclin” (Китай). Приготовление стоковых десятикратных растворов



осуществляли растворением навески, соответствующей 10 мМ вещества, в 250 мкл 0.5 М HCL (“Рехим”, Россия), затем при помощи стерильного PBS доводили объем до 10 мл. Для улучшения растворимости, пробирки помещали на 10 мин в ультразвуковую ванну.

Концентрации стока препарата готовили серийными двукратными разведениями с учетом 10-кратного разведения в конечном объеме (50 мкл стока и 450 мкл среды). Сам препарат вносили на следующий день после посадки клеток для обеспечения достаточного прикрепления клеток к поверхности планшета. Рабочие концентрации препарата составили 1 мМ, 0.5 мМ, 0.25 мМ, 0.125 мМ, 0.0625 мМ. В лунки контроля был добавлен стерильный PBS с добавлением 0.5 М HCl в той же концентрации, что и в пробах (критического изменения цвета среды отмечено не было). После внесения препарата начинался отсчет времени, общее время ко-инкубирования составило 72 ч.

По истечении времени среду от клеток отделяли аспирацией и в каждую лунку вносили по 100 мкл 0.25% раствора трипсина с ЭДТА в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS) (“BioinnLabs”). Диссоциацию клеток трипсином производили на протяжении 10 мин для полноценного отделения клеток от поверхности, степень диссоциации оценивали визуально при помощи микроскопии. Из каждой лунки тщательно отбиралась вся суспензия клеток в трипсине, и помещалась в эппендорф, где трипсин инактивировали добавлением равного объема полной среды. Клетки осаждали на высокоскоростной центрифуге MC-15 pro (“Joanlab”, Китай) при 822 g, после чего надосадочную жидкость, не задевая осадок клеток, аккуратно удаляли, и добавляли 100 мкл полной питательной среды. Для определения выживаемости производили подсчет клеток с окрашиванием 0.4% трипановым синим (“BioinnLabs”). Перед подсчетом осадок клеток тщательно ресуспендировали при помощи вортекс-центрифуги TL-24 (“BioinnLabs”) и пипетирования перед отбором пробы. Окраску клеток производили смешиванием 10 мкл клеточной суспензии и 10 мкл раствора красителя после 3 мин инкубации при комнатной температуре. Клетки вносили в камеру Горяева, подсчитывали только неокрашенные клетки в 25 больших квадратах. Для каждой концентрации и контроля в эксперименте проводили 3 подсчета и получения среднего числа живых клеток в пробе.

#### MTT тест

Для подтверждения влияния фторхинолонов на клеточный метаболизм через истощение запасов NAD(H) был проведен MTT тест. Данный тест основан на превращении красителя тиазолила синего тетразолия бромид (чистота >99%, “Maclin”) (IUPAC: 3-(4,5-диметилтиазол -2-ил)-2,5- дифенилтетразолия бромид), в окрашенный продукт-формазан под влиянием NAD(H)-оксидоредуктаз. Для исследования клетки линии НСТ-116wt высевали в 96-луночный планшет (“Biologix”, Германия) в количестве 5000 клеток на лунку, условия культивирования поддерживали стандартными, а именно: питательная среда DMEM (“BioinnLabs”) с добавлением 10% (об/об) эмбриональной бычьей сыворотки (“Globe

Kang”, Китай) и смеси антибиотиков, содержащей пенициллин, стрептомицин и антимикотик- амфотерицин В (“BioinnLabs”), клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В каждой лунке содержалось 180 мкл питательной среды и 20 мкл исследуемого препарата (10x разведение). После посева, клеткам давали 24 ч на прикрепления и восстановление их нормальной эпителиальной морфологии. По истечении этого времени вносили растворы антибиотиков от максимальной концентрации 1 мМ до минимальной 3.906 мкМ (девять двукратных разведений). В контрольные лунки добавляли эквивалентный объем подкисленного 0.5 М HCl PBS (“BioinnLabs”), использованного в качестве растворителя для фторхинолонов. Совместное инкубирование препаратов с клетками проводили в соответствии со стандартным протоколом в течение 48 ч. По истечении времени инкубирования к клеткам добавляли 20 мкл растворенного в PBS красителя MTT в концентрации 5 мг/мл. Для образования формазана клетки выдерживали 3 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего среду аспирировали и проводили экстракцию формазана при помощи 100 мкл DMSO чистотой > 99.7% производства “Maclin” (Китай). Оптическую плотность определяли при помощи считывателя планшетов FlexA-200 (“Allsheng”, Китай) при длине волны 590 нм.

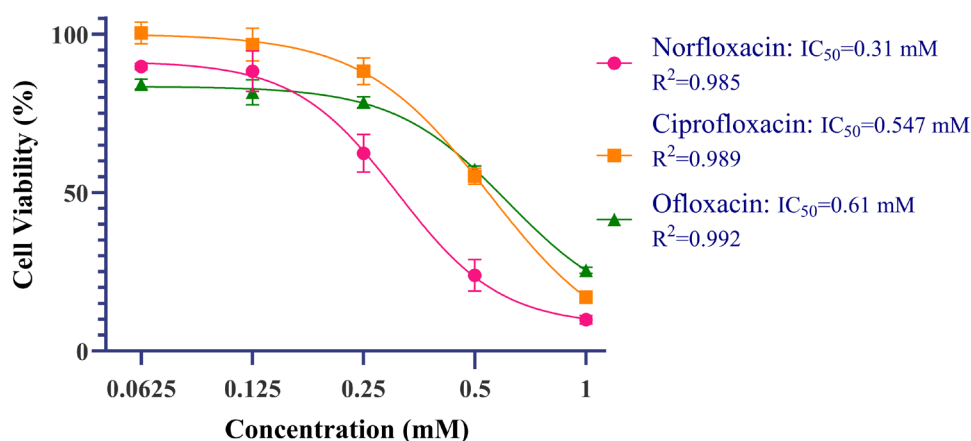
#### Экстракция NAD<sup>+</sup>

Полученные в ходе исследования выживаемости клетки снова осаждали центрифугированием при тех же условиях что и в ходе проведения теста. Для экстракции NAD<sup>+</sup> был применен метод описанный в работе [9], с частичными изменениями. К клеточному осадку, который предварительно промывали холодным PBS от остатков среды, добавляли 50 мкл 10% HClO<sub>4</sub> (“Рехим”) и тщательно ресуспендировали дозатором, после чего помещали на лед на 15 мин. Затем экстракт центрифугировали при 13148 g в течение 5 мин, а полученный супернатант отбирали для дальнейшего анализа. Для удаления хлорной кислоты пробы нагревали на водяной бане при 70 °C. Полученный сухой осадок растворяли в 50 мкл элюента. Для удаления не растворившихся соединений из экстракта, анализ содержащий NAD<sup>+</sup> центрифугировали при 13148 g в течение 5 мин. Анализ концентраций NAD<sup>+</sup> проводили при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа Милюхром-А02 (“ЭкоНова”, Россия). Данный метод предназначен для определения именно окисленной формы NAD<sup>+</sup>, поскольку обработка образцов 10% HClO<sub>4</sub> с последующим нагреванием обеспечивает полное окисление восстановленной формы NAD(H) до NAD<sup>+</sup>. Это позволяет оценивать общий пул окисленного кофермента в клеточных лизатах с предварительным переводом восстановленной формы в окисленную.

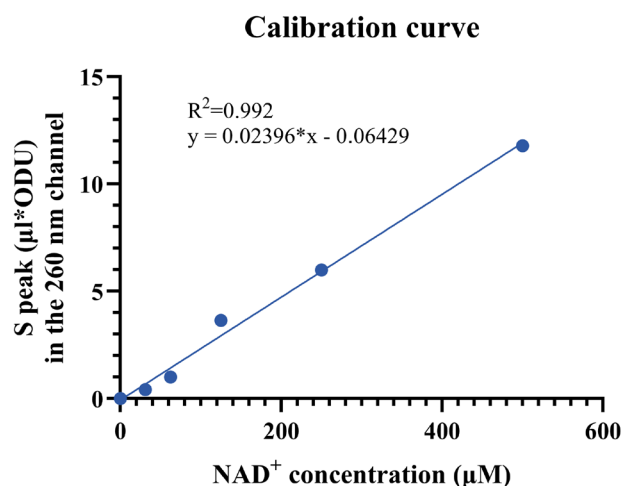
#### Хроматографический анализ NAD<sup>+</sup>

Для анализа внутриклеточной концентрации NAD<sup>+</sup> использовали хроматографическую колонку с обращенной фазой ProntoSil-120-5-C18 AQ («ЭкоНова») (d колонки – 2 мм, длина колонки – 75 мм, размер пор – 5 мкм). Подвижная фаза состояла из PBS: MeOH (90:10), pH элюента – 7.4, скорость потока – 200 мкл/мин, объем на 1 анализ – 1000 мкл (общее время анализа 5 мин); на колонку наносили по 10 мкл исследуемого образца. Калибровку осуществляли

### Viable cell count by Trypan Blue

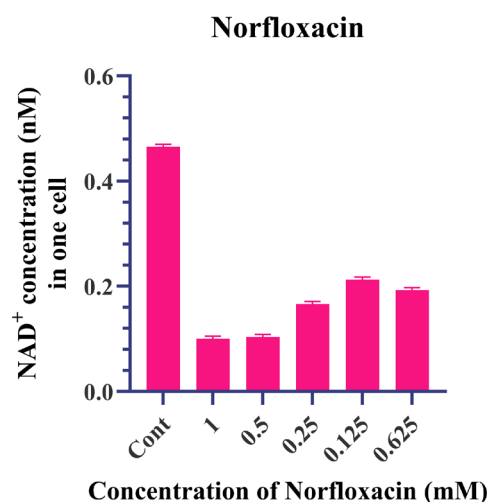


**Рисунок 1.** Кривые выживаемости клеток НСТ-116wt при добавлении норфлоксацина, ципрофлоксацина и офлоксацина. По оси абсцисс представлена концентрация фторхинолонов в мМ, по оси ординат представлен % выживших от контроля клеток при подсчете с трипановым синим,  $R^2$  – коэффициент детерминации.



**Рисунок 2** Калибровочный график для анализа концентрации  $NAD^+$  в клеточных лизатах, по оси X представлены концентрации  $NAD^+$  (диапазон концентраций 500 мкМ, 250 мкМ, 125 мкМ, 62.5 мкМ, 31.25 мкМ), по оси Y – площадь пика в мкл×единицы оптической плотности (е.о.п) при длине волны УФ детектора 260 нм. На графике также представлено уравнение калибровочного графика и коэффициент корреляции ( $R^2$ ).

растворам стандартного  $NAD(H)-Na_2$  с чистотой 93% производства “Servicebio” (Китай), диапазон калибровки 500 – 31.25 мкМ. Растворы стандарта были приготовлены в элюенте, с предварительной обработкой эквивалентным количеством 10%  $HClO_4$ , которую использовали для экстракции данного кофермента из клеток. Детектирование проводили при помощи диодно-матричного детектора при длине волны 260 нм. Температуру термостата колонки поддерживали на уровне 40°C на протяжении всех анализов. Обработку хроматограм осуществляли с использованием программы Альфа-спектр (версия 1.2) Анализ клеточных лизатов осуществляли при тех же условиях, что и при калибровке. Расчет концентрации  $NAD^+$  в пробе осуществляли, используя наклон полученной калибровочной кривой.



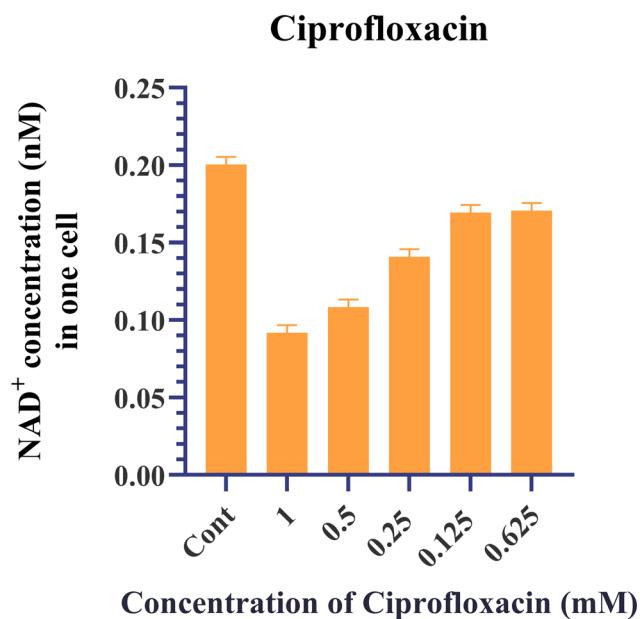
**Рисунок 3.** Влияние норфлоксацина на внутриклеточный уровень  $NAD^+$  в клетках НСТ-116wt. Данные представлены как среднее  $\pm$  SD. По оси абсцисс - концентрация норфлоксацина в пробе (мМ), по оси ординат концентрация  $NAD^+$  в одной клетке (нМ). На графике показана обратная зависимость между концентрацией норфлоксацина и внутриклеточным уровнем  $NAD^+$ .

#### Статистическая обработка и визуализация данных

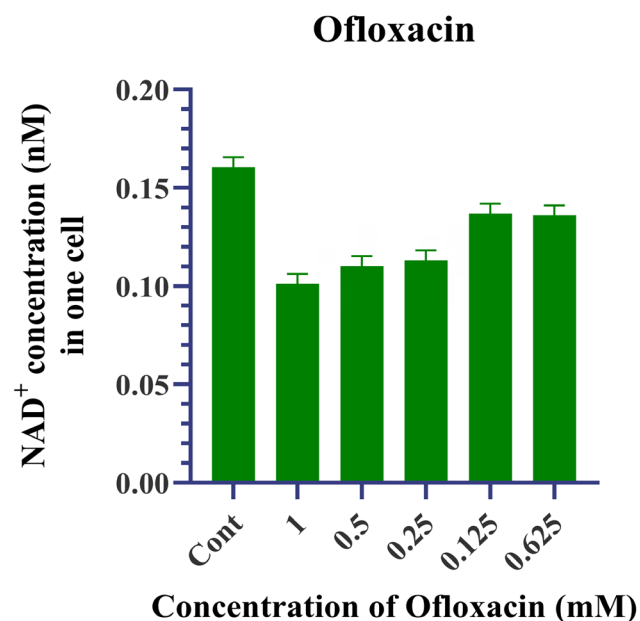
Статистическую обработку и визуализацию данных проводили в программе GraphPad Prism v.10.5.0 (GraphPad Software Inc., США), для построения кривых выживаемости клеток и МТТ теста была применена четырехпараметрическая логистическая регрессия. Полученные данные были представлены в виде среднего значения (mean)  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ , нормальное распределение оценивали, используя критерий Пирсона.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

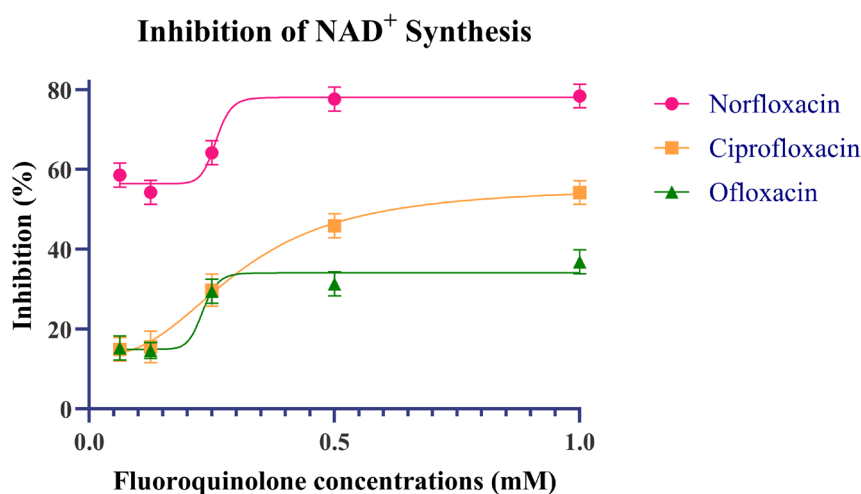
Клетки линии НСТ-116 показали высокую устойчивость к антибиотикам группы фторхинолонов



**Рисунок 4** Влияние ципрофлоксацина на внутриклеточный уровень NAD<sup>+</sup> в клетках HCT-116wt. Данные представлены как среднее ± SD. По оси абсцисс - концентрация ципрофлоксацина в пробе (мМ), по оси ординат - концентрация NAD<sup>+</sup> в одной клетке (нМ). На графике показана обратная зависимость между концентрацией ципрофлоксацина и внутриклеточным уровнем NAD<sup>+</sup>.



**Рисунок 5** Влияние офлоксацина на внутриклеточный уровень NAD<sup>+</sup> в клетках HCT-116wt. Данные представлены как среднее ± SD. По оси абсцисс - концентрация офлоксацина в пробе (мМ), по оси ординат концентрация NAD<sup>+</sup> в одной клетке (нМ). На графике показана обратная зависимость между концентрацией офлоксацина и внутриклеточным уровнем NAD<sup>+</sup>.

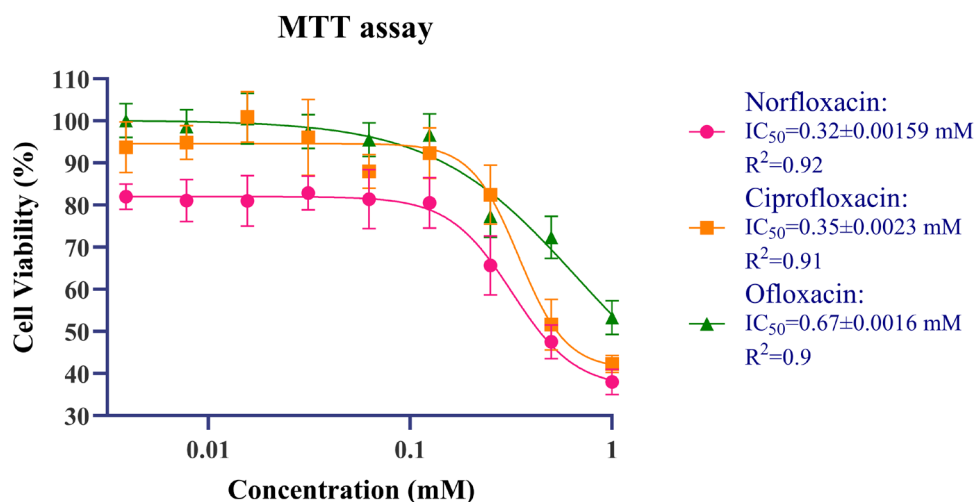


**Рисунок 6.** Влияние норфлоксацина, ципрофлоксацина и офлоксацина на ингибирование образования NAD<sup>+</sup> в клетках HCT-116wt. Данные представлены как среднее ± SD. По оси абсцисс - концентрация фторхинолонов в пробе (мМ), по оси ординат - ингибирование образования NAD<sup>+</sup>(%).

второго поколения. Если рассматривать результаты с точки зрения противоопухолевой активности, где точкой, выше которой заявляется об отсутствии активности у препарата является 50 мкМ, то можно с уверенностью сказать, что противоопухолевой активностью *in vitro*, рассмотренные нами препараты не обладают. Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC<sub>50</sub>) составила 0.314 мМ для NOR, 0.547 мМ для CIP и 0.612 мМ для OFL. Норфлоксацин показал наибольшее подавление роста клеточной линии и по результатам микроскопии (данные не представлены). Для сравнения, клетки, проинкубированные с максимальной концентрацией фторхинолонов (1 мМ) NOR, через 72 ч

были слабо прикреплены к поверхности планшета, у других антибиотиков, такого эффекта отмечено не было, клетки были прикреплены к поверхности и распластаны, что говорит об антипролиферативном эффекте фторхинолонов.

Для анализа внутриклеточного NAD<sup>+</sup> производили предварительную калибровку по стандарту NAD(H)-Na<sub>2</sub>. По результатам калибровки был получен график, на основании наклона которого была вычислена концентрация NAD<sup>+</sup> в анализируемых пробах. При сравнении времени удержания в колонке обработанные HClO<sub>4</sub> стандарты NAD<sup>+</sup> и NAD(H)-Na<sub>2</sub> показали одинаковые значения. Последнее позволяет сделать вывод о невозможности разделения окисленной и



**Рисунок 7.** Влияние норфлоксацина, ципрофлоксацина и офлоксацина на жизнеспособность клеток в МТТ-тесте.

восстановленной формы в данных условиях, поскольку, как указывалось ранее, при обработке кислотой и нагревании восстановленная форма NAD(H) переходит в окисленную NAD<sup>+</sup>. В связи с этим для построения калибровочного графика мы остановились на стандарте NAD(H)-Na<sub>2</sub>, так как он обладал наибольшей хроматографической чистотой по сравнению со стандартом NAD<sup>+</sup>. Поскольку предварительная обработка образцов обеспечивала полное окисление, полученные значения интерпретировали как концентрации NAD<sup>+</sup>.

После подсчета и лизиса клеток, производился анализ NAD<sup>+</sup>, для соблюдения пропорциональности, концентрация данного кофермента в пробе, пересчитывалась на 1 клетку. Для этого, полученную концентрацию NAD<sup>+</sup> делили на количество лизированных клеток; тем самым мы оценивали зависимость влияния концентрации различных фторхинолонов на уровень NAD<sup>+</sup> в клетке. По результатам данной оценки нам удалось выявить связь между цитотоксичностью и снижением уровня NAD<sup>+</sup> в 1 клетке. Наибольшее влияние на уровень NAD<sup>+</sup> оказывал антибиотик норфлоксацин, наименьшее – офлоксацин. Результаты представлены на диаграммах на рисунках 3-5.

Как можно заметить, на высоких концентрациях фторхинолонов, NOR показывает наибольшее снижения NAD<sup>+</sup>, далее в порядке уменьшения идет CIP и OFL. Такая зависимость хорошо отражается и на показателях выживаемости клеток, что позволяет сделать выводы о возможной взаимосвязи цитотоксического эффекта и снижения NAD<sup>+</sup>.

Для дополнительного подтверждения нарушения функционирования митохондриальных NAD(H)-оксидоредуктаз, ввиду блокировки синтеза и истощения запасов NAD<sup>+</sup> и NAD(H) соответственно, был проведен МТТ тест, результаты которого соотносятся с результатами исследования по выживаемости клеток, где подсчет производили при помощи трипанового синего, и получены значения IC<sub>50</sub> для всех фторхинолонов принимавших участие в исследовании на клеточной линии НСТ-116wt. Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации составили: норфлоксацин 0.32±0.00159 мМ, ципрофлоксацин 0.35±0.0023 мМ, офлоксацин 0.67±0.0016 мМ

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам данной работы, нами впервые была определена полумаксимальная ингибирующая концентрация фторхинолонов второго поколения *in vitro* в тесте с подсчетом клеток с трипановым синим, которая составила 314 мкМ для норфлоксацина, 547 мкМ для ципрофлоксацина и 612 мкМ для офлоксацина, а также подтверждена связь с тестом функционального состояния митохондрий – МТТ – значения IC<sub>50</sub> составили 320 мкМ для норфлоксацина, 350 мкМ для ципрофлоксацина и 670 мкМ для офлоксацина. По результатам проведенных исследований мы склонны предполагать, что влияние антибиотиков группы фторхинолонов, обеспечивает их токсический потенциал, в том числе, и из-за влияния на уровень NAD<sup>+</sup> в клетках.

Противоопухолевый эффект в отношении линии рака толстой кишки (НСТ-116wt), весьма неоднозначен, мы увидели значительное снижение выживаемости клеток в нашем эксперименте, но концентрация препаратов была весьма велика для утверждения о возможном позиционировании данных фторхинолонов как потенциальных противоопухолевых соединений в отношении клеток этой линии.

При интерпретации полученных значений IC<sub>50</sub> на фармакокинетику для данных антибиотиков можно заметить, что пиковые значения концентраций изучаемых фторхинолонов в крови составляют в среднем: 2.5-3.3 мг/л (7.55-9.96 мкМ) для ципрофлоксацина, 2.2-4.5 мг/л (6.1-12.45 мкМ) для офлоксацина и 1.3 мг/л (4.1 мкМ) для норфлоксацина [10], что значительно меньше полученных в данном исследовании IC<sub>50</sub>. Несмотря на это, стоит отметить, что выдвигаемая нами гипотеза о потенциальном возникновении побочных эффектов ввиду истощения NAD<sup>+</sup> не позиционируется как системное действие, а лишь потенциальный эффект на метаболизм клетки, который может быть вызван данными соединениями. Фторхинолоны хорошо проникают в клетки, такие как фибробласты, макрофаги, нейтрофилы, эпителиальные клетки, поэтому эффект может быть вызван не системным воздействием, а локальным нарушением метаболических каскадов в различных типах клеток и тканей, где могут накапливаться данные

антибиотики при повышенных дозировках или длительном приеме [11].

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность за предоставление клеточной линии, заведующему лабораторией молекулярной онкобиологии ИБГ РАН Татарскому Виктору Вячеславовичу.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование не имело внешних источников финансирования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Baggio, D., Ananda-Rajah, M. R.* (2021) Fluoroquinolone antibiotics and adverse events. *Australian Prescriber*, **44**(5), 161–164. DOI:10.18773/austprescr.2021.035
2. *Hryhoriv, H., Kovalenko, S. M., Georgiyants, M., Sidorenko, L., Georgiyants, V.* (2023) A comprehensive review on chemical synthesis and chemotherapeutic

potential of 3-heteroaryl fluoroquinolone hybrids. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), **12**(3), 625. DOI: 10.3390/antibiotics12030625

3. *Mondal, E. R., Das, S. K., Mukherjee, P.* (2004) Comparative evaluation of antiproliferative activity and induction of apoptosis by some fluoroquinolones with a human non-small cell lung cancer cell line in culture. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, **5**(2), 196–204.

4. *Abdel-Aal, M. A. A., Abdel-Aziz, S. A., Shaykoon, M. S. A., Abuo-Rahma, G. E. A.* (2019) Towards anticancer fluoroquinolones: a review article. *Archiv der Pharmazie*, **352**(7), e1800376. DOI:10.1002/ardp.201800376

5. *Nowakowska, J., Radomska, D., Czarnomysy, R., & Marciniec, K.* (2024). Recent Development of Fluoroquinolone Derivatives as Anticancer Agents. *Molecules* (Basel, Switzerland), **29** (15), 3538. DOI:10.3390/molecules29153538

6. *Yadav, V., & Talwar, P.* (2019). Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth. *Biomedicine & pharmacotherapie*, **111**, 934–946. DOI:10.1016/j.biopha.2018.12.119

7. *Ho, F.Y., Tsang, W.P., Kong, S.K., Kwok, T.T.* (2006) The critical role of caspases activation in hypoxia/reoxygenation induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **345**(3), 1131–1137. DOI:10.1016/j.bbrc.2006.04.178

8. *Asmaa E. Kassab* (2025) The most recent updates on the anticancer potential of fluoroquinolones: a mini review, *Future Medicinal Chemistry*, **17**(16), 2067–2078, DOI: 10.1080/17568919.2025.2546771

9. *Yoshino, J., Imai, S.* (2013) Accurate measurement of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) with high-performance liquid chromatography. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), **10** (7), 203–215. DOI: 10.1007/978-1-62703-637-5\_14

10. *Turnidge J.* (1999). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs*, **58** (2), 29–36. DOI:10.2165/00003495-199958002-00006

11. *Vallet, C. M., Marquez, B., Ngabirano, E., Lemaire, S., Mingeot-Leclercq, M. P., Tulkens, P. M., & Van Bambeke, F.* (2011). Cellular accumulation of fluoroquinolones is not predictive of their intracellular activity: studies with gemifloxacin, moxifloxacin and ciprofloxacin in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model of uninfected and infected macrophages. *International journal of antimicrobial agents*, **38**(3), 249–256. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2011.05.011

Поступила: 08.10.2025

После доработки: 15.04.2026

Принята к публикации: 16.04.2026

## FLUOROQUINOLONE-INDUCED NAD<sup>+</sup> DEPLETION AS A NOVEL MECHANISM OF CYTOTOXICITY

*I.V. Kuzminov\*, D.I. Boyarintsev, K.V. Bryutova, A.V. Melnik, Yu.S. Rodina*

Tyumen State Medical University, 54 Odesskaya str., Tyumen, 625023; \*e-mail: kowendi3@gmail.com

A potential mechanism for the cytotoxic and antitumor effects of fluoroquinolones has been discovered. Treatment of HCT-116wt cells with norfloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin decreased intracellular NAD<sup>+</sup> and cell survival. The IC<sub>50</sub> values for the effect of fluoroquinolones were 0.314 mM (for norfloxacin), 0.547 mM (for ciprofloxacin), and 0.612 mM (for ofloxacin). The MTT test for cytotoxicity and mitochondrial functional status assessment revealed similar IC<sub>50</sub> values of 0.32 mM (for norfloxacin), 0.35 mM (for ciprofloxacin), and 0.67 mM (for ofloxacin). The suggest unveil a new potential mechanism of fluoroquinolone action on cells beyond their antimicrobial activity.

**Key words:** fluoroquinolones; mechanism of toxicity; energy metabolism; NAD<sup>+</sup> metabolism

## FUNDING

The study had no external funding sources.

Received: 08.10.2025, revised: 15.04.2026, accepted: 16.04.2026