

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К ПОЛИАКРИЛАТАМ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ

© 2022 г. Л.А. Островская*, Д.Б. Корман*, Е.И. Некрасова*, Н.В.Блюхтерова*, Ю.А. Хоченкова**, К.А. Абзаева***

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

**Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

***Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Россия, 664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1

E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 10.11.2021 г.

После доработки 15.11.2021 г.

Принята к публикации 16.11.2021 г.

Проведено сравнительное изучение цитотоксической активности двух полимерных соединений на основе полиакриловой кислоты, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил), в отношении опухолевых (рак молочной железы MCF-7, рак легкого А-549, рак толстой кишки НСТ116, меланома Mel Me) и нормальных (фибробласты кожи hFB-hTERT6) клеток человека *in vitro*. Показатель цитотоксического эффекта IC_{50} варьирует в пределах от 13 до 65 мкг/мл и от 25 до 180 мкг/мл для аурумакрила и аргакрила соответственно, изменяясь в зависимости от типа опухолевых клеток. Наибольшую чувствительность к действию препаратов проявляют клетки рака молочной железы MCF-7.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), полиакрилат серебра (аргакрил), цитотоксический эффект, культуры опухолевых и нормальных клеток человека.

DOI: 10.31857/S0006302922010070

В последние годы весьма интенсивно развивается новый подход к разработке противоопухолевых препаратов, основанный на тестировании соединений, способных селективно индуцировать окислительный стресс в опухолевых клетках [1].

Среди веществ, оказывающих такой эффект, особое внимание привлекают металлорганические соединения, содержащие благородные металлы, к числу которых относятся и изучаемые нами препараты аурумакрил (полиакрилат золота) и аргакрил (полиакрилат серебра) [2–6].

Принципиальные отличия в химической структуре этих соединений, представляющих собой золото- и серебросодержащие полимеры на основе полиакриловой кислоты, от других широко исследуемых металло-комплексов дают основания полагать, что мишени и механизмы реализации противоопухолевого эффекта аурумакрила и аргакрила, возможно, иные, чем у ряда известных, клинически апробированных лекарственных средств [7, 8].

Аурумакрил и аргакрил обладают значительной противоопухолевой активностью *in vivo* в от-

ношении солидных опухолей животных (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755), проявляют цитотоксический эффект *in vitro* на модели клеточной линии опухоли человека (культура MCF-7) [2, 3, 9].

В продолжение данного направления исследований нами проведено сравнительное изучение цитотоксической активности аурумакрила и аргакрила на расширенной панели культур опухолевых и нормальных клеток человека, результаты которого содержатся в представленной статье.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Исследованные полиметаллоакрилаты представляют собой неполные металлические соли полиакриловой кислоты, содержащие ионы благородных металлов (8 масс. %). Аурумакрил – неполная золотая соль полиакриловой кислоты, отвечающая общей формуле $(-CH_2-CHCOOH-)_n(-CH_2CHCOO AuCl_3H-)_m$, аргакрил – неполная серебряная соль полиакриловой кислоты отвечает общей формуле $(-CH_2-$

$\text{CHCOOH-})_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAg-})_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимеров составляет 100–300 кДа. Инфракрасные спектры препаратов содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 см^{-1} . Субстанции препаратов представляют собой стекловидные пластинки золотистого (аурумакрил) и серебристого (аргакрил) цвета, хорошо растворимые в воде [4, 5]. Оценка цитотоксического эффекта препаратов *in vitro* проведена при их применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 0.001 до 0.8 мг/мл для аурумакрила и от 0.004 до 2.0 мг/мл для аргакрила.

Оценка цитотоксического эффекта *in vitro*. Для сравнительной оценки цитотоксического эффекта аурумакрила и аргакрила в отношении клеток опухолей человека использованы клеточные культуры рецептор-положительной карциномы молочной железы MCF-7, рака легкого A-549, рака толстой кишки HCT116, меланомы Mel Me. Моделью нормальных клеток человека служила культура фибробластов кожи линии hFB-hTERT6. Культуры клеток, протестированные в работе, получены из Банка опухолей НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва). Цитотоксичность препаратов оценивали путем определения доли выживших по сравнению с контролем клеток с использованием стандартного МТТ-теста, основанного на сравнительном спектрофотометрическом определении оптической плотности раствора формазана в группах клеток, подвергавшихся воздействию препарата, и в контроле, в соответствии с ранее описанной методикой [10].

Долю выживших клеток определяли в соответствии с показателем оптической плотности раствора формазана, измеряемой спектрофотометрически при длине волны 570 нм на анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США). В качестве показателя цитотоксического действия аурумакрила служило соотношение между числом выживших клеток в тестируемой, подвергавшейся воздействию препарата, и контрольной группах клеток, выраженное в процентах. Выживаемость клеток, подвергавшихся воздействию аурумакрила, определяли в соответствии с формулой: $(D_{\text{эксп}}/D_{\text{контр}}) \times 100\%$, где D – оптическая плотность раствора.

Результаты экспериментов представлены в виде кривых «доза–эффект», характеризующих изменение доли погибших клеток в зависимости от концентрации препаратов и позволяющих определить показатель цитотоксичности IC_{50} (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток) в отношении изучавшихся клеточных культур.

Статистический анализ результатов. Статистическая обработка результатов проведена с помощью программ Statistica 6.0, Statistica 8.0 и MS Excel. Результаты представлены как среднее из шести индивидуальных измерений для культивируемых клеток. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена с помощью t -критерия Стьюдента. Различия признавались достоверными, если вычисленные значения t превышали значения критерия Стьюдента $t_{0,1}$ для определенных уровней значимости ($p \leq 0.01$) при заданном числе степеней свободы f [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние аурумакрила и аргакрила на выживаемость опухолевых и нормальных клеток человека в зависимости от концентрации препаратов характеризуют данные, представленные соответственно на рис. 1 и 2.

Как следует из рисунков, оба изученных препарата обладают дозозависимым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации препарата, типа опухоли и природы металла, содержащегося в полимере.

Оба препарата вызывают практически полную гибель опухолевых клеток при применении в концентрациях, далеких от максимальных, составлявших 0.8 и 2.0 мг/мл для аурумакрила и аргакрила соответственно. Так, концентрации препаратов, вызывающих гибель 94–96 % клеток, составляют 0.1–0.2 мг/мл для аурумакрила и 0.1–0.4 мг/мл для аргакрила, изменяясь в этих пределах в зависимости от линии опухолевых клеток (рис. 1 и 2).

Однако в целом концентрационные зависимости, характеризующие цитотоксическое действие препаратов, имеют определенные количественные различия, что находит свое отражение в разнице между расчетными значениями концентрации вещества, вызывающей гибель 50% опухолевых клеток (IC_{50}) для аурумакрила и аргакрила (рис. 1 и 2, таблица). Так, значения IC_{50} варьируют в пределах от 13 до 65 мкг/мл для аурумакрила и от 25 до 180 мг/мл для аргакрила, изменяясь в зависимости от типа опухолей. Иными словами, очевидно, что аурумакрил проявляет в отношении протестированных культур опухолевых клеток примерно в два-три раза более высокую цитотоксическую активность, чем аргакрил (таблица).

Основываясь на величине показателя IC_{50} , позволяющего дифференцировать опухоли различной природы по чувствительности к испытанным препаратам, представляется возможным охарактеризовать предполагаемый спектр их действия (см. таблицу). Как видно, в соответствии с

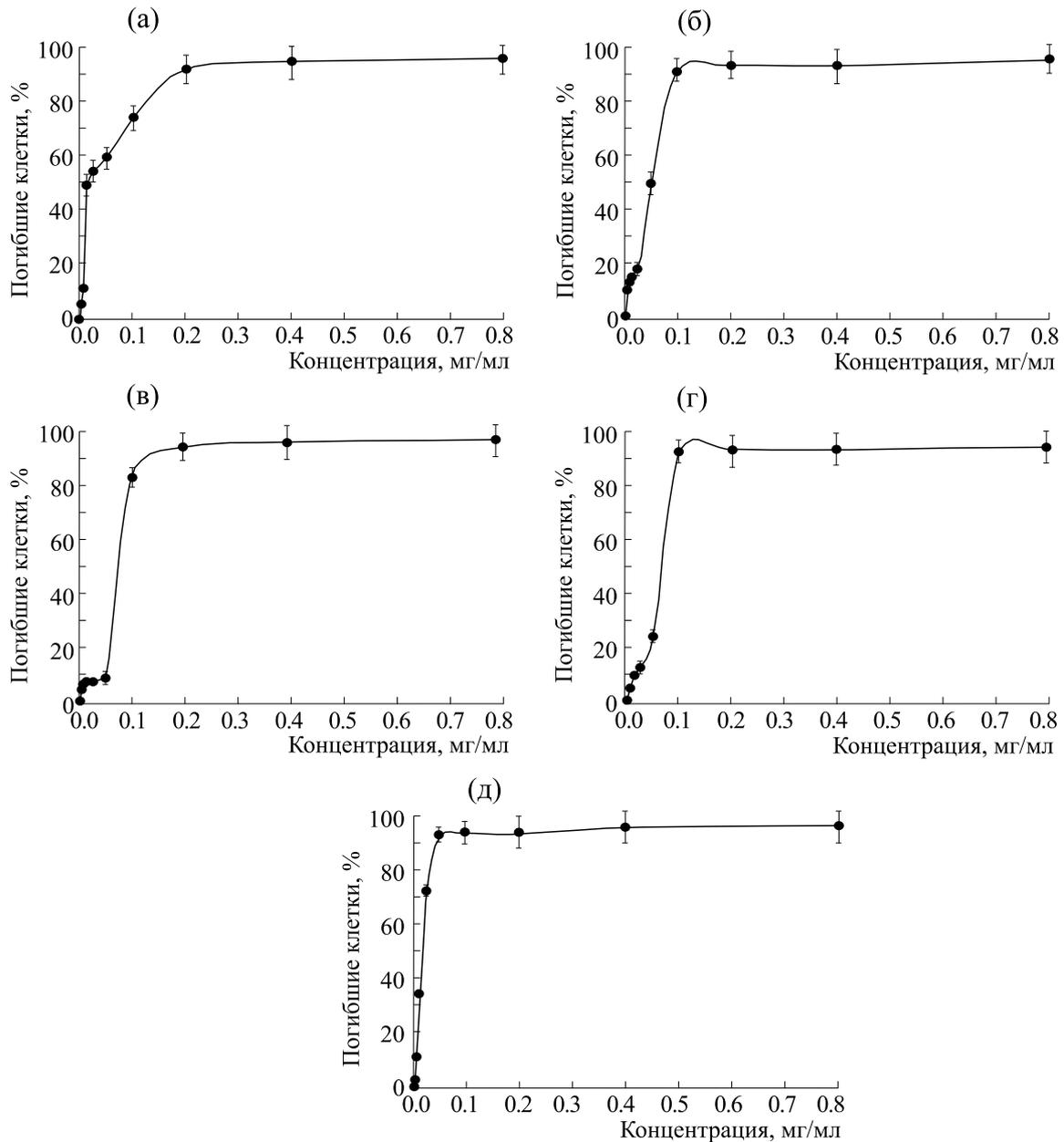


Рис. 1. Изменение доли погибших клеток в культурах опухолевых и нормальных клеток человека в зависимости от концентрации аурумакрила: (а) – рак молочной железы MCF-7, (б) – рак легкого A-549, (в) – рак толстой кишки HCT116, (г) – меланома Mel Me, (д) – фибробласты кожи hFB-hTERT6.

показателем цитотоксичности чувствительность культур опухолевых клеток к препаратам снижается в ряду: рак молочной железы MCF-7 – рак легкого A-549 – меланома Mel Me – рак толстой кишки HCT116.

Полученные данные свидетельствуют о том, что полиакрилат, содержащий золото, обладает значительно более высокой цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток человека по срав-

нению с препаратом, содержащим серебро. При этом наибольшую чувствительность к действию аурумакрила проявляют клетки рака молочной железы MCF-7 ($IC_{50} = 13$ мкг/мл).

Отметим, что нормальные клетки человека (фибробласты кожи линии hFB-hTERT6) также обладают значительной чувствительностью к действию препаратов. Максимальный цитотоксический эффект – гибель 96% клеток – отмеча-

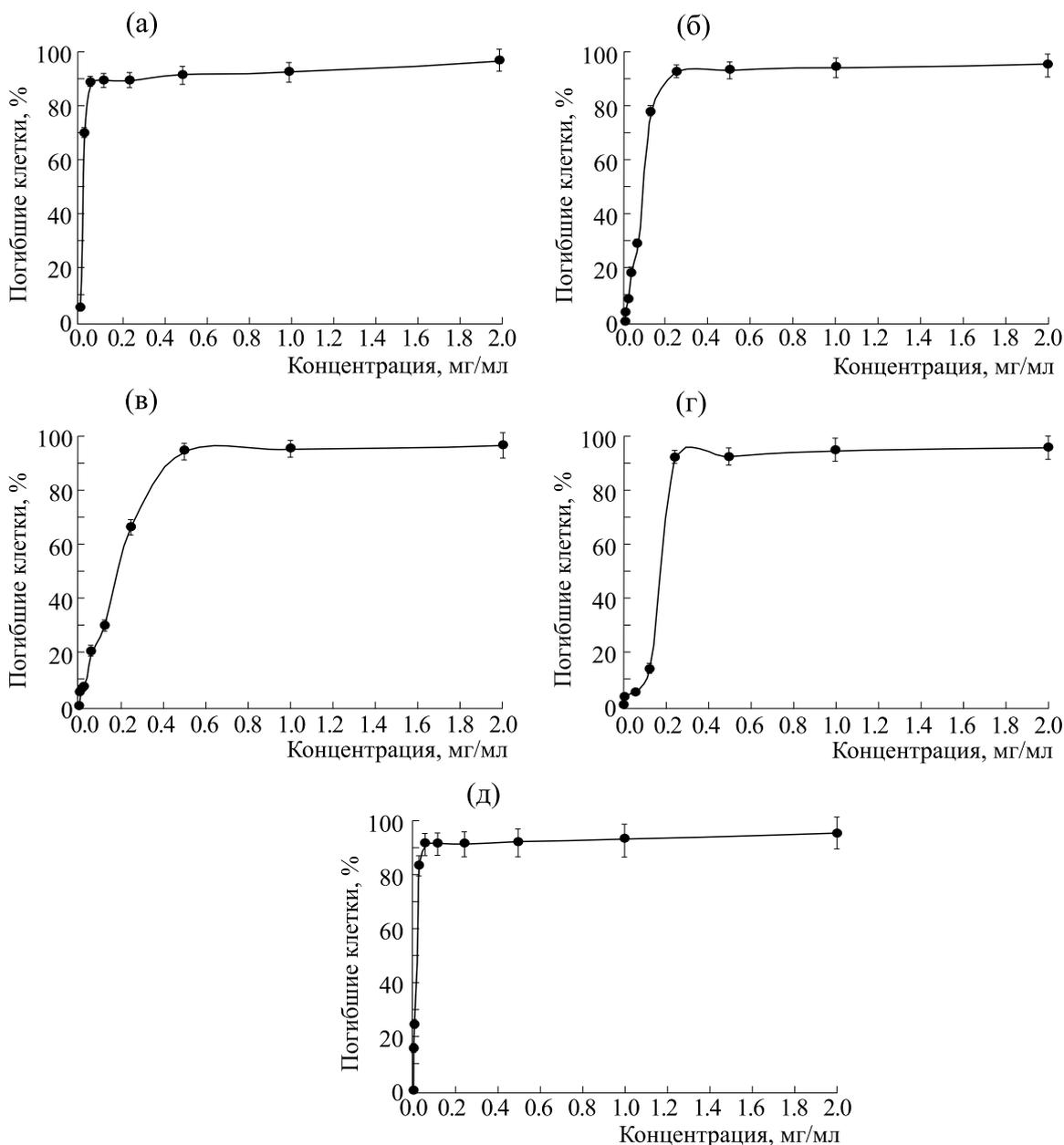


Рис. 2. Изменение доли погибших клеток в культурах опухолевых и нормальных клеток человека в зависимости от концентрации аргакрила: (а) – рак молочной железы MCF-7, (б) – рак легкого А-549, (в) – рак толстой кишки HCT116, (г) – меланома Mel Me, (д) – фибробласты кожи hFB-hTERT6.

ется при применении аурумакрила и аргакрила в концентрациях, равных соответственно 2.0 и 0.8 мг/мл. Расчетное значение показателя IC_{50} составляет величину, равную соответственно 20 и 25 мкг/мл для аурумакрила и аргакрила (рис. 1 и 2, таблица).

Согласно общепринятым критериям оценки цитотоксического эффекта лекарственное средство из нового класса соединений считается активным при значениях $IC_{50} \leq 100$ мкг/мл [11].

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что спектр чувствительных к аурумакрилу опухолей человека включает все четыре исследованные клеточные культуры – рака молочной железы MCF-7, рака легкого А-549, меланомы Mel Me, рака толстой кишки HCT116, в то время как к аргакрилу проявляют чувствительность две опухоли – рака молочной железы MCF-7 и рака легкого А-549. При этом оба препарата обладают наибольшей цитотоксичностью в отношении клеток рака молочной железы MCF-7.

Значения показателя IC_{50} аурумакрила и аргакрила для ряда опухолевых и нормальных клеток человека, культивируемых *in vitro*

Культура клеток	Аурумакрил	Аргакрил
	IC_{50} , мкг/мл	
Рак молочной железы MCF-7	13	25
Рак легкого A549	50	80
Меланома Mel Me	62	180
Рак толстой кишки HCT116	65	180
Фибробласты кожи hFB-hTERT6	20	25

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что оба препарата обладают дозозависимым цитотоксическим действием на изученные опухолевые клетки, выраженность которого зависит от концентрации препарата и типа опухоли.

На основании полученных данных можно полагать, что природа содержащегося в полимере металла оказывает весьма существенное влияние на чувствительность опухолевых клеток различного генеза к изучавшимся препаратам. Показано, что аурумакрил обладает более широким спектром цитотоксического действия в отношении клеточных культур опухолей человека по сравнению с аргакрилом. При этом наибольшую чувствительность к действию обоих препаратов проявляет культура клеток рака молочной железы MCF-7, что хорошо согласуется с полученными нами ранее данными [9].

Вместе с тем установлено отсутствие преимущественной цитотоксичности препаратов в отношении опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками человека (фибробласты кожи линии hFB-hTERT6), что подтверждает имеющиеся данные для аурумакрила [12].

В связи с этим отметим, что, как известно, селективность противоопухолевого действия различных соединений в значительной степени зависит не только от непосредственной их цитотоксичности, выявляемой в экспериментах *in vitro*, но и от фармакокинетики и метаболизма изучаемых агентов *in vivo*. Цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам свойственна многим конвенциональным противоопухолевым препаратам, в частности таким как цисплатин и доксорубин, что не явилось препятствием к их широкому применению в клинической практике. Как уже отмечалось ранее, обнаружение цитотоксичности исследуемого агента в отношении нормальных клеток *in vitro* указывает на возможность развития нежелательных побочных явлений при применении потенциального лекарственного

средства *in vivo*, что несомненно должно быть учтено при проведении углубленных доклинических токсикологических исследований [13–15].

Рассматривая обнаруженные различия в цитотоксичности содержащих золото и серебро полиакрилатов в отношении опухолевых клеток, представляется уместным отметить, что, как было показано, природа металла в значительной степени определяет возможный спектр фармакологической активности полимерных композитов, содержащих наночастицы благородных металлов, в том числе в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Известно, что содержащие благородные металлы полиакрилаты обладают значительной гемостатической активностью, обусловленной высокой специфичностью их взаимодействия с молекулой альбумина крови с образованием интерполимерного комплекса [16].

При исследовании механизма действия нанокompозитов на основе золота и серебра в качестве гемостатиков было показано, что в условиях *in vivo* природа металлов определяет кинетическую устойчивость комплексов. Так, полимер, который содержит химически инертный атом золота, обладающего низкой аффинностью к кислороду, проявляет большую гемостатическую активность по сравнению с полимером, содержащим более реакционноспособные наночастицы серебра [16]. Вышеизложенные результаты свидетельствуют о преимущественной цитотоксической активности полиакрилата золота в отношении ряда клеточных культур опухолей человека по сравнению с препаратом, содержащим серебро, что дополняет имеющиеся данные о действии аурумакрила.

Ранее нами было проведено весьма детальное доклиническое исследование аурумакрила в качестве потенциального противоопухолевого препарата, включающее изучение противоопухолевой и цитотоксической активности препарата, его фармакокинетики и токсичности, рассмотрены существующие представления о механизме

противоопухолевого действия золотосодержащих комплексных соединений [1–3, 7, 17, 18].

Полученные в представленной работе данные о цитотоксическом эффекте полиакрилатов золота (аурумакрил) и серебра (аргакрил) в совокупности с результатами ранее проведенных исследований в ряду металлополиакрилатов позволяют рассматривать полиакрилат золота в качестве потенциального кандидата для разработки нового противоопухолевого средства.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика* **64** (3), 552 (2019).
2. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика* **38** (12), 64 (2019).
3. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Росс. биотерапевтич. журн.* **19** (4), 74 (2020).
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Изв. РАН. Сер. хим.* **66** (12), 2333 (2017).
5. Л. А. Островская, М. Г. Воронков, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **59** (4), 785 (2014).
6. М. Г. Воронков, К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая и др., *Патент РФ № 2372091*, 2009. Бюл. изобретений, **31** (2009).
7. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии* **64** (6), 697 (2018).
8. C. Nardon, N. Pettenuzza, and D. Fregona, *Curr. Med. Chem.* **23**, 3374 (2016).
9. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика* **66** (5), 978 (2021).
10. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., *Биофизика* **64** (6), 1138 (2019).
11. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 642–657.
12. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., *Биофизика* **65** (6), 1093 (2020).
13. Д. Б. Корман, *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).
14. A. M. de Almeida, V. A. de Oliveria, P. P. de Castro, et al., *Biomaterials* **30** (6), 841 (2017).
15. J. Wang, G. Hong, G. Li, and W. Wang, *Molecules* **24**, 4505 (2019).
16. К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Г. Г. Белозерская и др., *Изв. РАН. Сер. хим.* **66** (12), 2314 (2017).
17. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Ж. П. Бурмий и др., *Биофизика* **63** (3), 606 (2018).
18. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Эксперим. и клинич. фармакология* **83** (11), 29 (2020).

Sensitivity of Tumor and Normal Human Cells to Polyacrylates of Noble Metals

L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman*, E.I. Nekrasova*, N.V. Bluhterova*,
U.A. Hochenkova**, and K.A. Abzaeva***

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**Blokhin National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia

***A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia

The comparative study of the cytotoxic activity of two based on polyacrylic acid polymer compounds containing aurum (aurumacryl) and argentum (argacryl) against tumor (MCF-7 breast cancer, A-549 lung cancer, HCT116 colon cancer, Mel Me melanoma) and normal (skin fibroblasts hFB-hTERT6) human cells was carried out *in vitro*. The IC_{50} index of the drugs cytotoxic effect varies from 13 to 65 $\mu\text{g/ml}$ and from 25 to 180 $\mu\text{g/ml}$ for aurumacryl and argacryl, respectively, changing depending on the type of tumor cells. The greatest sensitivity to the action of drugs is shown by MCF-7 breast cancer cells.

Keywords: aurum polyacrylate (aurumacryl), argentum polyacrylate (argacryl), cytotoxic effect, culture of tumor and normal human cells