

УДК 577.3

МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАКРИЛАТА ЗОЛОТА НА ЛИМФОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А.К. Чигасова*, Л.А. Островская*., Д.Б. Корман*

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

#E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 23.08.2022 г.

После доработки 23.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Проведено исследование механизма действия полиакрилата золота (аурумакрила) на лимфоциты крови человека, включающее оценку влияния препарата на жизнеспособность клеток, структуру ДНК и способность к генерации активных форм кислорода. Установлено, что аурумакрил обладает доза- и экспозиционно- зависимым цитотоксическим действием, индуцирует однонитевые разрывы ДНК и вызывает генерацию внутриклеточных активных форм кислорода.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), лимфоциты человека, цитотоксичность, однонитевые разрывы ДНК, активные формы кислорода.

DOI: 10.31857/S0006302922060126, EDN: LKICKI

Препарат полиакрилата золота (аурумакрил), как было показано ранее, проявляет значительную противоопухолевую активность на моделях солидных опухолей животных (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Ca-755) *in vivo*, а также обладает цитотоксической эффективностью в отношении клеточных линий опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A-549, рак толстой кишки HCT116, меланома Mel Me) *in vitro* [1-5].

Важной особенностью действия препарата является обнаруженное нами в экспериментах с культурой клеток опухоли человека MCF-7 отсутствие перекрестной резистентности между аурумакрилом и такими широко применяемыми в клинической практике средствами как цисплатина и доксорубин [6].

Исследование механизма действия аурумакрила на опухолевые клетки (культура MCF-7) показало, что апоптоз не является доминирующим механизмом в индуцированной препаратом гибели клеток [7].

Установлено, что ДНК опухолевых клеток является одной из основных мишеней для аурумакрила, вызывающего структурные изменения макромолекулы в виде сшивок [7].

Препарат вызывает также значительные изменения в кинетике клеточной пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток. Воздей-

ствии аурумакрила приводило к накоплению клеток в фазе пролиферативного покоя G_0 , снижению доли делящихся клеток и к утрате выжившими клетками репродуктивной способности [3].

Наряду с этим необходимо отметить, что золотосодержащие соединения, согласно литературным данным, относят к потенциальным противоопухолевым агентам с мультитаргетным механизмом действия, способным не только влиять на структуру ДНК и пролиферативные процессы в опухолевых клетках, но и вызывать значительные изменения в антиоксидантном статусе опухоли [8, 9].

В продолжение исследования механизма действия аурумакрила проведено изучение цитотоксической активности препарата в отношении лимфоцитов крови человека, а также его влияния на структуру ДНК (однонитевые разрывы) и генерацию внутриклеточных активных форм кислорода (АФК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат. Исследованный препарат аурумакрил – это неполная золотая соль полиакриловой кислоты, содержащая 8 масс. % ионов металла и отвечающая общей формуле $(-CH_2-CH-COOH-)_n(-CH_2CHCOO(AuCl_3H-))_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимера составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препарата содержат полосы поглощения

Сокращение: АФК – активные формы кислорода.

карбоксылной и карбоксилатной групп соответственно при 1720 и 1570 см^{-1} . Субстанция препарата представляет собой стекловидные пластинки золотистого цвета, хорошо растворимые в воде [1]. Оценка эффектов препарата *in vitro* проведена при его применении в концентрациях от 1 до 1000 мкг/мл.

Культура лимфоцитов крови человека. В экспериментах использована гепаринизированная кровь здоровых доноров в возрасте 20–30 лет, давших информированное согласие на проведение исследования.

Выделение лимфоцитов из крови проводили путем центрифугирования в градиенте плотности фикол-верографина (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, США) в соответствии с приложенной инструкцией.

После выделения из крови отмытые лимфоциты ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (рН 7.4) до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл. Суспензию свежeweделенных лимфоцитов инкубировали с аурумакрилом, примененным в указанных выше концентрациях, при 37°C в течение 1, 6 и 24 ч.

Оценка цитотоксического эффекта. Исследование цитотоксичности аурумакрила в отношении лимфоцитов крови человека проведено в тесте с использованием 0.4% раствора трипанового синего, восприимчивость к которому характеризует жизнеспособность клеток. Клеточную суспензию смешивали в равных пропорциях с раствором 0.4% трипанового синего, далее ресуспендировали и непосредственно после этого оценивали клеточную гибель путем подсчета окрашенных (погибших) клеток в камере Горяева при анализе 500 клеток для каждой точки.

Полученные данные представлены в виде кривых, характеризующих изменение доли погибших после воздействия аурумакрила клеток по отношению к контролю в зависимости от концентрации препарата.

Анализ одонитевых разрывов ДНК. Для анализа одонитевых разрывов ДНК, индуцированных аурумакрилом, использовали метод электрофореза единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет).

Суспензию контрольных или обработанных аурумакрилом клеток смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1:1) и наносили по 70 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали при 4°C в течение 10 мин.

Затем в течение 1 ч клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: 2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л Na₂ЭДТА, 10% диметилсульфоксида, 1% Triton-X100) и ше-

лочному электрофорезу (раствор для электрофореза: 300 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л Na₂ЭДТА, рН > 13, стабилизация по напряжению – 0.75 В/см, 20 мин при 4°C) с последующей нейтрализацией (3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C).

Для окраски ДНК использовали акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, рН 7.4).

Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенным видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab, Польша).

Оценка генерации активных форм кислорода. Для оценки генерации АФК использовали краситель 5(6)-хлорометил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (Invitrogen, США), который легко проникает через клеточную мембрану и гидролизуется в клетке эстеразами с последующим окислением до флуоресцирующего комплекса. Окисленный краситель хорошо удерживается клетками и считается маркером внутриклеточных АФК [10].

Контрольные или обработанные полиакрилатом золота клетки инкубировали при 37°C в фосфатном буфере (рН 7.4) с красителем (2 мкмоль/л) в течение 60 мин и измеряли интенсивность их флуоресценции на флуориметре Qubit (Invitrogen, США) при длине волны возбуждения 480–490 нм и длине волны излучения 520–530 нм.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью программы Statistica 7.0. Результаты экспериментов представлены в виде средних значений для пяти независимых измерений с учетом стандартной ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование механизма действия аурумакрила на лимфоциты крови человека включало оценку влияния препарата на жизнеспособность клеток, структуру ДНК и способность к генерации АФК.

Цитотоксичность аурумакрила. Влияние аурумакрила на жизнеспособность лимфоцитов характеризуют данные, представленные на рис. 1.

Как видно из представленных данных, цитотоксичность аурумакрила для лимфоцитов крови человека существенным образом зависит от концентрации и главным образом от времени воздействия препарата на клетки. Так, при инкубации препарата с клетками в течение 1 ч гибель клеток с возрастанием концентрации препарата не увеличивается и находится практически на уровне

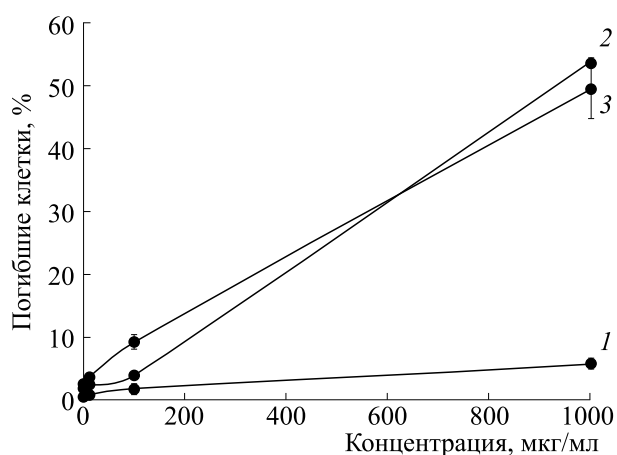


Рис. 1. Изменение доли погибших лимфоцитов крови человека в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила. Время: 1 – 1 ч, 2 – 6 ч, 3 – 24 ч.

контроля (рис. 1, кривая 1). С увеличением времени инкубации до 6 и 24 ч гибель лимфоцитов линейно возрастает с повышением концентрации аурумакрила, достигая максимума – гибели примерно 50% клеток – при воздействии препарата в концентрации 1000 мкг/мл в течение как 6 ч, так и 24 ч (рис. 1, кривые 2 и 3). Иными словами, максимальный цитотоксический эффект препарата наблюдается при воздействии в концентрации 1000 мкг/мл в течение 6 ч. Дальнейшее увеличение экспозиции до 24 ч не приводит к повышению цитотоксического эффекта аурумакрила в отношении лимфоцитарных клеток крови человека.

Таким образом, показано, что расчетная доза препарата, летальная для 50% лимфоцитов (IC_{50}), составляет 1000 мкг/мл (80 мкг/мл в пересчете на содержание золота) как при инкубации с аурумакрилом в течение 6 ч, так и при инкубации в течение 24 ч.

Отметим, что показатель цитотоксичности аурумакрила IC_{50} для опухолевых клеток (MCF-7), определенный в тесте с использованием красителя трипановый синий, составляет для аурумакрила 720 мкг/мл (58 мкг/мл в пересчете на содержание золота).

Приведенные данные свидетельствуют о более высокой цитотоксичности аурумакрила в отношении опухолевых клеток (культура MCF-7) по сравнению с нормальными клетками (лимфоциты крови) человека.

Индукция аурумакрилом односторонних разрывов ДНК. Известно, что при анализе структурных изменений ДНК методом ДНК-комет доля фрагментированной (получившей односторонние разрывы) ДНК, мигрирующей во время электрофореза в геле агарозы к аноду и создающей так

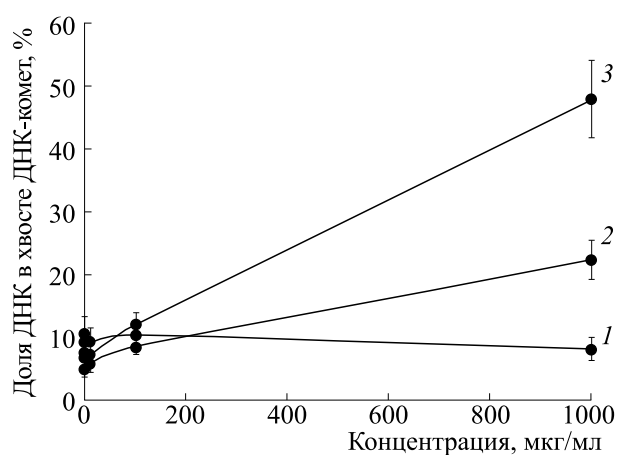


Рис. 2. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет лимфоцитов крови человека в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила. Время: 1 – 1 ч, 2 – 6 ч, 3 – 24 ч.

называемый «хвост» ДНК-комет, регистрируется путем оценки показателя электрофоретической подвижности ДНК.

Изменение доли фрагментированной ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аурумакрила и времени воздействия препарата охарактеризовано кривыми, представленными на рис. 2.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что доля фрагментированной ДНК в хвосте ДНК-комет зависит от концентрации аурумакрила, но в большей степени – от времени воздействия препарата. Видно, что при экспозиции лимфоцитов с аурумакрилом в течение 1 ч доля фрагментированной ДНК практически не отличается от контрольного уровня, колеблющегося в пределах от 6 до 10%, при использовании всех концентраций в изученном диапазоне (рис. 2, кривая 1). Доля фрагментированной ДНК в хвосте ДНК-комет увеличивается до 22% при удлинении экспозиции до 6 ч, а при воздействии препарата в течение 24 ч – до 48% при применении препарата в концентрации 1000 мкг/мл, то есть в 2.2 и 4.8 раза по сравнению с контролем (рис. 2, кривые 2 и 3 соответственно).

Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии аурумакрила на структуру ДНК лимфоцитов, выражающемся в увеличении доли фрагментированной ДНК, мигрирующей в хвост ДНК-кометы, что может быть истолковано как способность препарата индуцировать односторонние разрывы ДНК. При этом наибольший эффект – увеличение доли фрагментированной ДНК в лимфоцитах крови человека до 48% – наблюдается при воздействии препарата в максимальной из изученных концентраций 1000 мкг/мл в течение 24 ч.

Генерация аурумакрилом активных форм кислорода. Содержание внутриклеточных АФК принято оценивать в соответствии с показателем интенсивности флуоресценции клеток, обработанных специфическим красителем (5(6)-хлорометил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом) [10].

Изменение интенсивности флуоресценции лимфоцитов в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила показано на рис. 3.

Представленные данные свидетельствуют о способности аурумакрила вызывать генерацию внутриклеточных АФК. Причем выраженность этого эффекта зависит как от концентрации препарата, так и в большей степени от времени его воздействия на клетки.

Как видно, уровень АФК при инкубации лимфоцитов с аурумакрилом в течение 1 ч и 6 ч достигает максимальных значений, равных 0.70 и 0.85 отн. ед. соответственно, при применении препарата в наибольшей из изученных концентраций (1000 мкг/мл) (рис. 3, кривые 1 и 2 соответственно).

При инкубации лимфоцитов с аурумакрилом, примененным в той же максимальной концентрации (1000 мкг/мл) в течение 24 ч уровень АФК достигает значения, равного 1.78 отн. ед. (рис. 3, кривая 3).

Значения показателя АФК в контроле колеблются в узком диапазоне, равном 0.27–0.30 отн. ед. (рис. 3).

Таким образом, показано, что воздействие аурумакрила (1000 мкг/мл) в течение 1, 6 и 24 ч приводит к увеличению содержания АФК в лимфоцитах крови человека в 2.3, 2.8 и 6.0 раз соответственно, что является убедительным свидетельством влияния препарата на окислительно-восстановительные процессы в клетке.

Анализируя результаты проведенного исследования, отметим следующие экспериментально установленные факты.

Аурумакрил обладает определенным дозо- и экспозиционно-зависимым цитотоксическим действием на лимфоциты крови человека, менее выраженным, однако, чем его летальный эффект в отношении опухолевых клеток. IC_{50} препарата составляет 1000 мкг/мл (80 мкг/мл в пересчете на содержание золота) для лимфоцитов и 720 мкг/мл (58 мкг/мл в пересчете на содержание золота) для опухолевых клеток (МСF-7).

Аурумакрил оказывает деструктивное действие на ДНК лимфоцитов крови человека, индуцируя однонитевые разрывы в структуре макромолекулы. Доля фрагментированной ДНК, определенная методом ДНК-комет, возрастает под

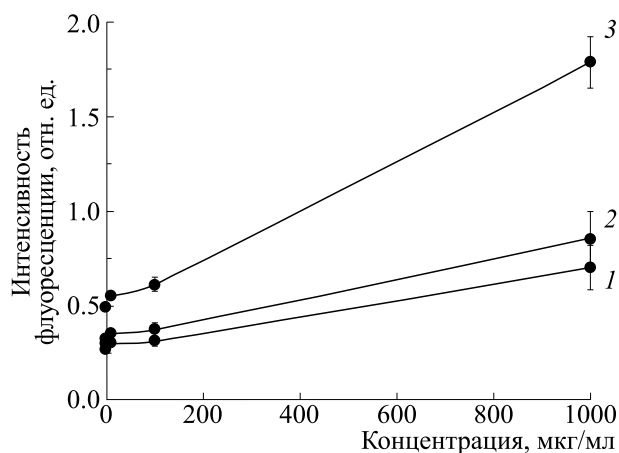


Рис. 3. Генерация активных форм кислорода в лимфоцитах крови человека под влиянием аурумакрила. Изменение интенсивности флуоресценции клеток в зависимости от концентрации и времени воздействия препарата. Время: 1 — 1 ч, 2 — 6 ч, 3 — 24 ч. По оси абсцисс — концентрация аурумакрила, по оси ординат — интенсивность флуоресценции лимфоцитов.

влиянием препарата (1000 мкг/мл, инкубация 24 ч) в 4.8 раза по сравнению с контролем.

Аурумакрил обладает способностью вызывать генерацию внутриклеточных АФК. Воздействие препарата (1000 мкг/мл, инкубация 24 ч) приводит к увеличению содержания АФК в лимфоцитах крови человека в шесть раз по сравнению с контролем.

При рассмотрении представленных результатов необходимо подчеркнуть, что данные, полученные с использованием культуры лимфоцитов крови человека, не могут быть однозначно истолкованы как свидетельство нежелательного токсического действия аурумакрила на нормальные клетки.

В связи с вышесказанным уместно упомянуть о детальном обсуждении данного аспекта действия противоопухолевых препаратов, проведенном нами ранее по поводу обнаружения цитотоксического эффекта аурумакрила в отношении фибробластов кожи человека линии hFB-hTERT6 [11].

Отмечалось, что цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам свойственна многим конвенциональным противоопухолевым препаратам, что не явилась препятствием для внедрения в широкую клиническую практику эффективных противоопухолевых средств, таких, в частности, как цисплатина и доксорубицин.

Согласно существующим представлениям не следует рассматривать выявляемую в опытах *in vitro* непосредственную цитотоксичность в отношении нормальных клеток в качестве указания

на отсутствие селективности действия препарата по отношению к опухоли *in vivo*.

При этом естественно вопрос о клинической безопасности препарата может быть решен только после проведения стандартного доклинического токсикологического изучения в специальных экспериментах.

В заключение отметим, что полученные в проведенном исследовании результаты расширяют представление о механизме действия аурумакрила как потенциального противоопухолевого препарата и имеют определенное значение для понимания механизма действия биологически активных золотосодержащих соединений в целом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья людей с соблюдением всех принципов гуманности и этических норм (Хельсинкская декларация WMA, 2013 г.). От всех участников экспериментов было получено информированное согласие на проведение исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., Хим. физика, **38** (12), 64 (2019).
2. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., Рос. биотерапевтич. журн., **19** (4), 74 (2020).
3. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., Биофизика, **62** (3), 598 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917030150
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., Биофизика, **66** (5), 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
5. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., Биофизика, **67** (1), 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
6. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., Биофизика **67** (5), 947 (2022).
7. А. К. Чигасова, Л. А. Островская и Д. Б. Корман, Биофизика, **67** (6), (2022).
8. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, Вопр. онкологии, **64** (6), 697 (2018).
9. Д. Б. Корман, Л. А. Островская, Н. В. Блюхтерова и др., Биофизика, **66** (6) 1229 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106020X
10. Y. Nakajima, K. Tsuruma, M. Shimazawa, et al., BMC Complement Altern. Med., **9**, 4 (2009).
11. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., Биофизика, **65** (6), 1093 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920060071

Mechanism of Cytotoxic Activity of Aurum Polyacrylate against Human Blood Lymphocytes

A.K. Chigasova*, L.A. Ostrovskaya*, and D.B. Korman*

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

This study focused on an exploration of the mechanism of action of aurum polyacrylate (aurumacryl) on human blood lymphocytes, including an assessment of the effect of the drug on cell viability, DNA structure and the ability of the drug to induce reactive oxygen species. It was found that aurumacryl exhibited a dose- and exposure-dependent cytotoxic activity, caused single-stranded DNA breaks and induced generation of intracellular reactive oxygen species.

Keywords: aurum polyacrylate (aurumacryl), human lymphocytes, cytotoxicity, single-stranded DNA breaks, reactive oxygen species