

## МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАКРИЛАТА ЗОЛОТА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

© 2022 г. А.К. Чигасова\*, Л.А. Островская\*<sup>\*,#</sup>, Д.Б. Корман\*

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

<sup>#</sup>E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 12.08.2022 г.

После доработки 12.08.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2022 г.

Проведено исследование роли апоптоза в индуцируемом полиакрилатом золота (аурумакрилом) процессе гибели опухолевых клеток, а также изучение влияния препарата на структуру ДНК клеток карциномы молочной железы человека MCF-7. Установлено, что аурумакрил, будучи активным цитотоксическим агентом, вызывает гибель клеток, изменение их морфологической структуры, индуцирует сшивки в молекуле ДНК. Показано, что апоптоз не является доминирующим механизмом в индуцированной аурумакрилом гибели клеток.

*Ключевые слова:* полиакрилат золота (аурумакрил), культура клеток MCF-7 цитотоксичность, апоптоз, сшивки ДНК.

DOI: 10.31857/S0006302922060151, EDN: LKVLQG

Металлоцены, содержащие благородные металлы — золото и серебро, — весьма широко исследуются в последние годы в качестве веществ, проявляющих разностороннюю биологическую, в том числе противоопухолевую активность [1, 2].

Особое место среди такого рода веществ занимает полиакрилат золота (аурумакрил), представляющий собой единственное из изученных препаратов соединение на полимерной основе, содержащее наноструктурированное золото [3, 4].

Показано, что аурумакрил 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* [5–9].

Принципиальные отличия в физико-химической структуре аурумакрила от других широко исследуемых металлокомплексов дают основания полагать, что, возможно, мишени и механизмы реализации противоопухолевого эффекта аурумакрила иные, чем у ряда известных лекарственных средств, в частности, таких как цисплатина. Экспериментальным подтверждением такого рода соображений могут служить полученные нами данные об отсутствии перекрестной резистентности между аурумакрилом и цисплатиной [10].

Согласно существующим представлениям золотосодержащие соединения относят к потенциальным противоопухолевым агентам с мульти-таргетным механизмом действия, способным вызывать как некротическую, так и апоптотическую гибель клеток, влиять на пролиферативные и окислительно-восстановительные процессы в опухоли, воздействуя на ДНК и антиоксидантные ферменты (тиоредоксин редуктаза) в опухолевых клетках [1, 2].

Ранее нами было установлено, что аурумакрил, обладая выраженным цитотоксическим эффектом, вызывает также значительные изменения в кинетике клеточной пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток. Воздействие аурумакрила приводило к накоплению клеток в фазе пролиферативного покоя G<sub>0</sub>, снижению доли делящихся клеток и к утрате выжившими клетками репродуктивной способности [7].

Задача представленной работы состояла в оценке роли апоптоза в индуцируемом аурумакрилом процессе гибели опухолевых клеток и в изучении влияния препарата на структуру ДНК клеток карциномы молочной железы человека MCF-7.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Препарат.** Исследовавшийся препарат аурумакрил представляет собой неполную золотую

соль полиакриловой кислоты, содержащую 8 масс. % ионов металла, отвечает общей формуле  $(-CH_2-CHCOOH-)_n(-CH_2CHCOOAgCl_3H-)_m$ , где  $n = 12000-35000$ ,  $m = 1650-6650$ . Молекулярная масса полимера составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препарата содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570  $cm^{-1}$ . Субстанция препарата представляют собой стекловидные пластинки золотистого цвета, хорошо растворимые в воде [3]. Оценка эффектов препарата *in vitro* проведена при его применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 1 до 1000 мкг/мл.

**Культура клеток.** Эксперименты проведены с использованием культуры клеток рецептор-положительной карциномы молочной железы человека MCF-7, полученной из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва).

Культивирование клеток проводили в стандартной культуральной среде DMEM/F12 (Life Technologies Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия), 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 10% фосфатно-солевого буфера (Life Technologies Thermo Fisher Scientific, США) путем термостатирования при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>-инкубатор MCO-18AC, Sanyo, Япония). В дальнейшем клетки снимали с поверхности флаконов 0.25%-м раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия) и пассировали с плотностью 200 клеток/см<sup>2</sup> в той же культуральной среде. Пассирование клеток проводили при достижении культурой 80–90% монослоя. Замену среды осуществляли каждые четверо суток.

Экспериментальное изучение аурумакрила проведено на клетках, находящихся в фазе экспоненциального роста (плотность клеточной популяции ~ 80%). Клетки снимали с пластика раствором трипсина-ЭДТА с последующей инактивацией трипсина и отмывкой клеток в полной среде. Клетки пассировали в чашки Петри диаметром 35 мм, содержащие покровные стекла (SPL Lifesciences, Южная Корея). Действие аурумакрила в различных концентрациях (1, 10, 100 и 1000 мкг/мл) изучено при инкубации клеток с препаратом при 37°C в течение 1, 6 и 24 ч, при параллельном инкубировании интактных клеток в качестве контроля [7].

**Оценка цитотоксического эффекта.** Исследование цитотоксичности аурумакрила в отношении клеток MCF-7 проведено в тесте с использованием 0.4%-го раствора трипанового синего, восприимчивость к которому характеризует жизнеспособность клеток.

Клетки дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (рН 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспен-

зию. Затем в равных пропорциях смешивали раствор 0.4%-го трипанового синего и клеточной суспензии, смесь ресуспендировали и непосредственно после этого оценивали клеточную гибель путем подсчета окрашенных (погибших) клеток в камере Горяева при анализе 500 клеток для каждой точки [7].

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

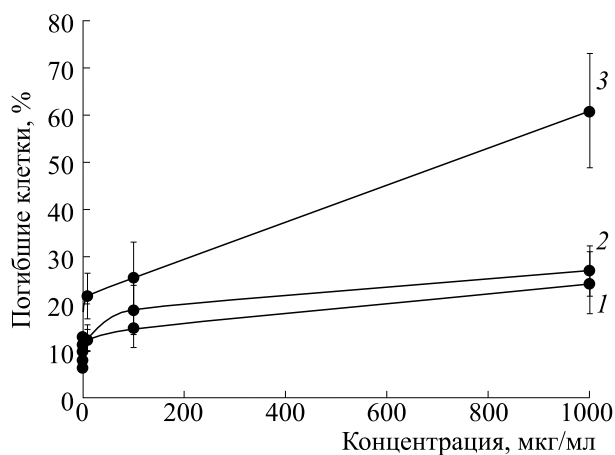
**Морфологический анализ клеток.** Морфологические изменения клеток MCF-7 под влиянием аурумакрила фиксировали на микрофотоизображениях клеток, полученных с помощью инвертированного микроскопа CKX 41 SF (Olympus, Япония), оснащенного CCD камерой Infinity 3-1 и объективом 20× (Lumenera Corp., Канада).

**Анализ апоптотической гибели клеток.** Для определения пути гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аурумакрила использовали метод оценки доли апоптотических клеток среди всех погибших клеток с помощью ДНК-связывающего флуоресцентного красителя YO-PRO-1, который избирательно проникает через мембрану только апоптотических клеток.

Данный метод основан на представлениях о том, что в период апоптоза активируется рецептор P2X7 неселективного катионного канала P2X7R, управляемого аденозинтрифосфатом, что приводит к превращению этого канала в цитолитическую пору [11]. Некоторые красители, такие как флуоресцентный краситель YO-PRO-1, могут проникать внутрь этих пор, после чего клетки начинают флуоресцировать в зеленой области спектра, тогда как другие красители, такие как йодистый пропилий, не обладают этим свойством в данных условиях. Таким образом, YO-PRO-1 может служить ранним маркером апоптотической гибели клеток [12]. Добавление йодистого пропилия позволяет дифференцировано окрасить погибшие клетки, флуоресцирующие после окраски в красной области спектра. Через мембрану живых клеток эти красители не проникают.

Оценку доли клеток на ранней стадии апоптоза проводили с использованием коммерческого набора Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4 с флуоресцентными красителями YO-PRO-1 и йодистым пропилием (Invitrogen, США). Клетки окрашивали в соответствии с протоколом производителя.

В исследуемые временные точки (через 1, 6 и 24 ч после воздействия аурумакрила) клетки дважды промывали раствором Хенкса и снимали их с поверхности чашек 0.25%-м раствором трипсина-ЭДТА. Затем к 1 мл клеточной суспензии в растворе Хенкса добавляли по 1 мкл раствора YO-PRO-1 и йодистого пропилия из упомянутого



**Рис. 1.** Изменение доли погибших опухолевых клеток культуры MCF-7 в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила: 1 — инкубация 1 ч, 2 — инкубация 6 ч, 3 — инкубация 24 ч.

коммерческого набора. Клетки инкубировали 20 мин при 4°C, ресуспендировали и помещали в камеру Горяева для подсчета апоптотических клеток. Подсчет клеток в апоптозе проводили с помощью люминесцентного микроскопа Eclipse Ni-U (Nikon, Япония) со следующими светофильтрами: В-2Е/С с излучением зеленой флуоресценции для YO-PRO-1 (возбуждение на 465–495 нм и эмиссия на 515–555 нм) и Y-2Е/С с испусканием красной флуоресценции для йодистого пропидия (возбуждение на 540–580 нм и эмиссия на 600–660 нм). Анализировали по 300 клеток для каждой точки.

**Анализ сшивок ДНК.** Изучение влияния аурумакрила на ДНК опухолевых клеток MCF-7 проводили путем детектирования сшивок ДНК с использованием метода ДНК-комет в щелочных условиях.

Клетки инкубировали с аурумакилом в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C. Затем клетки дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (рН 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспензию, содержащую  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл. Суспензию контрольных или обработанных полиакрилатом золота клеток смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1:1) и наносили по 75 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали 10 мин при 4°C. Затем в течение 1 ч клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: NaCl — 2.5 моль/л, трис-HCl — 20 ммоль/л, Na<sub>2</sub>ЭДТА — 100 ммоль/л, ДМСО — 10%, Triton-X100 — 1%) и щелочной денатурации с последующим проведением электро-

фореза (раствор для щелочной денатурации и электрофореза: NaOH — 100 ммоль/л, Na<sub>2</sub>ЭДТА — 1 ммоль/л, рН 12.5; стабилизация по напряжению — 2 В/см; 20 мин при 4°C) и с дальнейшей нейтрализацией в течение 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).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 7.0. Результаты представлены как среднее из пяти независимых результатов  $\pm$  стандартная ошибка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В продолжение исследования механизма действия аурумакрила в данной работе представлены результаты изучения влияния препарата на жизнеспособность и морфологию клеток карциномы молочной железы человека MCF-7, их апоптотическую гибель и структуру ДНК.

**Цитотоксичность аурумакрила.** Установлено, что аурумакрил обладает цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от времени воздействия препарата и его концентрации. Максимальный эффект — гибель 61% клеток — наблюдается через 24 ч после воздействия аурумакрила в концентрации 1000 мкг/мл (рис. 1)

Расчетная доза, летальная для 50% опухолевых клеток ( $IC_{50}$ ), определенная в тесте с использованием красителя трипановый синий, составляет для аурумакрила 720 мкг/мл (58 мкг/мл в пересчете на содержание золота).

Следует отметить, что ранее при оценке цитотоксичности аурумакрила с помощью МТТ-теста было установлено, что коэффициент  $IC_{50}$  препарата составляет 125 мкг/мл (10 мкг/мл в пересчете на содержание золота) [12].

Можно полагать, что столь существенные отличия в показателях цитотоксического эффекта препарата отражают разницу в чувствительности примененных методов оценки гибели клеток, в основе которых лежит использование различных реагентов — трипанового синего и МТТ, и не оказывают принципиального влияния на оценку аурумакрила как высокоактивного цитотоксического агента.

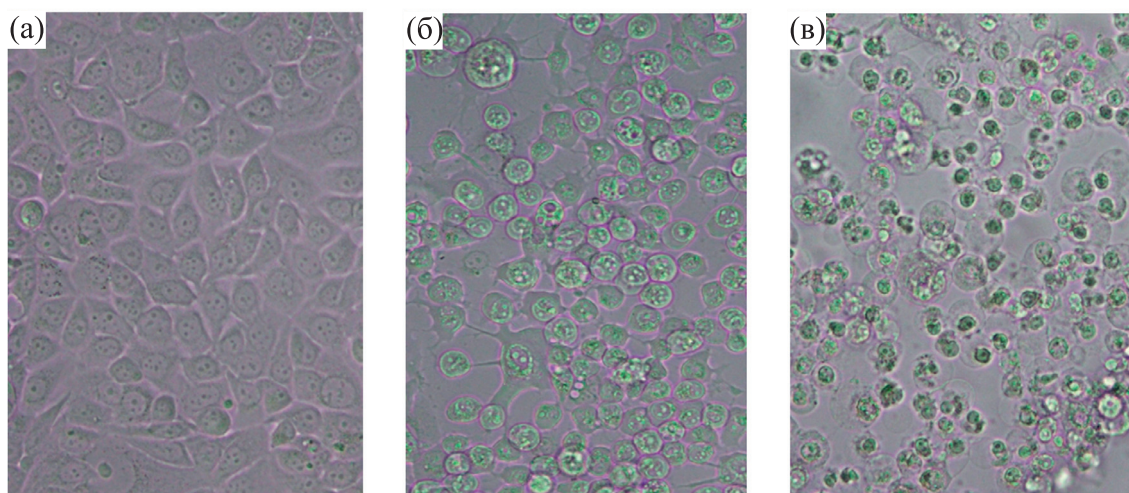


Рис. 2. Микрофотографии клеток MCF-7 после инкубации с аурумакрилом (1000 мкг/мл) в течение 1 ч (а), 6 ч (б) и 24 ч (в).

**Влияние аурумакрила на морфологическую структуру клеток.** Воздействие аурумакрила в концентрации 1000 мкг/мл вызывает изменения в морфологической структуре клеток MCF-7.

Как видно из представленных на рис. 2 микрофотографий, уже через 6 ч инкубации с препаратом клетки приобретают несвойственную им округлую форму (рис. 2б), а через 24 ч — сжимаются и уменьшаются в размерах (рис. 2в).

**Механизм гибели клеток под влиянием аурумакрила.** Изменения доли апоптотических клеток среди погибших клеток в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила характеризуют данные, представленные на рис. 3.

Как видно, при увеличении времени инкубации клеток с аурумакрилом с 1 до 24 ч наблюдается закономерное снижение доли апоптотических

клеток среди общего числа погибших клеток для всех изученных концентраций препарата. Наиболее значительное снижение доли апоптотических клеток отмечено при 24-часовой инкубации, при которой регистрировалась наибольшая гибель клеток.

Полученные данные позволяют предположить, что гибель клеток, индуцированная аурумакрилом, происходит не благодаря развитию апоптоза, а является следствием других процессов, возможно, связанных с нарушением митотического цикла клеток, о чем упоминалось ранее [7].

Известно, что одним из механизмов цитотоксичности наночастиц золота может быть блок клеточного цикла. В ряде исследований показано блокирование клеток в  $G_1$ -фазе, накопление кле-

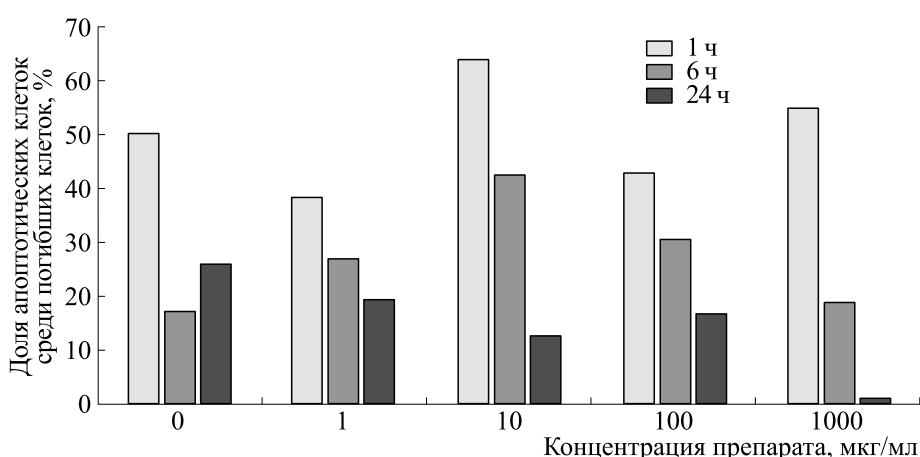
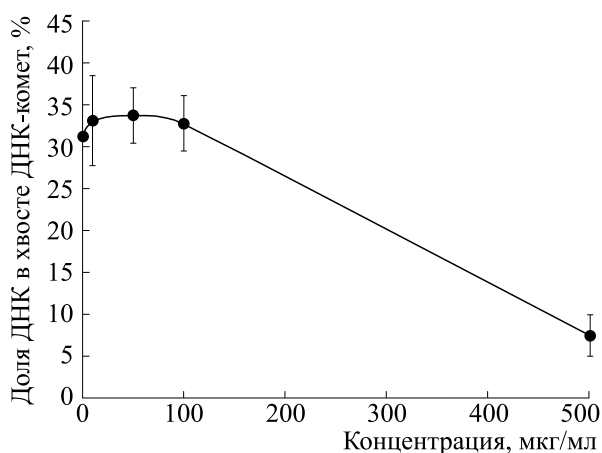


Рис. 3. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток MCF-7 в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила.



**Рис. 4.** Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет клеток MCF-7 в зависимости от концентрации аурумакрила.

ток в фазе  $G_0/G_1$  и уменьшение содержания клеток в S- и  $G_2/M$ -фазах под влиянием золотосодержащих препаратов [1, 2].

Нами, в частности, было показано, что аурумакрил вызывает значительные изменения в клеточной кинетике опухоли. Так, доля «покоящихся» клеток через 24 ч инкубации с аурумакрилом возрастает с 40%, наблюдающихся в контроле, до 93%, регистрируемых на этот срок при воздействии препарата в дозе 1000 мкг/мл. Наряду с этим среди выживших клеток наблюдается уменьшение под влиянием аурумакрила доли делящихся клеток с 60%, регистрируемых в это время в контроле, до 7%, что было расценено как репродуктивная гибель клеток [7].

**Индукция сшивок ДНК аурумакрилом.** Известно, что при анализе структурных изменений ДНК методом ДНК-комет доля фрагментированной ДНК, мигрирующей во время электрофореза в ге-

ле агарозы к аноду и создающей так называемый «хвост» ДНК-комет, регистрируется путем оценки показателя электрофоретической подвижности ДНК.

Как видно из данных, представленных на рис. 4, воздействие аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл приводит к снижению доли неповрежденной и фрагментированной ДНК в хвосте кометы. Доля ДНК в хвосте ДНК-комет под влиянием препарата снижается примерно в четыре раза — с 31.2%, регистрируемых в контрольном образце, до 7.4%, определяемых в клетках, подвергавшихся воздействию аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл (рис. 4). Соответственно возрастает доля «сшитой» ДНК, остающейся в голове ДНК-кометы и не мигрирующей к аноду.

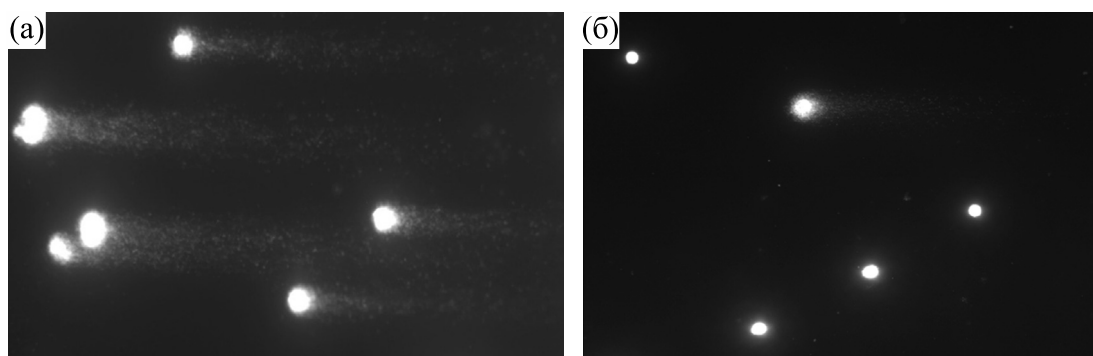
Полученные данные свидетельствуют о выраженном влиянии аурумакрила на структуру ДНК опухолевых клеток, выражающемся в индуцировании препаратом сшивок ДНК.

Морфологические изменения, происходящие с клетками MCF-7 под влиянием аурумакрила, наглядно иллюстрируют микрофотографии ДНК-комет (рис. 5).

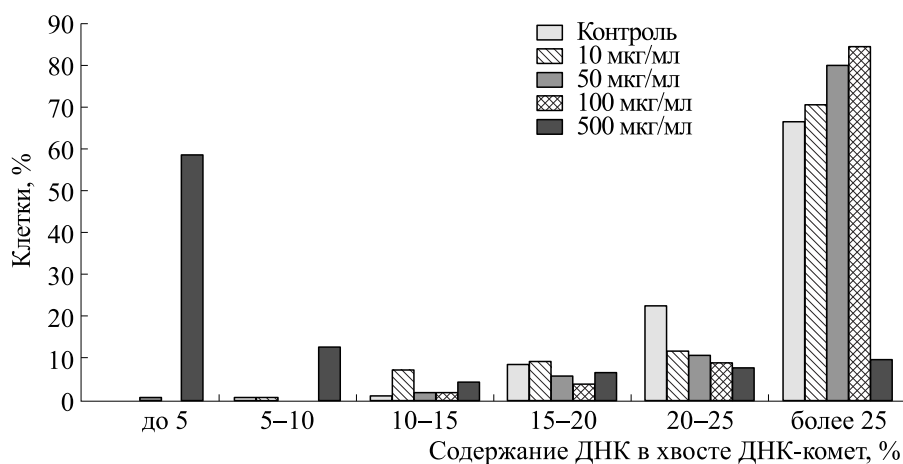
В контроле отчетливо виден «хвост» ДНК-кометы, содержащий неповрежденную ДНК, выход которой составляет более 30% (рис. 5а), в то время как после воздействия аурумакрила наблюдается практически полное исчезновение «хвостов» ДНК-комет и сжимание, уменьшение в размерах ядер у основного количества клеток (рис. 5б).

Распределение клеток карциномы молочной железы MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет через 1 ч после инкубации с аурумакрилом (500 мкг/мл), показано на рис. 6.

Как видно, около 70% клеток карциномы молочной железы MCF-7 в контроле после проведе-



**Рис. 5.** Микрофотографии ДНК-комет клеток карциномы молочной железы MCF-7: (а) — контроль, (б) — аурумакрил (500 мкг/мл, инкубация 1 ч). Напряженность электрического поля 2.0 В/см.



**Рис. 6.** Распределение клеток аденокарциномы молочной железы MFC-7 в соответствии с содержанием ДНК в хвосте ДНК-комет после воздействия аурумакрила в различных концентрациях (инкубация 1 ч).

ния электрофореза содержали более 25% ДНК в хвосте ДНК-комет.

Аналогичное распределение клеток в соответствии с содержанием ДНК в хвосте ДНК-комет наблюдается для клеток, подвергавшихся в течение часа воздействию аурумакрила в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл.

Иное распределение клеток наблюдается при воздействии аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл. Показано, что среди 60% проанализированных клеток менее 5% клеток содержали ДНК в хвосте ДНК-комет, что свидетельствует о выраженной способности аурумакрила вызывать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток (рис. 6).

Таким образом, в результате исследования влияния аурумакрила на клетки карциномы молочной железы MFC-7 человека установлено:

– аурумакрил, будучи активным цитотоксическим агентом, вызывает гибель клеток и изменение их морфологической структуры;

– апоптоз не является доминирующим механизмом в индуцированной аурумакрилом гибели клеток;

– молекулярный механизм действия аурумакрила на опухолевые клетки связан с индукцией сшивок в молекуле ДНК.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, Л. А. Островская, Н. В. Блюхтерова и др., *Биофизика*, **66** (6), 1229 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106020X
2. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии*, **64** (6), 697 (2018).
3. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика*, **38** (12), 64 (2019).
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Рос. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 74 (2020).
5. L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Therapy*, **1** (2), 59 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.12010
6. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Изв. РАН. Сер. хим.*, **66** (12), 2333 (2017).
7. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Биофизика*, **62** (3), 598 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917030150
8. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **66** (5), 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
9. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (1), 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
10. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (5), 951 (2022).
11. R. Kopp, A. Krautloher, A. Ramírez-Fernández, et al., *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 183 (2019).
12. S. Fujisawa, Y. Romin, A. Barlas, et al., *Cytotechnology*, **66**, 259 (2013).

**Aurum Polyacrylate: Mechanism of Cytotoxic Action on Tumor Cells****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*

The role of aurum polyacrylate (aurumacryl)-induced apoptosis in tumor cells as well as the effect of this antitumor drug on the DNA structure of human breast carcinoma cells MCF-7 were studied. It was established that aurumacryl as an active cytotoxic agent can induce cell death, produce cellular morphological changes, and cause crosslinking in a DNA molecule. It was shown that apoptosis is not a dominant mechanism in aurumacryl-induced cell death.

*Keywords: aurum polyacrylate (aurumacryl), MCF-7 cell culture, cytotoxicity, apoptosis, DNA cross-linking*