

МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАКРИЛАТОВ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

© 2023 г. А.К. Чигасова, Л.А. Островская*, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова

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

*E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 04.10.2023 г.

После доработки 04.10.2023 г.

Принята к публикации 18.10.2023 г.

Проведено сравнительное изучение цитотоксической активности и механизма действия полиакрилатов, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил) в отношении клеток опухоли человека (культура клеток MCF-7). Показана высокая цитотоксическая активность препаратов. Обнаружено, что аргакрил в 20 раз превосходит по эффективности аурумакрил. Установлено, что апоптоз является доминирующим механизмом в индуцируемой аурумакрилом и аргакрилом гибели опухолевых клеток. Обнаружены различия во влиянии препаратов на структуру ДНК опухолевых клеток.

Ключевые слова: полиакрилаты золота и серебра, культура опухолевых клеток человека MCF-7, цитотоксическая активность, апоптоз, ДНК опухолевых клеток.

DOI: 10.31857/S0006302923060108, EDN: RORUYD

Соединения, содержащие благородные металлы, как показали исследования последних лет, обладают разносторонней биологической, в том числе противоопухолевой активностью [1].

Проведенные нами доклинические исследования в ряду новой для онкологии группы соединений — металлополиакрилатов — позволили выявить значительную противоопухолевую и цитотоксическую активность полиакрилатов, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил), на моделях солидных опухолей животных и клеточных линиях опухолей человека [1–4].

Показано, что природа металла, содержащегося в полимерном соединении, может оказывать весьма существенное влияние на метаболизм препаратов, их взаимодействие с биомакромолекулами, механизм действия, и как следствие этого, на чувствительность опухолевых клеток различного генеза к изучавшимся препаратам [1, 5].

В данной работе приведены результаты сравнительного изучения цитотоксической активности аурумакрила и аргакрила в отношении клеток опухоли человека (культура клеток MCF-7), а также некоторых аспектов механизма действия препаратов, включая исследование механизма гибели клеток и влияния соединений на структуру ДНК опухолевых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Исследовавшиеся полиметаллоакрилаты представляют собой неполные металлические соли полиакриловой кислоты, содержащие ионы благородных металлов (8 масс. %). Аурумакрил — неполная золотая соль полиакриловой кислоты, отвечает общей формуле $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAgCl}_3\text{H}-)_m$, аргакрил — неполная серебряная соль полиакриловой кислоты, отвечает общей формуле $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAg}-)_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимеров составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препаратов содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720, 1570 см^{-1} . Субстанции препаратов представляют собой стекловидные пластинки золотистого (аурумакрил) и серебристого (аргакрил) цвета, хорошо растворимые в воде [1].

Оценка цитотоксического эффекта препаратов *in vitro* проведена при их применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 100 до 1000 мкг/мл для аурумакрила и от 10 до 500 мкг/мл для аргакрила.

Культура клеток. Экспериментальной моделью служила клеточная культура рецептор-положительной карциномы молочной железы человека

линии MCF-7, полученная из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Оценка цитотоксического эффекта и анализ апоптотической гибели клеток. Для оценки жизнеспособности клеток использовали йодистый пропиций из коммерческого набора Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4 (Invitrogen, США) [6].

В исследуемые временные точки (через 1, 6 и 24 ч после воздействия препаратов) клетки дважды промывали раствором Хенкса и снимали их с поверхности чашек 0.25%-м раствором трипси-на-ЭДТА («ПанЭко», Россия). Затем к 1 мл клеточной суспензии в растворе Хенкса добавляли 1 мкл раствора йодистого пропиция из упомянутого коммерческого набора. Клетки инкубировали 20 мин при 4°C, ресуспендировали и помещали в камеру Горяева для подсчета погибших клеток.

Подсчет клеток проводили с помощью люминесцентного микроскопа Eclipse Ni-U (Nikon, Япония) с набором светофильтров: 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 пропиция (возбуждение на 540–580 нм и эмиссия на 600–660 нм). Анализировали по 600 клеток для каждой точки.

Для определения пути гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аурумакрила и аргакрила 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 [7]. 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 пропиций, не обладают этим свойством в данных условиях. Таким образом, YO-PRO-1 может служить ранним маркером апоптотической гибели клеток [8]. Добавление йодистого пропиция позволяет дифференцированно 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 пропицием (Invitrogen, США). Клетки окрашивали в соответствии с протоколом производителя.

В исследуемые временные точки (через 1, 6 и 24 ч после воздействия препаратов) клетки дважды промывали раствором Хенкса и снимали их с поверхности чашек 0.25%-м раствором трипси-на-ЭДТА («ПанЭко», Россия). Затем к 1 мл клеточной суспензии в растворе Хенкса добавляли по 1 мкл раствора YO-PRO-1 и йодистого пропиция из упомянутого 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 с набором светофильтров: 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 пропиция (возбуждение на 540–580 нм и эмиссия на 600–660 нм). Анализировали по 300 клеток для каждой точки.

Анализ одонитевых разрывов ДНК. Для анализа одонитевых разрывов ДНК, индуцированных аурумакрилом и аргакрилом, использовали метод электрофореза единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет) [9].

Суспензию контрольных или обработанных препаратами клеток MCF-7 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 60 мин 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 щелочному электрофорезу (раствор для электрофореза: 300 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л Na₂ЭДТА, pH >13; стабилизация по напряжению — 0.75 В/см; 20 мин при 4°C) 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, pH 7.4). Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U, оснащенный видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab).

Образование одонитевых разрывов в структуре ДНК определяли по уровню миграции ДНК в геле агарозы, используя показатель «процент ДНК в хвосте ДНК-комет». Влияние препаратов на образование одонитевых разрывов ДНК оценивали, сравнивая показатель «процент ДНК в хвосте ДНК-комет» в обработанных препаратами

золота и серебра клетках с аналогичным показателем в контрольных клетках. Повышение этого показателя в клетках, инкубированных с препаратами, по сравнению с контрольными клетками свидетельствует о том, что аурумакрил и аргакрил в исследуемых концентрациях индуцируют однонитевые разрывы.

Анализ двунитевых разрывов ДНК. Для выяснения способности аурумакрила и аргакрила индуцировать двунитевые разрывы ДНК использовали иммуноцитохимический метод определения в клетках фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), детектирующего двунитевой разрыв ДНК. Полагают, что один фокус H2AX соответствует сайту репарации одного двунитевого разрыва ДНК [9].

Клетки на покровных стеклах дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и фиксировали параформальдегидом (4%-й раствор в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4) в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали фосфатно-солевым буфером, pH 7.4. Пермеабилizировали 0.3%-м раствором Тритон-X100 в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания.

Слайды инкубировали с кроличьими моноклональными антителами к белку γ H2AX (Anti-phospho-Histone H2A.X Rabbit Monoclonal, Merck—Millipore, США) и с мышинными моноклональными антителами к белку Ki-67 (Anti-Ki-67, Merck—Millipore, США), разведенными в соотношении 1/200 в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина, в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого слайды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом родамином (Goat anti-Rabbit IgG(H+L) Rhodamine conjugate, Merck—Millipore, США) и с вторичными козыми поликлональными антителами к мышинному Ig G с красителем Alexa 488 (Merck—Millipore, США), разведенными в соотношении 1/400 в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина, при комнатной температуре в течение 1 ч.

Для окраски ДНК и предотвращения фотовыцветания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U, оснащенный видеокамерой высокого разрешения ProgRes CFcool с использованием наборов светофильтров DAPI (возбужде-

ние 340–380 нм и эмиссия 435–485 нм) и Y-2E/C (возбуждение 540–580 нм и эмиссия 600–660 нм).

Анализировали не менее 300 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов γ H2AX использовали программу Focicounter (<http://focicounter.sourceforge.net/>).

Анализ ДНК-сшивок. Изучение влияния препаратов на ДНК опухолевых клеток MCF-7 проводили путем детектирования сшивок ДНК с использованием метода ДНК-комет в щелочных условиях [10].

Клетки инкубировали с препаратами 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 (pH 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспензию, содержащую $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Суспензию контрольных или обработанных препаратами 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 10 мин при 4°C. 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 щелочной денатурации с последующим проведением электрофореза (раствор для щелочной денатурации и электрофореза: 100 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л Na₂ЭДТА, pH 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 краситель акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4).

Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U, оснащенный видеокамерой ProgRes CFcool. Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2.

Анализ сшивок «ДНК–белок». Изучение влияния препаратов на индукцию сшивок «ДНК–белок» проводили с использованием модифицированного метода ДНК-комет в щелочных условиях с применением протеиназы K, которая вызывает разрывы сшивок между ДНК и гистоновыми белками, что приводит к увеличению электрофоретической подвижности ДНК в геле агарозы [10].

Клетки инкубировали с препаратами 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 (pH 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и пере-

водили в суспензию, содержащую $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Суспензию контрольных или обработанных препаратами 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 препараты (слайды) клеток, контрольные и обработанные препаратами, помещали в лизирующий буфер с pH 10, содержащий протеиназу К (2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 2 мг/мл протеиназы К) на 60 мин при 37°C , после чего проводили щелочную денатурацию с последующим проведением электрофореза (раствор для щелочной денатурации и электрофореза: 100 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, pH 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 краситель акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4).

Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U, оснащенном видеокамерой ProgRes CFcool. Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ Statistica 7.0 и Statistica 8.0. Результаты представлены как среднее из пяти независимых измерений с учетом стандартной ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитотоксический эффект металлополиакрилатов. Проведено сравнительное изучение закономерностей гибели клеток рака молочной железы MCF-7 под влиянием аурумакрила и аргакрила в зависимости от примененных концентраций препаратов и сроков их инкубирования с клетками в экспериментах с использованием йодистого пропидия.

Цитотоксический эффект аурумакрила. Закономерности, характеризующие гибель клеток в зависимости от концентрации аурумакрила для различных сроков воздействия препарата, представлены на рис. 1.

При воздействии аурумакрила в течение 1 ч максимальная гибель опухолевых клеток составляет 54% и наблюдается при применении препарата в максимальной из изученных концентраций (500 мкг/мл). В концентрациях 100 и 300 мкг/мл

препарат при такой краткосрочной инкубации неэффективен (рис. 1а).

При увеличении сроков инкубации до 6 ч гибель клеток возрастает до 65 и 99% при применении аурумакрила в концентрациях 300 и 500 мкг/мл соответственно (рис. 1б).

При воздействии аурумакрила в течение 24 ч препарат вызывает практически полную гибель клеток (96–99%) при применении в концентрациях 300 и 500 мкг/мл (рис. 1в).

Аурумакрил при использовании в концентрации 100 мкг/мл при всех изученных временных экспозициях не проявляет цитотоксической активности в отношении клеток MCF-7 (рис. 1).

Изменение доли погибших клеток в зависимости от сроков инкубирования с максимально эффективной концентрацией аурумакрила 500 мкг/мл иллюстрируют данные, представленные на рис. 2.

Как видно, уже через 1 ч инкубирования клеток с 500 мкг/мл аурумакрила погибает 54% клеток, а при увеличении длительности воздействия препарата до 6 и 24 ч погибает 99 и 100% клеток соответственно (рис. 2).

Показатель IC_{50} , характеризующий гибель 50% клеток при инкубировании с аурумакрилом в течение 24 ч, составляет 200 мкг/мл ($IC_{50} = 16.0$ мкг/мл в пересчете на содержание золота) (рис. 1в).

Цитотоксический эффект аргакрила. Кривые, характеризующие изменения доли погибших клеток в зависимости от концентрации аргакрила для разных сроков воздействия препарата, представлены на рис. 3.

Как видно, при воздействии препарата в течение 1 ч максимальная гибель клеток составляет 85% при применении препарата в наибольшей из изученных концентраций, равной 500 мкг/мл (рис. 3а).

При увеличении длительности воздействия препарата до 6 и 24 ч полная гибель всех 100% клеток регистрируется при применении аргакрила уже в значительно меньших концентрациях (250 и 100 мкг/мл соответственно (рис. 3б,в).

Чрезвычайно высокую цитотоксичность аргакрила в отношении клеток линии MCF-7 наглядно иллюстрируют кривые, характеризующие гибель клеток в зависимости от времени инкубации с препаратом, примененным в концентрациях 100, 250 и 500 мкг/мл, приведенные на рис. 4.

Из представленных данных видно, что абсолютная летальная концентрация аргакрила, вызывающая гибель всех 100% клеток, составляет 250 мкг/мл (20 мкг/мл в пересчете на содержание серебра) уже через 6 ч инкубирования с препаратом.

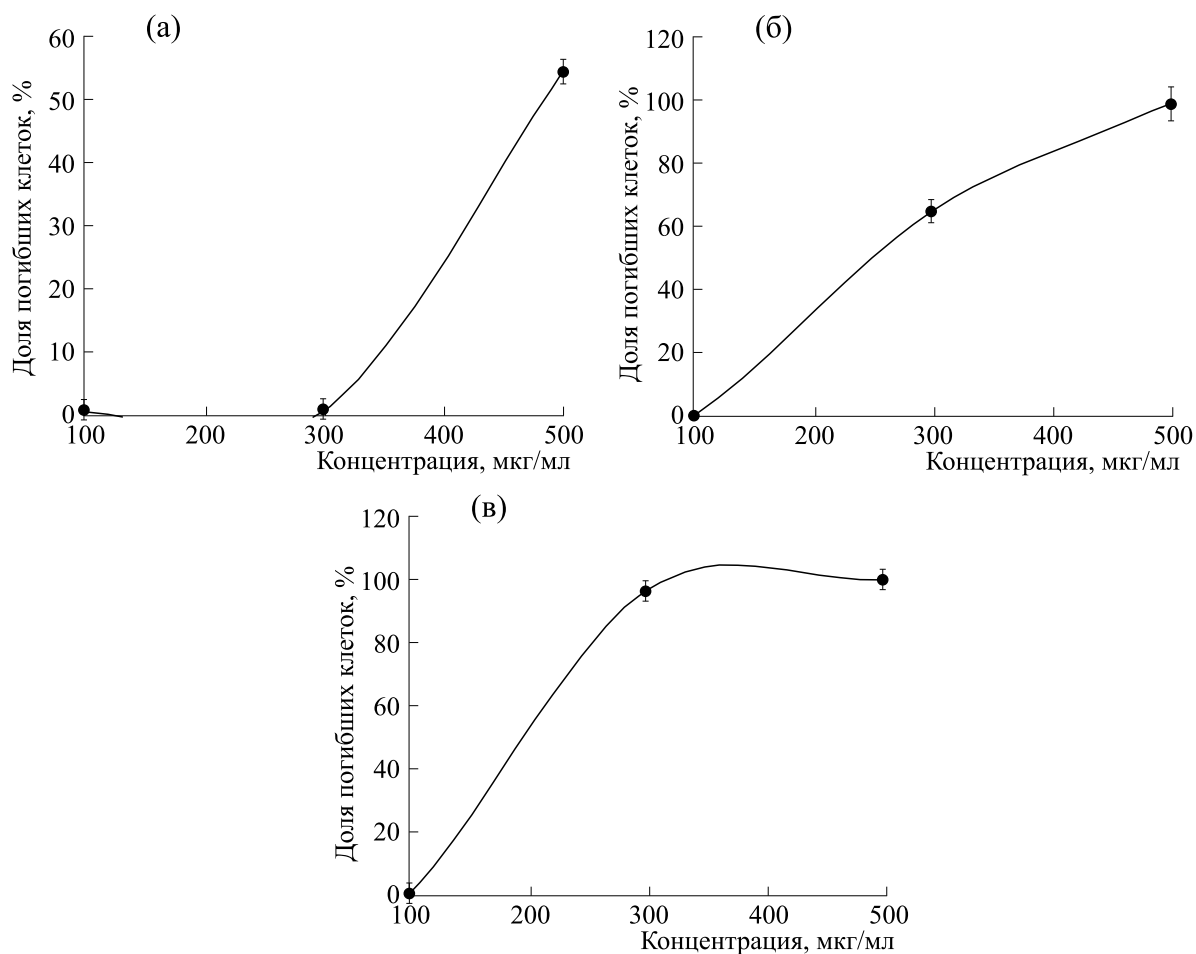


Рис. 1. Концентрационные зависимости гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аурумакрила для различных времен инкубации с препаратом: (а) – 1 час, (б) – 6 часов, (в) – 24 часа. По оси абсцисс – концентрация аурумакрила, мкг/мл. По оси ординат – доля погибших клеток, %.

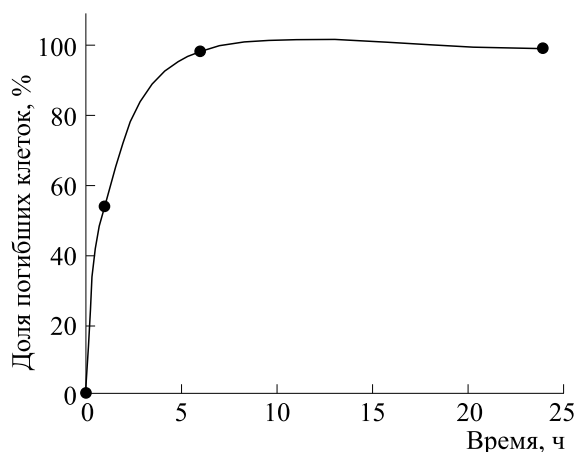


Рис. 2. Изменение доли погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл. По оси абсцисс – время инкубирования клеток с аурумакрилом, ч. По оси ординат – доля погибших клеток, %.

Показатель IC_{50} , характеризующий гибель 50% клеток при инкубировании с аргакрилом в течение 24 ч, составляет менее 10 мкг/мл ($IC_{50} < 0.8$ мкг/мл в пересчете на содержание серебра) (рис. 3в).

Сопоставляя данные по характеристике цитотоксического эффекта аурумакрила и аргакрилла в отношении клеток рака молочной железы человека линии MCF-7, полученные в опытах с применением йодистого пропидия, следует отметить, что показатель IC_{50} , характеризующий гибель 50% клеток при инкубировании с препаратами в течение 24 ч, составляет (в пересчете на содержание металла) 16.0 и 0.8 мкг/мл соответственно.

Таким образом полученные данные свидетельствуют о высокой цитотоксической активности препаратов, содержащих как золото, так и серебро, в отношении клеток опухоли человека линии MCF-7, однако необходимо отметить, что аргакрил в 20 раз превосходит по эффективности аурумакрил.

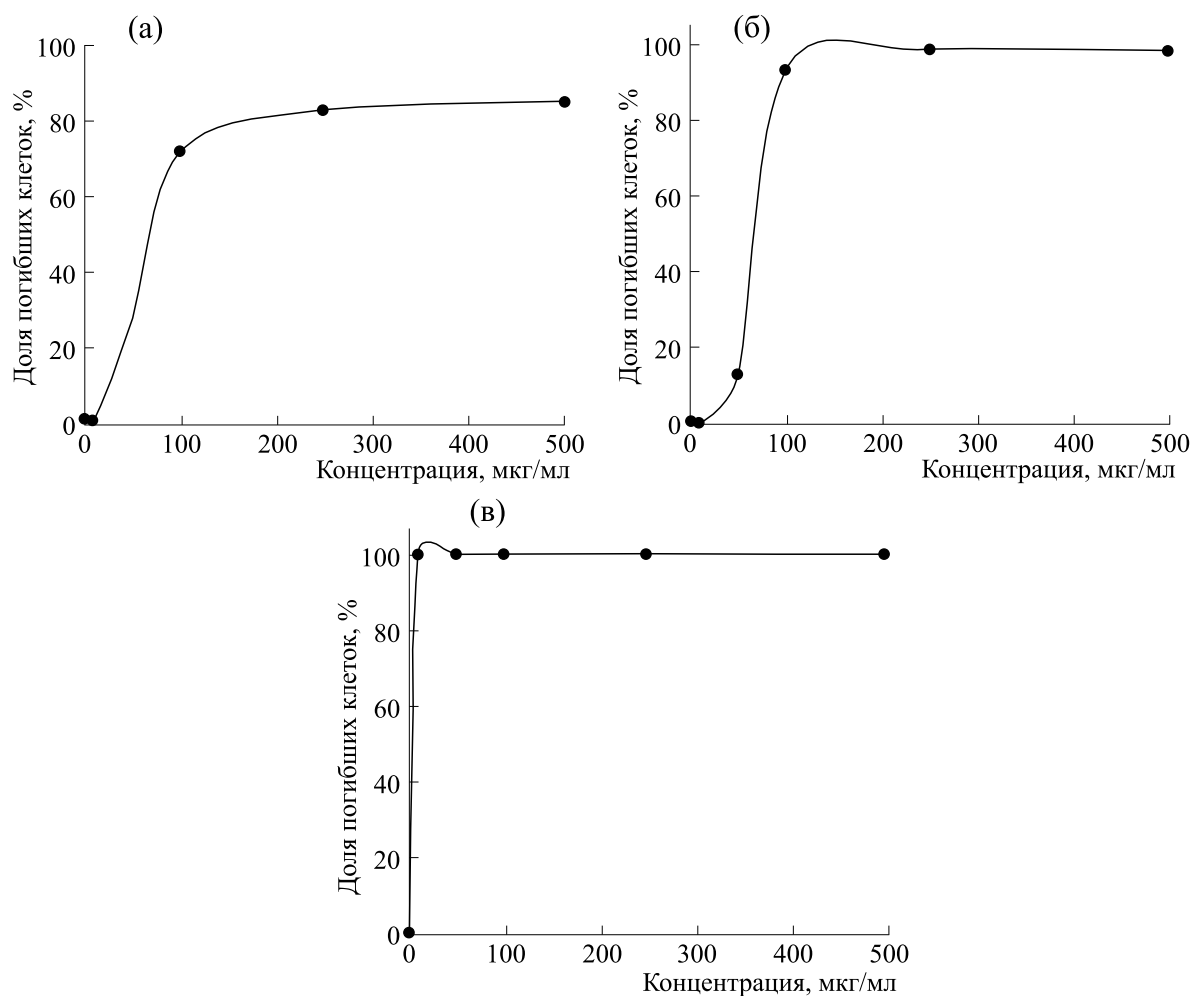


Рис. 3. Концентрационные зависимости гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аргакрила для различных времен инкубации с препаратом: (а) – 1 час, (б) – 6 часов, (в) – 24 часа. По оси абсцисс – концентрация аргакрила, мкг/мл. По оси ординат – доля погибших клеток, %

Механизм гибели опухолевых клеток под влиянием металлополиакрилатов. Соединения, содержащие золото и серебро, подобно другим противоопухолевым препаратам, способны вызывать как некротическую, так и апоптотическую гибель клеток.

Задача проведенных нами исследований состояла в оценке роли апоптоза в индуцируемом аурумакрилом и аргакрилом процессе гибели опухолевых клеток.

Для определения пути гибели клеток линии MCF-7 под влиянием препаратов использовали ранее описанный метод оценки доли апоптотических клеток среди всех погибших клеток [6].

Апоптотическая гибель опухолевых клеток под влиянием аурумакрила. Изменение доли апоптотических клеток среди погибших клеток в зависимости от концентрации аурумакрила для различных времен воздействия препарата характеризуют данные, представленные на рис. 5.

Как видно из представленных данных, изменение доли клеток, погибающих путем апоптоза, среди общего количества погибших под влиянием аурумакрила клеток имеет выраженный доза и экспозиционно зависимый характер.

Так, концентрация 100 мкг/мл не вызывает апоптотической гибели клеток ни при одном из изученных сроков инкубации (рис. 5).

Доза аурумакрила 300 мкг/мл не вызывающая гибели клеток при часовой экспозиции, при инкубации в течение 6 и 24 ч приводит к апоптотической гибели 65 и 97% из общего числа погибших клеток соответственно (рис. 5).

Применение препарата в концентрации 500 мкг/мл приводит к гибели через апоптоз 55 и 99% клеток через 1, 6 и 24 ч инкубирования соответственно, что особенно четко иллюстрирует зависимость, представленная на рис. 6.

Таким образом, очевидно, что аурумакрил, будучи применен в цитотоксических концентраци-

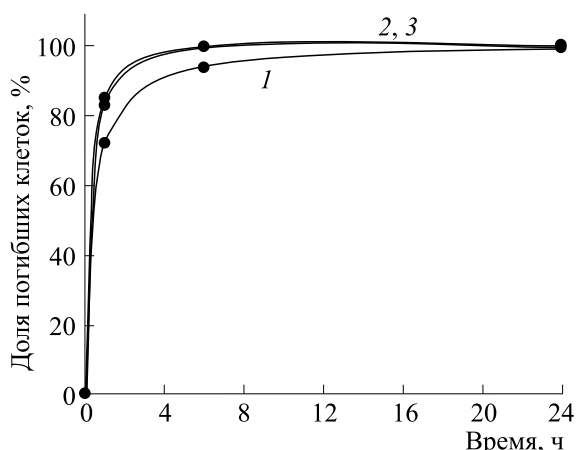


Рис. 4. Изменение доли погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аргакрила в различных концентрациях: 1 — 100 мкг/мл, 2 — 250 мкг/мл, 3 — 500 мкг/мл. По оси абсцисс — время инкубирования клеток с аргакрилом, ч. По оси ординат — доля погибших клеток, %.

ях, индуцирует гибель клеток преимущественно через апоптоз, что особенно наглядно проявляется при применении препарата в максимальной из изученных концентраций — 500 мкг/мл, вызывающей практически полную гибель опухолевых клеток MCF-7 (рис. 4 и 6).

Апоптотическая гибель опухолевых клеток под влиянием аргакрила. Способность аргакрила вызывать апоптотическую гибель опухолевых клеток исследована при применении препарата в концентрациях 10, 50, 100, 250 и 500 мкг/мл.

Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток в зависимости от концентрации аргакрила для разных времен инкубации клеток с препаратом показано на рис. 7.

Зависимость изменения доли апоптотических клеток от времени воздействия аргакрила в различных концентрациях иллюстрируют данные, представленные на рис. 8.

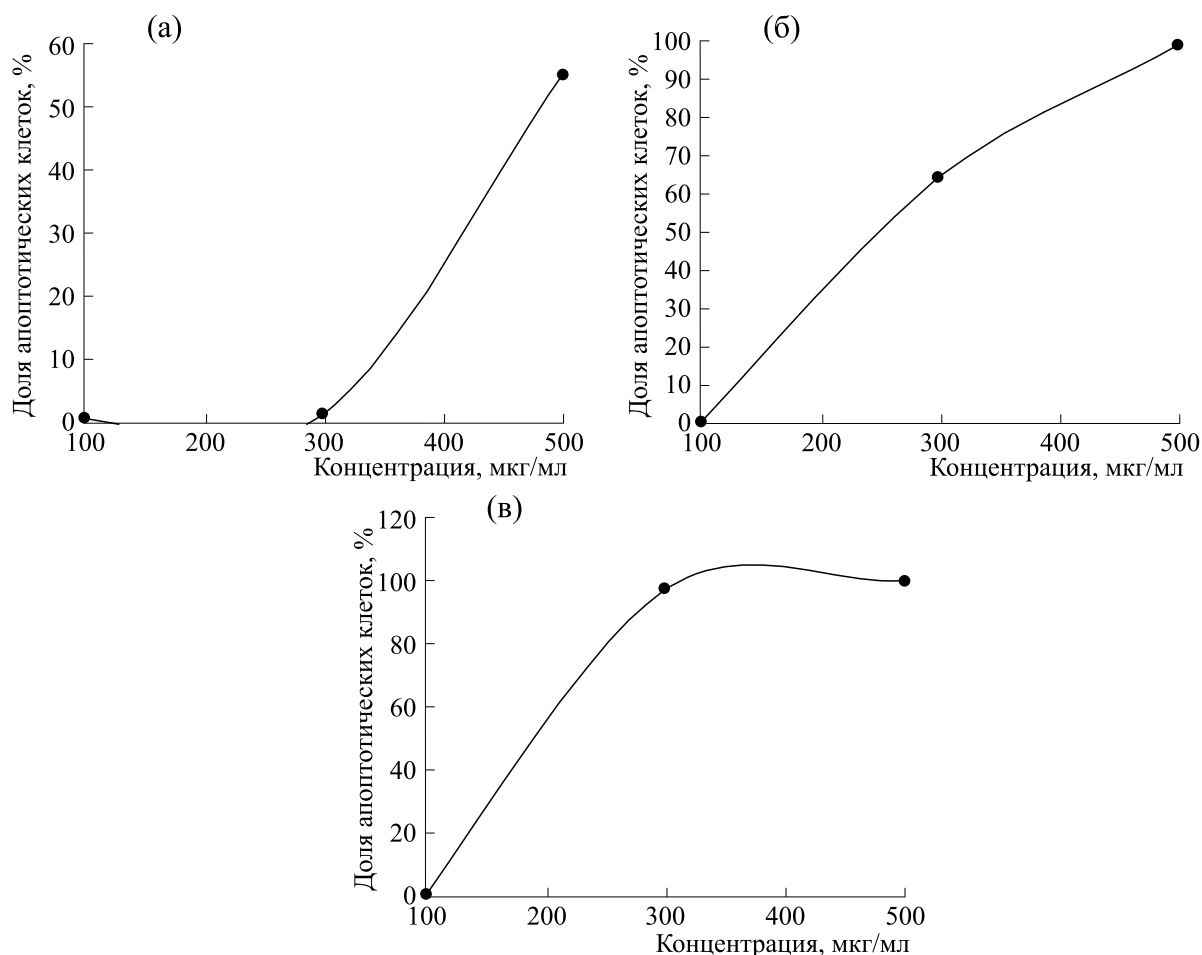


Рис. 5. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток MCF-7 в зависимости от концентрации аурумакрила для различных времен инкубации: (а) — 1 час, (б) — 6 часов, (в) — 24 часа. По оси абсцисс — концентрация аурумакрила, мкг/мл. По оси ординат — доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %.

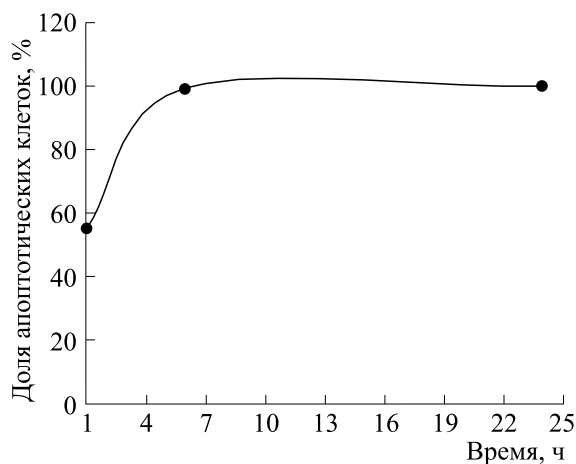


Рис. 6. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аурумакрила (500 мкг/мл). По оси абсцисс — время инкубирования клеток с аурумакрилом, ч. По оси ординат — доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %.

Как было показано, аргакрил проявляет значительно более высокую цитотоксическую активность, чем аурумакрил (рис. 2 и 4).

Это находит свое отражение и в концентрационных закономерностях, характеризующих изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших под влиянием аргакрила клеток.

Как видно, уже при применении в дозе 50 мкг/мл аргакрил вызывает апоптотическую гибель 30, 40 и 50% клеток при инкубировании в течение 1; 6 и 24 ч соответственно (рис. 7).

С увеличением концентрации препарата и времени его воздействия доля апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток нарастает.

Так, при применении аргакрила в концентрации 100 мкг/мл наблюдается апоптотическая гибель 70, 95 и 98% клеток через 1, 6 и 24 ч инкубирования соответственно (рис. 7 и 8).

Применение аргакрила в концентрации 250 мкг/мл вызывает апоптотическую гибель 80,

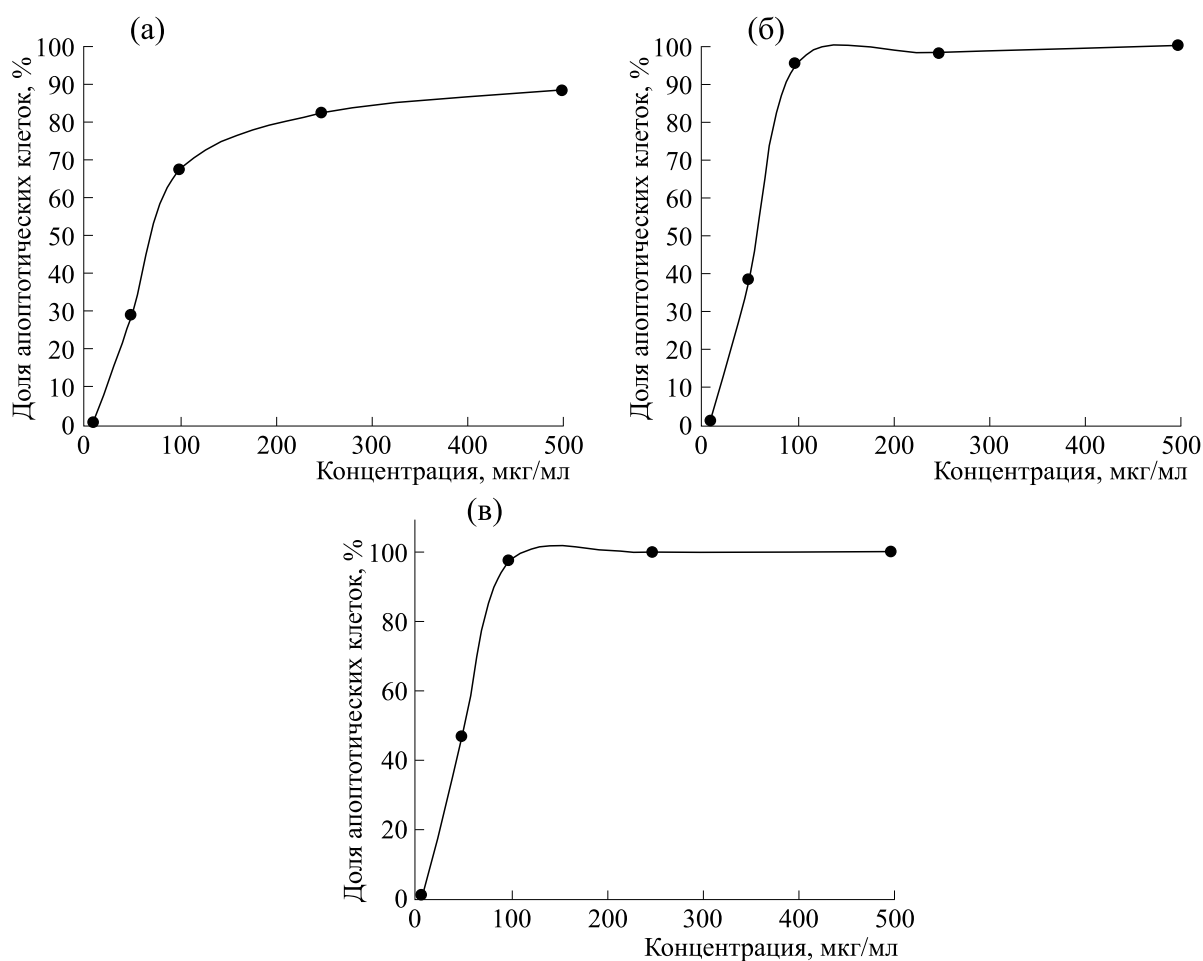


Рис. 7. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток MCF-7 в зависимости от концентрации аргакрила для различных времен инкубации: (а) — 1 час, (б) — 6 часов, (в) — 24 часа. По оси абсцисс — концентрация аргакрила, мкг/мл/ По оси ординат — доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %.

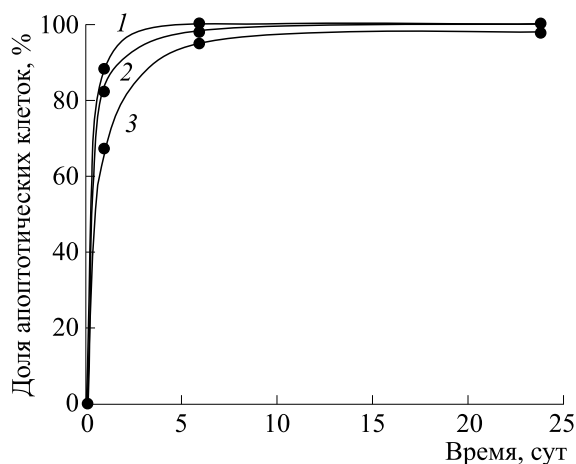


Рис. 8. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аргакрила в различных концентрациях: 1 — 500 мкг/мл, 2 — 250 мкг/мл, 3 — 100 мкг/мл. По оси абсцисс — время инкубирования клеток с аргакрилом, сут. По оси ординат — доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %.

98 и 100% клеток через 1; 6 и 24 ч инкубирования соответственно. В концентрации 500 мкг/мл аргакрил вызывает тотальную гибель опухолевых клеток по апоптотическому пути при всех изученных временах экспозиции (рис. 7 и 8).

Таким образом, показано, что высокая цитотоксическая активность аргакрила в значительной мере обусловлена способностью препарата вызывать апоптотическую гибель опухолевых клеток.

Основываясь на представленных результатах можно полагать, что апоптоз является доминирующим механизмом в индуцируемой аурумакрилом и аргакрилом гибели опухолевых клеток.

Влияние металлополиакрилатов на структуру ДНК опухолевых клеток. Одной из ключевых внутриклеточных мишеней, воздействие на которую может приводить к гибели опухолевых клеток, является ДНК, что подтверждает многолетний клинический опыт использования алкилирующих противоопухолевых препаратов, до сих пор входящих в арсенал основных лекарственных средств, применяемых для лечения разнообразных опухолей [11].

Известно, что в результате структурных повреждений ДНК, могут возникать одно- и двунитевые разрывы ДНК, а также ДНК-сшивки, которые в случае отсутствия или дефектности репарации этих повреждений ведут к гибели клетки.

Целью настоящего исследования было изучение способности аурумакрила и аргакрила индуцировать разрывы ДНК и образование ДНК-

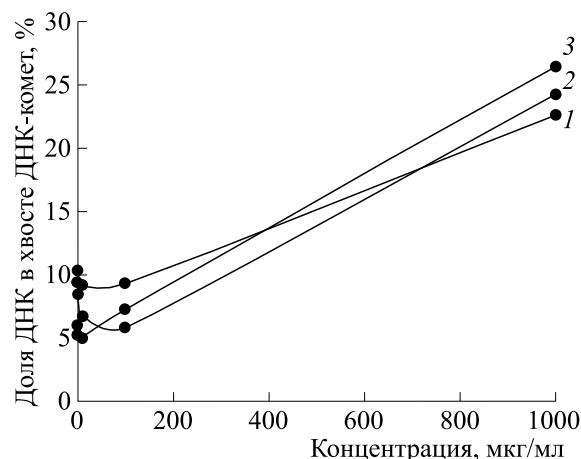


Рис. 9. Влияние аурумакрила на образование однонитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аурумакрила при различных сроках инкубации: 1 — 1 час; 2 — 6 часов; 3 — 24 часа.

сшивок в опухолевых клетках (культура клеток карциномы молочной железы человека MCF-7).

Однонитевые разрывы ДНК.

Аурумакрил. Влияние аурумакрила на образование однонитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7 характеризуют данные, представленные на рис. 9.

Как видно, аурумакрил индуцирует образование однонитевых разрывов ДНК при применении только в наибольшей из изученных концентраций 1000 мкг/мл, причем этот эффект незначительно зависит от сроков инкубирования клеток с препаратом. Так, доля ДНК в хвосте комет через 1, 6 и 24 ч инкубации клеток с препаратом составляет 22, 24 и 26%, увеличиваясь, соответственно, в 2,4; 4,7 и 4,5 раза по сравнению с контролем (рис. 9).

Этот эффект также наглядно иллюстрируют данные диаграммы распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет, в контроле и при воздействии аурумакрила (рис. 10).

Как видно из представленных на диаграмме данных, количество клеток с долей ДНК в хвосте ДНК-комет более 20% увеличилось после 6 ч культивирования с аурумакрилом с ~3% в контроле до 47%. Примерно такое же соотношение между числом клеток в хвосте ДНК-комет для интактных и обработанных аурумакрилом клеток зарегистрировано и после 24-часового инкубирования — 6 и 47% соответственно (рис. 10).

Таким образом, очевидно, что аурумакрил (1000 мкг/мл) индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 однонитевых разрывов ДНК, число которых возрастает в три-четыре

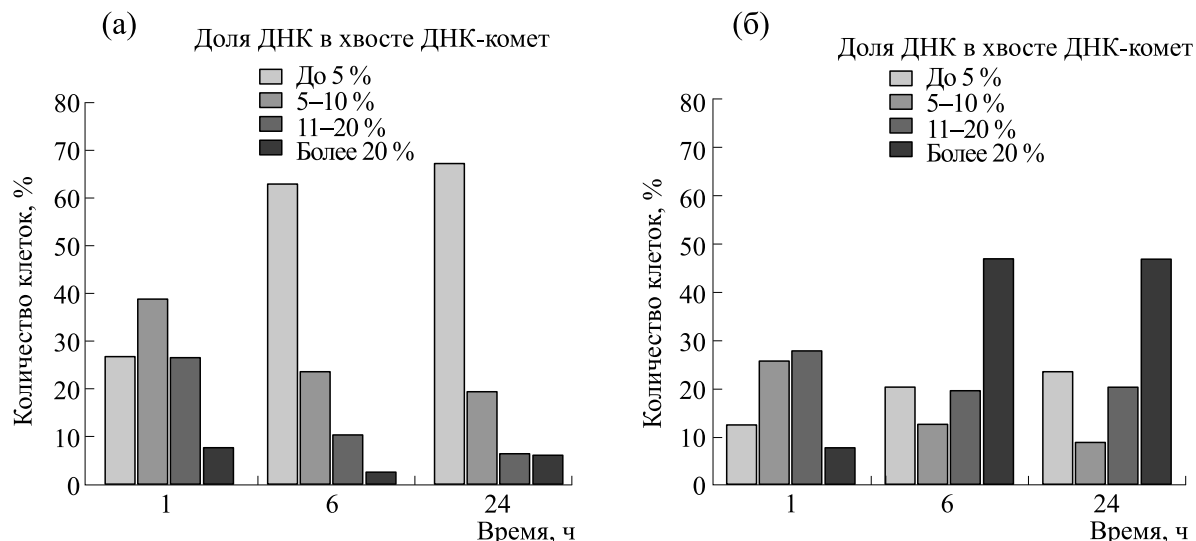


Рис. 10. Диаграмма распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет, в контроле (а) и при воздействии аурумакрила в концентрации 1 мг/мл (б) в зависимости от сроков инкубирования клеток с препаратом.

с половиной раза по сравнению со спонтанным уровнем разрывов ДНК, наблюдаемых в контроле, уже через 1 ч инкубации и сохраняется на протяжении 24 ч культивирования клеток.

Аргакрил. Влияние аргакрила на образование односторонних разрывов ДНК в клетках MCF-7 характеризуют данные, представленные на рис. 11.

Как видно из представленных данных, доля клеток в хвосте ДНК-комет увеличивается под влиянием аргакрила, примененного в концентрации 100 мкг/мл, более чем в шесть раз, а под воздействием препарата в концентрации 250 мкг/мл

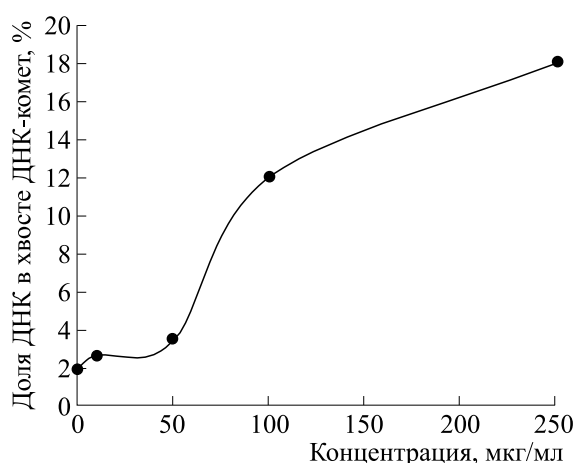


Рис. 11. Влияние аргакрила на образование односторонних разрывов ДНК в опухолевых клетках линии MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аргакрила при инкубации клеток с препаратом в течение 24 ч.

— в девять раз по сравнению с контролем (контрольное значение показателя составляет 1.88%) при инкубации с клетками в течение 24 ч (рис. 11).

Таким образом, очевидно, что аргакрил через 24 ч воздействия, будучи применен в концентрациях 100 и 250 мкг/мл, индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 односторонних разрывов ДНК, число которых возрастает соответственно в шесть и девять раз по сравнению со спонтанным уровнем, наблюдаемым в контроле.

Сопоставляя результаты экспериментов по оценке способности индуцировать образование односторонних разрывов ДНК препаратами, содержащими золото и серебро, следует отметить следующие факты:

— аурумакрил индуцирует образование в опухолевых клетках односторонних разрывов ДНК, число которых возрастает в три-четыре с половиной раза по сравнению со спонтанным уровнем разрывов ДНК, наблюдаемых в контроле, уже через 1 ч инкубации и сохраняется на протяжении 24 ч культивирования клеток при применении препарата в концентрации 1000 мкг/мл (рис. 9);

— аргакрил при воздействии в концентрациях 100 и 250 мкг/мл в течение 24 ч вызывает повреждения структуры ДНК в виде односторонних разрывов в шесть и девять раз превышающих уровень контроля соответственно (рис. 11).

Иными словами, при оценке действия препаратов по показателю способности к индукции односторонних разрывов ДНК очевидно, что аргакрил оказывает в два раза более значительный эффект при применении в концентрации в десять

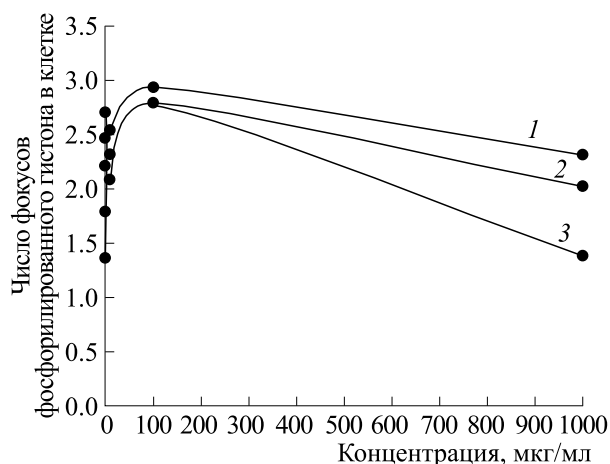


Рис. 12. Влияние аурумакрила на образование двунитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение числа фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в зависимости от концентрации аурумакрила при инкубации клеток в течение 1 часа (1), 6 часов (2) и 24 часов (3).

раз меньшей, чем концентрация аурумакрила (100 и 1000 мкг/мл соответственно).

Таким образом, как следует из представленных данных, аргакрил проявляет себя как значительно более эффективный индуктор одонитевых разрывов ДНК, чем аурумакрил, что, очевидно, отражает особенности взаимодействия содержащихся в исследуемых препаратах металлов — золота и серебра — с биомакромолекулами.

Двунитевые разрывы ДНК. Способность полиакрилатов золота и серебра вызывать двунитевые разрывы ДНК охарактеризована в соответствии с показателем уровня фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), регистрируемого в клетках MCF-7, подвергавшихся воздействию препаратов, по сравнению с контролем.

Аурумакрил. Изменение уровня фокусов γ H2AX в ДНК опухолевых клеток после инкубации в течение 1, 6 и 24 ч с аурумакрилом, примененным концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 10 до 1000 мкг/мл, показано на рис. 12.

Как видно, культивирование клеток MCF-7 в течение 1, 6 и 24 ч приводит к спонтанному образованию двунитевых разрывов ДНК, при котором уровень фокусов γ H2AX имеет значения, равные 1.35, 1.79 и 1.77 соответственно (рис. 12).

Влияние аурумакрила на уровень фокусов γ H2AX (двунитевые разрывы ДНК), имеет дозозависимый характер. При воздействии аурумакрила в концентрации 100 мкг/мл уровень двунитевых разрывов ДНК несколько возрастает по сравнению с контролем и достигает величины, равной 3.0, при всех сроках инкубации. Однако при увеличении концентрации препарата до

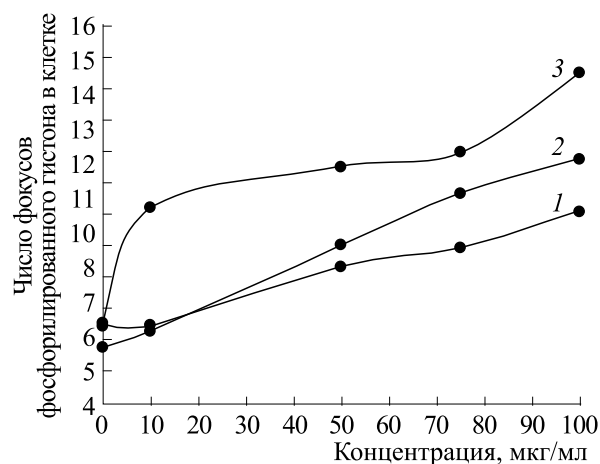


Рис. 13. Влияние аргакрила на образование двунитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение числа фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в зависимости от концентрации аргакрила при инкубации клеток в течение 1 часа (1), 6 часов (2) и 24 часов (3).

1000 мкг/мл уровень фокусов γ H2AX снижается до значений, составляющих 2.3, 2.0 и 1.37 соответственно при инкубации в течение 1, 6 и 24 ч (рис. 12).

Иными словами, число двунитевых разрывов в опухолевых клетках через 24 ч инкубации с аурумакрилом (1000 мкг/мл) остается на уровне спонтанных разрывов, наблюдаемых в контроле (рис. 12).

Приведенные данные убедительно свидетельствуют об отсутствии у аурумакрила способности вызывать образование двунитевых разрывов в молекуле ДНК опухолевых клеток MCF-7.

Аргакрил. Изменение уровня фокусов γ H2AX в ДНК опухолевых клеток после инкубации в течение 1, 6 и 24 ч с аргакрилом, примененным концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 10 до 100 мкг/мл, показано на рис. 13.

Как видно из представленных данных, культивирование опухолевых клеток MCF-7 с аргакрилом в течение 1, 6 и 24 ч приводит к увеличению числа двунитевых разрывов ДНК над спонтанным (контрольным) уровнем в 1.7, 1.8 и 2.2 раза соответственно (рис. 13).

Таким образом, очевидно, что аргакрил, в отличие от аурумакрила, обладает способностью вызывать двунитевые разрывы ДНК в опухолевых клетках, действуя в концентрациях на порядок меньших, чем препарат, содержащий золото (рис. 12 и 13).

ДНК-сшивки. Оценка способности МПА индуцировать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток линии MCF-7 проведена с использованием метода ДНК-комет. При этом для дифферен-

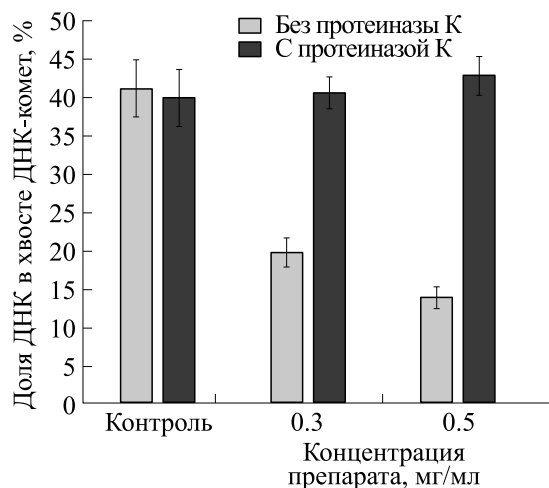


Рис. 14. Индукция аурумакрилом сшивок «ДНК–белок» в молекуле ДНК опухолевых клеток линии MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет (%) в зависимости от концентрации аурумакрила (мг/мл) без воздействия протеиназы К и в присутствии протеиназы К.

циации природы сшивок «ДНК–ДНК» и «ДНК–белок» определяли долю ДНК в хвосте ДНК-комет в присутствии протеиназы К, которая, избирательно взаимодействуя с белком, позволяет регистрировать сшивки типа «ДНК–белок».

Аурумакрил. Аурумакрил, как видно из данных, представленных на рис. 14, вызывает в исследуемых опухолевых клетках уменьшение доли ДНК в хвосте ДНК-комет при воздействии в концентрациях 300 и 500 мкг/мл соответственно в два и три раза по сравнению с уровнем контрольных значений (40%). Эти показатели свидетельствуют о том, что аурумакрил вызывает сшивки в молекуле ДНК, число которых возрастает с увеличением концентрации препарата (рис. 14).

При этом отмечено, что в присутствии протеинкиназы К доля ДНК в хвосте ДНК-комет при воздействии аурумакрила в изученных концентрациях сохраняется на уровне контрольных значений (40%), что рассматривается, согласно современному представлению, как свидетельство индукции препаратом сшивок в молекуле ДНК типа «ДНК–белок» (рис. 14) [10, 12].

Аргакрил. Проведенное нами экспериментальное исследование показало, что при воздействии аргакрила не зафиксировано образование сшивок в молекуле ДНК опухолевых клеток, то есть аргакрил, в отличие от аурумакрила, не вызывает сшивок в молекуле ДНК опухолевых клеток.

Таким образом, показано, что препарат, содержащий золото, вызывает сшивки «ДНК–белок» в молекуле ДНК, в то время как препарат серебра не индуцирует появление сшивок в молекуле ДНК.

Анализ данных, характеризующие влияние МПА на структуру ДНК опухолевых клеток (линия MCF-7) позволяет, как нам представляется, предложить следующую трактовку полученных результатов:

– механизм действия аурумакрила реализуется через образование одонитевых разрывов ДНК, трансформирующихся в сшивки типа «ДНК–белок», что, возможно, объясняет снижение спонтанного уровня двунитевых разрывов ДНК в клетках под влиянием препарата;

– механизм действия аргакрила связан с индукцией одонитевых и двунитевых разрывов ДНК, число которых в два раза превосходит контрольный (спонтанный) уровень этих показателей, при отсутствии образования под влиянием препарата сшивок в молекуле ДНК.

Эти результаты указывают на возможные различия в механизме цитотоксического действия аурумакрила и аргакрила, которые, вероятно, определяются природой металлов, содержащихся в исследуемых полиакрилатах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана высокая цитотоксическая активность полиакрилатов, содержащих как золото, так и серебро в отношении клеток опухоли человека линии MCF-7, причем обнаружено, что аргакрил в 20 раз превосходит по эффективности аурумакрил.

Установлено, что апоптоз является доминирующим механизмом в индуцируемой аурумакрилом и аргакрилом гибели опухолевых клеток.

Обнаружены различия во влиянии МПА на структуру ДНК опухолевых клеток. Так, аурумакрил вызывает образование одонитевых разрывов ДНК и сшивок типа «ДНК–белок» на фоне снижения спонтанного уровня двунитевых разрывов ДНК, в то время, как аргакрил индуцирует появление одонитевых и двунитевых разрывов ДНК и не вызывает образование сшивок в молекуле ДНК.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит экспериментов с использованием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. А. Островская и Д. Б. Корман, *Золото и серебро в экспериментальной терапии опухолей* (Практическая медицина, М., 2023).
2. L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Therapy*, **1** (2), 59 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.12010
3. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Рос. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 74 (2020).
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (1), 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
5. К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Г. Г. Белозерская и др., *Изв. АН. Сер. хим.*, **66** (12), 2314 (2017). DOI: 10.1007/s11172-017-2021-3
6. А. К. Чигасова, Л. А. Островская и Д. Б. Корман, *Биофизика*, **67** (6), 1185 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922060151
7. R. Kopp, A. Krautloher, A. Ramírez-Fernández, et al., *Front. Mol. Neurosci.*, **12** (2019).
8. S. Fujisawa, Y. Romin, A. Barlas, et al., *Cytotechnology*, **66**, 259 (2013).
9. А. К. Чигасова, Л. А. Островская и Д. Б. Корман, *Биофизика*, **68** (1), 11 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923010027
10. А. К. Чигасова и А. Н. Осипов, Патент № 2799055, Бюл. изобретений № 19 (2023).
11. Д. Б. Корман, *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).
12. O. Merk 1, K. Reiser, and G. Speit, *Mutat Res.*, **471** (1–2), 71 (2000). DOI: 10.1016/s1383-5718(00)00110-8

Mechanism of the Cytotoxic Effect of Noble Metal Polyacrylates on Tumor Cells**A.K. Chigasova*, L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman*, and N.V. Bluhterova*****Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

The present study was carried out to investigate and compare the cytotoxic activities and mechanism of action of gold polyacrylates (aurumacryl) and silver polyacrylates (argacryl) using human tumor cell line (MCF-7 cell culture). The tested compounds showed high cytotoxic activity. It was found that argacryl is 20 times more effective than aurumacryl. It was established that apoptosis represents the dominant mechanism by which tumor cells undergo cell death induced by aurumacryl and argacryl. Differences in the effect of drugs on the DNA structure in tumor cells were found.

Keywords: gold polyacrylates and silver polyacrylates, human tumor MCF-7 cell line, cytotoxic activity, apoptosis, tumor cell-derived DNA