

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ ПОЛИАКРИЛАТА СЕРЕБРА

© 2024 г. Л.А. Островская*,*, Д.Б. Корман*, Е.И. Некрасова*, А.К. Чигасова*,
Н.В. Блюхтерова*, В.А. Рыкова*, М.М. Фомина*, Ю.А. Хоченкова**, К.А. Абзаева***

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

**Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ,
Каширское шоссе, 24, Москва, 115478, Россия

***Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН,
Институтская ул., 3, Новосибирск, 630090, Россия

#E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 25.07.2023 г.

После доработки 25.07.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Полиакрилат серебра (аргакрил) обладает противоопухолевой активностью на моделях солидных опухолей мышей *in vivo* и цитотоксическим действием на клетки опухолей человека *in vitro*. Аргакрил усиливает противоопухолевый эффект цисплатина (карцинома легких Льюис мышей) и не проявляет перекрестной резистентности с цисплатином и доксорубицином (рак молочной железы человека MCF-7). Молекулярный механизм действия аргакрила связан с индукцией односторонних разрывов ДНК при отсутствии образования сшивок в молекуле ДНК.

Ключевые слова: полиакрилаты серебра и золота, аргакрил, аурумакрил, противоопухолевая активность, цитотоксический эффект.

DOI: 10.31857/S0006302924010104, EDN: RBTTUF

Как показали исследования последних десятилетий, соединения, содержащие благородные металлы — золото и серебро, — обладают значительной биологической, в том числе антибактериальной, гемостатической, цитотоксической и противоопухолевой активностью, что указывает на перспективность их изучения в качестве потенциальных антимикробных, гемостатических и противоопухолевых средств [1].

В результате проведенных нами исследований впервые было показано, что золото- и серебросодержащие полимеры на основе полиакриловой кислоты проявляют значимый цитостатический и противоопухолевый эффект, что позволило отобрать для углубленного изучения в качестве потенциальных цитостатиков полиакрилаты, содержащие золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил) [2–6].

Необходимо отметить, что аурумакрил и аргакрил являются первыми и пока единственными полимерными соединениями среди изученных золото- и серебросодержащих веществ, способных в определенных условиях формировать нано-

размерные частицы драгоценных металлов в полимерной матрице, что, вероятно, вносит вклад в особенности метаболизма этих препаратов в физиологических условиях [7].

Согласно современным представлениям, полимерные комплексы, которые содержат в своем составе ионогенные группы и наночастицы, обладают способностью к комплементарным конформационным превращениям и кооперативному связыванию, а также к невалентным взаимодействиям с биологическими объектами, что определяет многообразие их практически значимых свойств, в том числе широкий спектр фармакологической активности. При этом отмечается, что природа содержащегося в полимере металла оказывает весьма существенное влияние на чувствительность опухолевых клеток различного генеза к изучавшимся препаратам.

В связи с этим уместно отметить, что при исследовании механизма действия нанокомпозитов 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

Сокращение: в/б — внутрибрюшинно.

низкой аффинностью к кислороду, проявляет большую гемостатическую активность по сравнению с полимером, содержащим более реакционноспособные наночастицы серебра [1, 7].

Ранее нами были представлены обобщенные результаты доклинического изучения противоопухолевой, цитотоксической активности и механизма действия препарата, содержащего золото, — аурумакрил (полиакрилат золота) [3].

В настоящей работе обобщены данные по экспериментальному исследованию противоопухолевого, цитостатического эффектов и механизма действия полимера, содержащего другой благородный металл — серебро, — препарата аргакрила (полиакрилата серебра).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Аргакрил представляет собой неполную серебряную соль полиакриловой кислоты с содержанием серебра 8.03%. Отвечает общей формуле $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAg}-)_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимера составляет 100–300 кДа. Инфракрасные спектры препарата содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 см^{-1} . Субстанция препарата представляет собой стекловидные пластинки серебристого цвета, хорошо растворимые в воде [1].

Аргакрил в условиях *in vivo* применяли в виде водных растворов внутрибрюшинно (в/б) многократно, ежедневно, начиная со следующих суток после перевивки опухоли, в суточных дозах 1, 2 и 6 мг/кг. Оценка цитотоксического эффекта аргакрила *in vitro* проведена при его применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 0.002 до 2.000 мг/мл (2–2000 мкг/мл).

Использованные в исследовании конвенционные препараты цисплатин (Teva, Израиль) и доксорубин (Pfizer, США) применяли *in vitro* в концентрациях, изменяющихся в диапазоне 0.122–500 мкг/мл и 0.007–1000 мкг/мл соответственно. Цисплатин в опытах *in vivo* вводили в суточной дозе 1 мг/мл в/б на протяжении 4 либо 8 суток.

Лабораторные животные. Эксперименты проведены на инбредных линейных мышах BDF₁ — гибридах первого поколения $f_1(\text{C}_{57}\text{Bl}/6 \times \text{DBA}_2)$, а также мышах линии Balb/c, массой 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России».

Модели опухолей животных. В качестве опухолевых тест-систем служили перевиваемые солидные опухоли мышей — карцинома легких Льюис, аденокарцинома Ca-755 (мыши BDF₁), аденокарцинома Акатол (мыши Balb/c). Перевивку опухо-

лей осуществляли в соответствии со стандартной методикой под кожу правого бока мышей измельченными фрагментами опухолевой ткани, содержащейся в 0.3 мл физиологического раствора хлористого натрия [8, 9].

Оценка противоопухолевого эффекта *in vivo*. Показателями ростингибирующего эффекта препарата служили различия в кинетике роста опухолей и средней продолжительности жизни у леченных (Т) и контрольных (С) животных. Коэффициент торможения роста опухоли (*TPO*, %) определялся из соотношения $TPO = (P_C - P_T)/P_C$, где P_C и P_T — средняя масса опухолей мышей в группах контрольных и леченных животных. Изменение средней продолжительности жизни ($\Delta\tau$, %) определялось как $\Delta\tau = (\tau_C - \tau_T)/\tau_C$, где τ_C и τ_T — средняя продолжительность жизни мышей в группах контрольных и леченных животных [8, 9].

Культуры клеток. Для оценки цитотоксического эффекта аргакрила в отношении клеток опухолей человека использованы клеточные культуры рака легкого А-549, рака толстой кишки НСТ116, меланомы Mel Me, рецептор-положительной карциномы молочной железы MCF-7, в том числе вариантов культуры MCF-7 с приобретенной резистентностью к цисплатину MCF-7/CP и доксорубину MCF-7/ADR, полученные из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Оценка антиметастатического эффекта *in vivo*. Исследование влияния аргакрила на процесс метастазирования первичной опухоли проведено на модели карциномы легких Льюис мышей в сравнительных экспериментах с использованием содержащего золото препарата — аурумакрила.

Карцинома легких Льюис является, как известно, одной из основных экспериментальных моделей для изучения антиметастатического действия противоопухолевых препаратов, поскольку при ее развитии рост первичной опухоли, перевитой подкожно или внутримышечно, сопровождается образованием метастазов в легких. Образовавшиеся метастазы можно регистрировать визуально в виде колоний опухолевых клеток в легких начиная с 16–18 суток после перевивки опухоли [10].

Подсчет колоний опухолевых клеток в легких проводился под лупой после фиксации легочной ткани по Буэну (насыщенный раствор пикриновой кислоты — 15 г, формалин — 5 г, уксусная кислота — 1 г) с последующим промыванием в 70–80% этаноле.

Показатель антиметастатического эффекта — коэффициент торможения роста метастазов (*TRM*, %) — определяется из соотношения $TRM = (K_C - K_T)/K_C$ %, где K_C и K_T — число колоний

опухолевых клеток в легких у контрольных и леченных животных соответственно [10].

Влияние аргакрила и аурумакрила на развитие процесса метастазирования в легкие перевитой подкожно карциномы Льюис исследовано при введении препаратов в/б пятикратно начиная со следующих суток после перевивки опухоли в суточных дозах 2 и 20 мг/кг соответственно.

Оценка цитотоксического эффекта *in vitro*. Цитотоксичность аргакрила оценивалась 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 [6].

Результаты экспериментов представлены в виде кривых «доза–эффект», характеризующих изменение доли погибших клеток в зависимости от концентрации препаратов через 24 ч инкубирования и позволяющих определить показатель цитотоксичности IC_{50} (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток) в отношении изучавшихся клеточных культур.

Наряду с МТТ-тестом для оценки цитотоксичности аргакрила в ряде экспериментов был применен метод определения гибели клеток с применением йодистого пропидия, описанный нами ранее [11].

Для оценки жизнеспособности клеток использовали йодистый пропидий из коммерческого набора Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4 (Invitrogen, США).

В исследуемые временные точки (через 1, 6 и 24 ч после воздействия аргакрила) клетки дважды промывали раствором Хенкса и снимали их с поверхности чашек 0,25% раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия). Затем к 1 мл клеточной суспензии в растворе Хенкса добавляли 1 мкл раствора йодистого пропидия из упомянутого коммерческого набора. Клетки инкубировали 20 мин при 4°C, ресуспендировали и помещали в камеру Горяева для подсчета погибших клеток. Подсчет клеток в апоптозе 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 пропидия (возбуждение на 540–580 нм и эмиссия на 600–660 нм). Анализировали по 600 клеток для каждой точки.

Анализ одонитевых разрывов ДНК. Для анализа индуцированных аргакрилом одонитевых разрывов ДНК использовали метод электрофоре-

за единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет) [12].

Суспензию контрольных или обработанных аргакрилом клеток смешивали с 1% 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 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 последующей нейтрализацией (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 (Nikon, Япония), оснащенным видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab, США).

Статистический анализ результатов. Статистическую обработку полученных *in vivo* данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0 и Statistica 8.0. Результаты представлены как среднее из 12 индивидуальных измерений для каждого экспериментального животного. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия признаются достоверными при условии, что вычисленные значения *t* превышают значения критерия Стьюдента $t_{0,1}$ для определенных уровней значимости ($p \leq 0,01$) при заданном числе степеней свободы f [9].

Статистическая обработка результатов, полученных *in vitro*, 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

Экспериментальное исследование аргакрила включало оценку противоопухолевой активности препарата на моделях солидных опухолей мышей *in vivo*, определение цитотоксического эффекта в отношении клеток опухолей человека *in vitro*, изу-

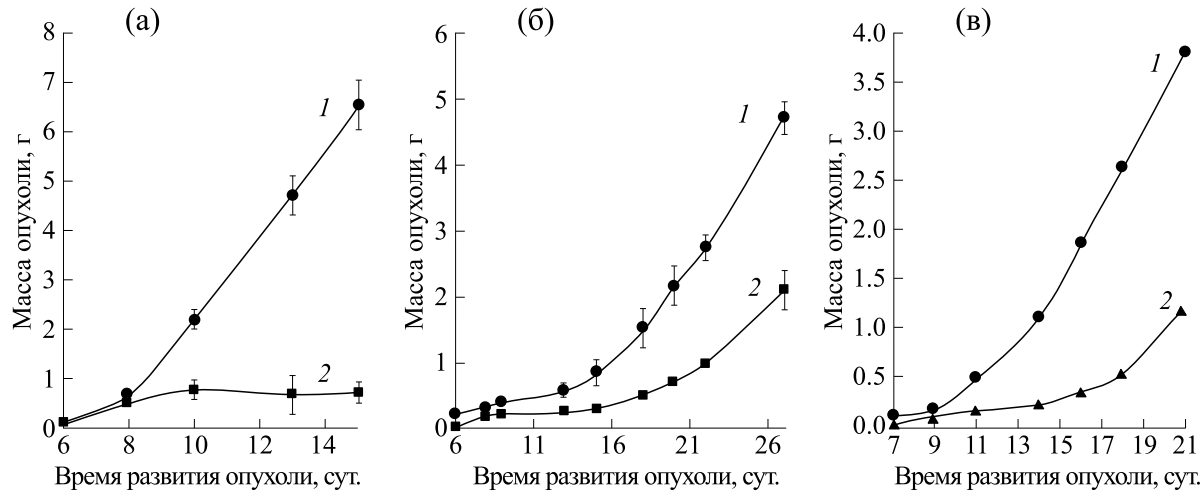


Рис. 1. Противоопухолевая активность аргакрила на моделях карциномы легких Льюис (а), аденокарциномы Акатол (б) и аденокарциномы Са-755 (в): 1 – контроль, 2 – аргакрил 2.0 мг/кг/сутки в/б с 1-х по 5-е сутки после перевивки опухоли (в случае аденокарциномы Са-755 – 6 мг/кг/сутки с 1-х по 9-е сутки).

чение некоторых аспектов механизма действия аргакрила.

Противоопухолевая активность аргакрила на моделях солидных опухолей мышей *in vivo*. Противоопухолевая активность аргакрила изучена на моделях солидных опухолей мышей: карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755 – при ежедневном многократном в/б введении препарата.

Как видно из данных, представленных на рис. 1 и в табл. 1, препарат проявляет существенный противоопухолевый эффект в отношении солидных опухолей мышей, вызывая торможение роста опухолей на 55–90% по сравнению с контролем. Наиболее высокой чувствительностью к действию аргакрила обладает карцинома легких Льюис, развитие которой препарат ингибирует на 90% (рис. 1, табл. 1).

Средняя продолжительность жизни животных с карциномой Льюис увеличивается под влиянием препарата на 46% по сравнению с контролем

(25.0 ± 2.8 суток в контроле, 34.5 ± 4.6 суток при воздействии аргакрила).

Отметим, что аргакрил обладает некоторым антиметастатическим эффектом, вызывая торможение образования колоний опухолевых клеток в легких, формирующихся при развитии карциномы Льюис, на 26% по сравнению с контролем при оценке эффекта на 23 сутки развития опухоли (рис. 2, табл. 2).

Представляется уместным упомянуть о том, что аргакрил обладает несколько менее выраженным антиметастатическим эффектом, чем препарат, содержащий золото (аурумакрил), применение которого приводит к торможению образования колоний в легких на 50% по сравнению с контролем (рис. 2, табл. 2).

Эффективность сочетанного применения аргакрила и цисплатина *in vivo*. Проведено сравнительное изучение эффективности применения аргакрила и цисплатина при индивидуальном и совместном введении на модели карциномы легких

Таблица 1. Противоопухолевая активность аргакрила на моделях солидных опухолей мышей

Штамм опухоли	Доза (мг/кг/сутки) и режим введения	Время оценки эффекта (сутки)	Средняя масса опухоли, г		Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %)
			леченные животные	контрольные животные	
Карцинома Льюис	2.0 (1–5 сутки)	15	0.7 ± 0.1	6.5 ± 0.4	90
Акатол	2.0 (1–5 сутки)	27	2.1 ± 0.2	4.7 ± 0.6	55
Акатол	2.0 (1–5 сутки)	27	2.1 ± 0.2	4.7 ± 0.6	70

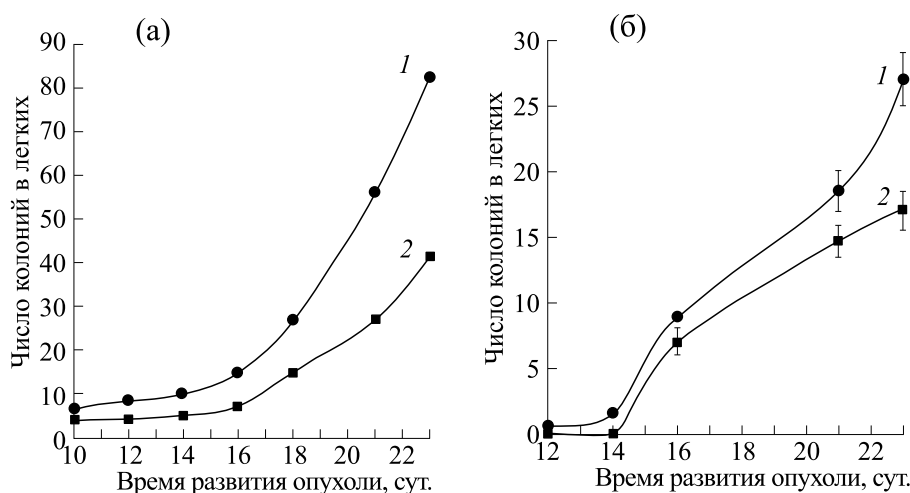


Рис. 2. Влияние полиакрилатов золота (а) и серебра (б) на образование колоний опухолевых клеток в легких при развитии карциномы легких Льюис: (а) — аурумакрил 20 мг/кг/сутки в/б; (б) — аргакрил 2 мг/кг/сутки в/б; 1 — контроль, 2 — препарат. Введение препаратов с 1-х по 5-е сутки после перевивки опухоли.

Льюис. Аргакрил и цисплатин в монорежиме вводились в/б с первых по восьмые сутки после перевивки опухоли в суточных дозах 1 мг/кг. При совместном применении препараты вводились последовательно — цисплатин с первых по четвертые сутки и затем аргакрил с пятых по восьмые сутки.

Как видно по данным, представленным на рис. 3 и в табл. 3, аргакрил и цисплатин при индивидуальном применении ингибируют развитие опухоли на 72 и 86% соответственно.

Совместное применение препаратов в последовательности цисплатин-аргакрил приводит к полному ингибированию развития карциномы Льюис на протяжении 60 суток после перевивки опухоли (рис. 3, табл. 3).

Таким образом, можно полагать, что при совместном последовательном применении цисплатина и аргакрила наблюдается синергетический эффект усиления противоопухолевого действия препаратов, используемых в комбинации, выражающийся в полном и длительном (более 60 суток) ингибировании опухолевого роста.

Цитотоксический эффект аргакрила в отношении клеток опухолей человека *in vitro*. Влияние аргакрила на выживаемость клеток опухолей человека различной природы (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A-549, рак толстой кишки HCT116, меланома Mel Me) характеризуют данные, полученные в экспериментах с применением МТТ-теста при инкубировании клеток с пре-

Таблица 2. Влияние аурумакрила и аргакрила на образование метастазов в легких при развитии карциномы легких Льюис

Препарат	Среднее число колоний опухолевых клеток в легких мышей		Торможение развития метастазов в легкие, %*	Препарат	Среднее число колоний опухолевых клеток в легких мышей
	Леченные мыши	Контрольные мыши			Леченные мыши
Аурумакрил 20 мг/кг/сутки	42.5 ± 2.8	82.5 ± 4.7	50	Аурумакрил 20 мг/кг/сутки	42.5 ± 2.8
Аргакрил 2 мг/кг/сутки	17.0 ± 1.7	23.0 ± 1.8	26	Аргакрил 2 мг/кг/сутки	17.0 ± 1.7

Примечание. Введение препаратов проводили в/б с 1-х по 5-е сутки. * — Оценка эффекта на 23-е сутки развития опухоли.

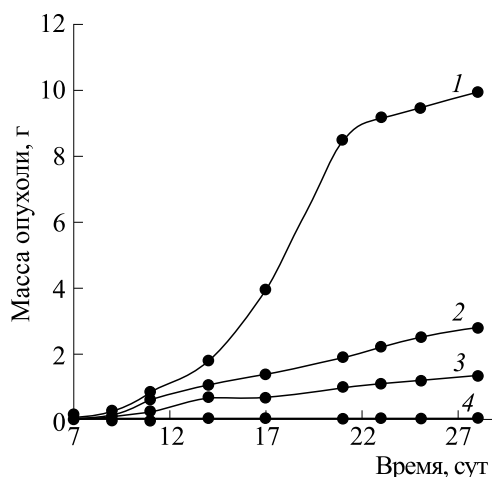


Рис. 3. Влияние аргакрила и цисплатина на развитие карциномы легких Льюис при индивидуальном и совместном применении препаратов: 1 — контроль; 2 — аргакрил 1 мг/кг с 1-х по 8-е сутки в/б; 3 — цисплатин 1 мг/кг с 1-х по 8-е сутки в/б; 4 — цисплатин 1 мг/кг с 1-х по 4-е сутки + аргакрил 1 мг/кг с 5-х по 8-е сутки в/б.

паратом на протяжении 24 ч и представленные на рис. 4.

Как видно по представленным данным, аргакрил обладает дозозависимым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации препарата и типа опухоли.

Препарат вызывают практически полную (94–96%) гибель опухолевых клеток при применении в концентрациях, равных 0.1–0.4 мг/мл, весьма далеких от максимальной концентрации аргакрила, составлявшей 2.0 мг/мл, и изменяющихся

в этих пределах в зависимости от линии опухолевых клеток (рис. 4).

Значения показателя IC_{50} варьируют в пределах от 25 до 180 мкг/мл для аргакрила, изменяясь в зависимости от типа опухолей (табл. 4).

Учитывая, что аргакрил является полимером на основе полиакриловой кислоты с массовым содержанием металла в количестве 8%, а противоопухолевый эффект такого рода соединений связывают в основном с действием образующихся наночастиц благородных металлов, уместно характеризовать цитотоксическую активность аргакрила значениями показателя IC_{50} в пересчете на содержание серебра, которые приведены в таблице 4 [4, 7, 9].

Основываясь на величине значений показателя IC_{50} , позволяющего дифференцировать опухоли различной природы по чувствительности к испытанному препарату, возможно охарактеризовать предполагаемый спектр его цитотоксического действия.

Как видно, в соответствии с показателем цитотоксичности IC_{50} чувствительность культур опухолевых клеток к препарату снижается в следующем ряду: рак молочной железы MCF-7, рак легкого A-549, меланома Mel Me, рак толстой кишки HCT116. При этом очевидно, что наибольшую чувствительность к действию аргакрила проявляют клетки рака молочной железы MCF-7, для которых IC_{50} составляет 2 мкг/мл (табл. 4).

С целью более детального изучения закономерностей гибели клеток рака молочной железы MCF-7 под влиянием аргакрила было предпринято изучение цитотоксического эффекта препарата в зависимости от примененных концентраций и сроков его инкубирования с клетками в

Таблица 3. Эффективность аргакрила и цисплатина при индивидуальном и совместном применении на модели карциномы легких Льюис мышей

Препарат	Суточная доза (мг/кг) и режим введения	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %	СПЖ мышей, сутки	Увеличение СПЖ, %
Аргакрил	1.0 (1–8-е сутки)	2.80 ± 0.8	72	36.5 ± 2.3	34
Цисплатин	1.0 (1–8-е сутки)	1.37 ± 0.5	86	42.6 ± 2.8	56
Цисплатин + Аргакрил	1.0 (1–4-е сутки) + 1.0 (5–8-е сутки)	0	100	>60	>120 (без опухолей)

Примечание. Оценка эффекта на 28-е сутки развития опухоли.

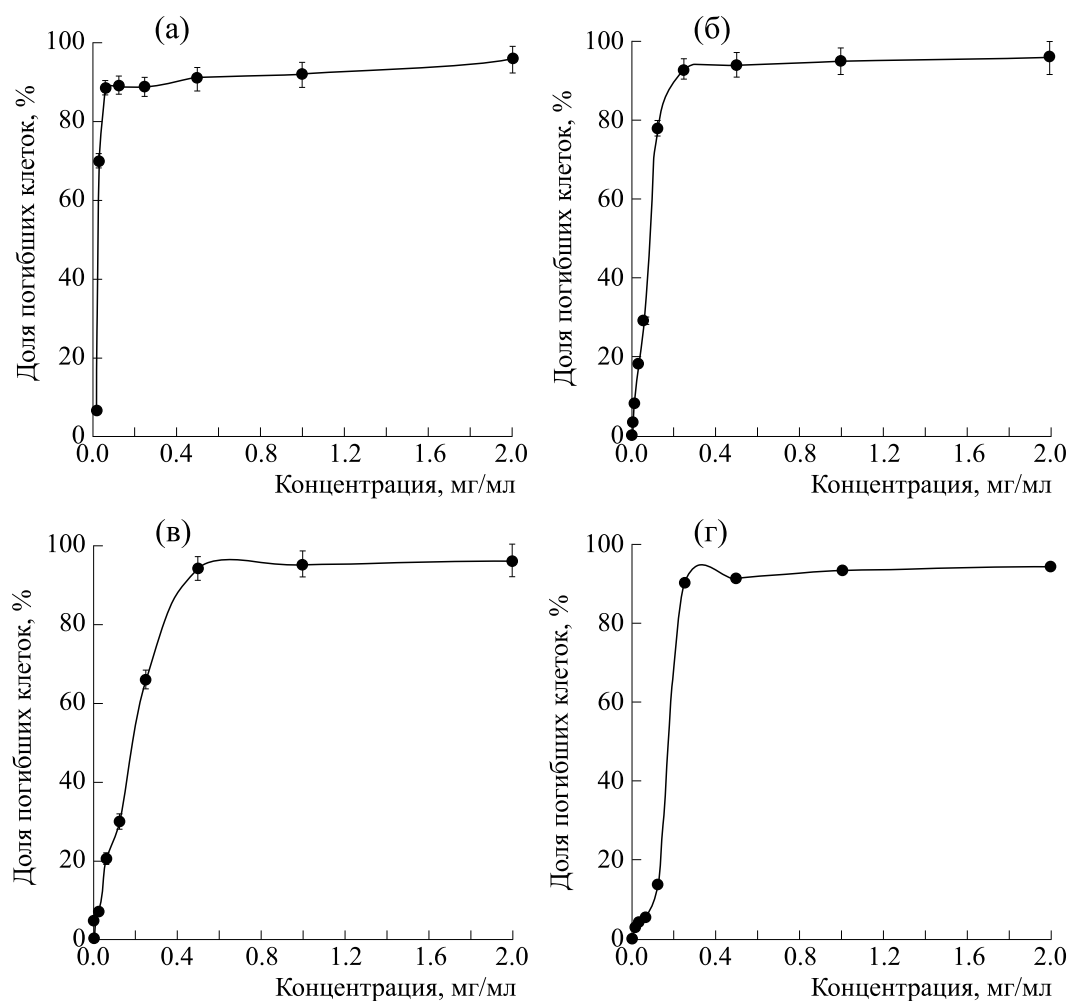


Рис. 4. Изменение доли погибших клеток в культурах опухолевых клеток человека в зависимости от концентрации аргакрила (24 ч инкубирования): (а) – рак молочной железы MCF-7, (б) – рак легкого A-549, (в) – рак толстой кишки HCT116, (г) – меланома Mel Me.

Таблица 4. Значения показателя IC_{50} аргакрила для ряда опухолевых клеток человека, культивируемых *in vitro*

Культура клеток опухоли человека	IC_{50} , мкг/мл
Рак молочной железы MCF-7	25 (2,0)
Рак легкого A549	80 (6,4)
Меланома Mel Me	180 (14,4)
Рак толстой кишки HCT116	180 (14,4)

Примечание. Время инкубирования 24 ч, в скобках указаны значения концентраций IC_{50} для аргакрила в пересчете на содержание серебра в препарате.

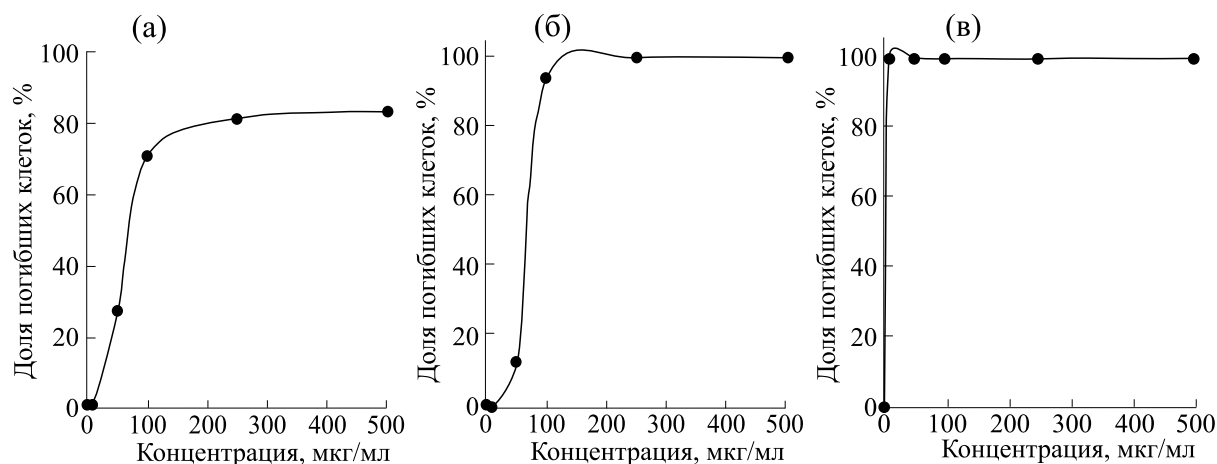


Рис. 5. Концентрационные зависимости гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аргакрила для различных времен инкубации с препаратом: (а) – 1 ч, (б) – 6 ч, (в) – 24 ч. По оси абсцисс – концентрация аргакрила, мкг/мл, по оси ординат – доля погибших клеток, %.

экспериментах с использованием йодистого пропидия.

Кривые, характеризующие изменения доли погибших клеток в зависимости от концентрации аргакрила для разных сроков воздействия препарата, представлены на рис. 5.

Как видно, при воздействии препарата в течение 1 ч максимальная гибель клеток составляет 85% при применении препарата в максимальной из изученных концентраций, равной 500 мкг/мл (рис. 5а).

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 10 мкг/мл соответственно (рис. 5б,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. 6.

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.

Показатель IC_{50} , характеризующий 50% гибель 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. 5 и 6).

Сопоставляя данные по характеристике цитотоксического эффекта аргакрила в отношении клеток рака молочной железы человека линии MCF-7, полученные в экспериментах с использованием различных методов для подсчета погибших клеток, следует отметить, что показатель IC_{50} , характеризующий гибель 50% клеток при инкубировании с препаратом в течение 24 ч, составляет 2.0 и 0.8 мкг/мл (в пересчете на содержание серебра) для опытов, проведенных с применением МТТ-теста и йодистого пропидия соответственно.

Таким образом, оба метода, примененных для оценки влияния аргакрила на жизнеспособность клеток, свидетельствуют о высокой цитотоксической активности препарата в отношении клеток опухолей человека.

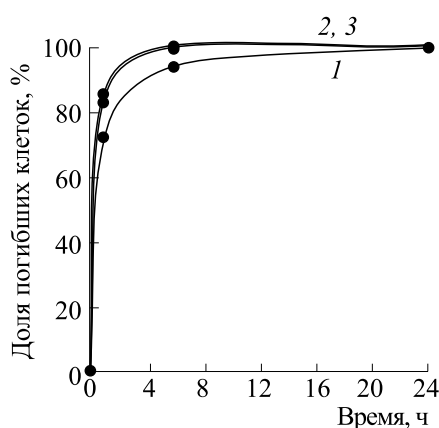


Рис. 6. Изменение доли погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аргакрила в различных концентрациях: 1 – 100 мкг/мл; 2 – 250 мкг/мл; 3 – 500 мкг/мл. По оси абсцисс – время инкубирования клеток с аргакрилом, ч; по оси ординат – доля погибших клеток, %.

Таблица 5. Показатели цитотоксического эффекта препаратов в отношении культуры клеток рака молочной железы человека, обладающих чувствительностью (MCF-7) и резистентностью к действию цисплатина (MCF-7/CP) и доксорубина (MCF-7/ADR)

Препарат	Линия клеток	Диапазон концентраций, мкг/мл	IC_{50} , мкг/мл*	IC_{96} , мкг/мл*
Цисплатин	MCF-7	0.122–500	2.0	250
	MCF-7/CP	1.953–500	20	500
	MCF-7/ADR	0.976–500	7.0	500
Доксорубин	MCF-7	0.007–1000	0.12	500
	MCF-7/CP	0.061–1000	5.0	1000
	MCF-7/ADR	0.122–500	5.0	500
Аргакрил	MCF-7	7.812–2000	50 (4.0)	500 (40)
	MCF-7/CP	1.953–2000	40 (3.2)	1000 (160)
	MCF-7/ADR	0.976–2000	40 (3.2)	500 (40)

Примечание. В скобках указаны значения концентраций IC_{50} и IC_{96} аргакрила в пересчете на содержание серебра.

Цитотоксичность аргакрила в отношении чувствительных и резистентных к цисплатину и доксорубину опухолевых клеток. Проведено исследование наличия перекрестной резистентности между аргакрилом и широко применяемыми в клинической практике противоопухолевыми препаратами цисплатин и доксорубин.

В данном разделе работы представлены результаты изучения цитотоксической активности аргакрила на чувствительном (MCF-7) и резистентных к цисплатину (MCF-7/CP) и доксорубину (MCF-7/ADR) вариантах культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7 с параллельной оценкой цитотоксичности для этих линий клеток препаратов цисплатина и доксорубина [13].

Исходная культура клеток MCF-7 обладает высокой чувствительностью к цисплатину и особенно к доксорубину, о чем свидетельствуют значения коэффициента IC_{50} , равные 2.00 и 0.12 мкг/мл соответственно (табл. 5).

Развитие резистентности клеток к указанным препаратам подтверждается существенным снижением их цитотоксического эффекта в отношении исходно чувствительной культуры.

Так, показатель IC_{50} цисплатина в отношении резистентной к ней культуры клеток MCF-7/CP составляет 20 мкг/мл, увеличиваясь в 10 раз по сравнению с исходным значением, равным 2.0 мкг/мл для культуры MCF-7 (табл. 5).

Для доксорубина коэффициент IC_{50} в отношении резистентной к нему культуры клеток MCF-7/ADR составляет 5.0 мкг/мл, увеличиваясь более чем в 40 раз по сравнению с исходным значением, равным 0.12 мкг/мл для культуры MCF-7 (табл. 5).

Необходимо отметить, что линии клеток с приобретенной резистентностью к цисплатину и доксорубину, обладают перекрестной устойчивостью к действию этих препаратов.

Цитотоксичность цисплатины по отношению к резистентным к доксорубину клеткам MCF-7/ADR снижается в 3.5 раза: значения коэффициента IC_{50} составляют 7 и 2 мкг/мл для культур MCF-7/ADR и MCF-7, соответственно (табл. 5).

Цитотоксичность доксорубина по отношению к резистентным к цисплатину клеткам MCF-7/CP снижается более чем в 40 раз по сравнению с его активностью в отношении исходных клеток MCF-7: значения коэффициента IC_{50} составляют 5.00 и 0.12 мкг/мл соответственно (табл. 5).

Результаты изучения цитотоксической активности аргакрила в отношении исходной культуры клеток MCF-7 и сублиний, резистентных к цисплатину MCF-7/CP и доксорубину MCF-7/ADR, представлены в виде зависимостей «концентрация–эффект» на рис. 7 и в табл. 5.

Как видно по представленным данным, аргакрил так же, как цисплатин и доксорубин, обладает дозозависимым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации вещества.

Аргакрил, подобно цисплатину и доксорубину, вызывает гибель до 96% опухолевых клеток при применении в сопоставимых концентрациях. Так, показатель IC_{96} (минимальная концентрация вещества, вызывающая максимальную гибель клеток) в отношении клеток MCF-7 составляет 500 мкг/мл для аргакрила, доксорубина и

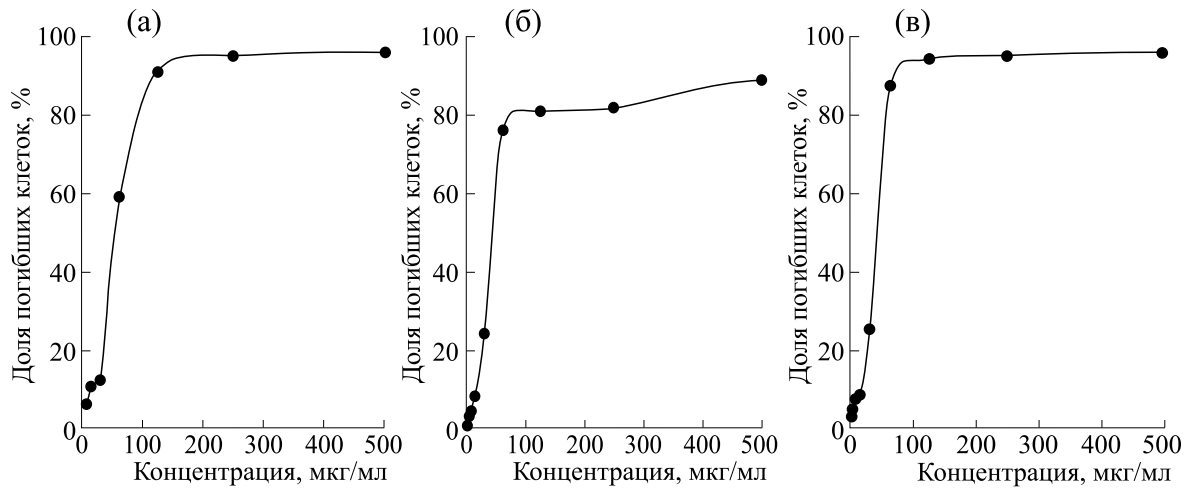


Рис. 7. Цитотоксический эффект аргакрила в отношении чувствительных и резистентных к цисплатину и доксорубину клеток культуры MCF-7: (а) — исходная линия клеток MCF-7, (б) — резистентная к цисплатину линия клеток MCF-7/CP, (в) — резистентная к доксорубину линия клеток MCF-7/ADR. По оси абсцисс — концентрация препарата, мкг/мл; по оси ординат — доля погибших клеток, %.

250 мкг/мл для цисплатина. В отношении клеток MCF-7/CP, резистентных к действию цисплатина, показатель IC_{96} составляет 1000 мкг/мл для аргакрила и доксорубина и 500 мкг/мл для цисплатина. Клетки MCF-7/ADR, резистентные к доксорубину, практически полностью (96%) погибают при воздействии изученных препаратов в концентрации 500 мкг/мл (рис. 7, табл. 5).

Характеризуя цитотоксический эффект аргакрила отметим, что значения коэффициента IC_{50} составляют 50 мкг/мл в отношении чувствительных клеток MCF-7 и 40 мкг/мл в отношении резистентных клеток MCF-7/CP и MCF-7/ADR (рис. 7, табл. 5).

Для удобства сравнения активности препаратов значения IC_{50} для аргакрила в пересчете на содержание металла, наряду с аналогичными по-

казателями для цисплатина и доксорубина, представлены в табл. 6.

Сопоставление активности препаратов в соответствии со значениями критерия оценки цитотоксического эффекта IC_{50} в отношении изученных моделей чувствительных и резистентных опухолевых клеток позволяет сделать следующие выводы (табл. 6).

В отношении чувствительных клеток линии MCF-7 эффективность препаратов снижается в ряду: доксорубин — цисплатин — аргакрил.

В отношении клеток, резистентных к действию цисплатина MCF-7/CP и доксорубина MCF-7/ADR, активность препаратов убывает в следующей последовательности: аргакрил — доксорубин — цисплатин.

Рассматривая действие аргакрила необходимо отметить как принципиально важный результат,

Таблица 6. Значения показателя IC_{50} аргакрила (в пересчете на содержание металла), цисплатина и доксорубина в отношении чувствительных (MCF-7) и резистентных (MCF-7/CP, MCF-7/ADR) клеток культуры рака молочной железы человека

Препарат	Культура клеток		
	MCF-7	MCF-7/CP	MCF-7/ADR
	IC_{50} , мкг/мл		
Аргакрил	4.0	3.2	3.2
Доксорубин	0.12	5.0	5.0
Цисплатин	2.0	20.0	7.0

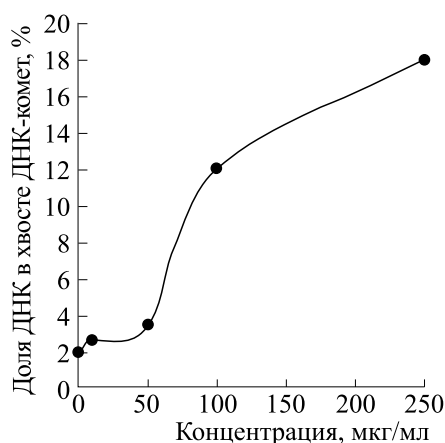


Рис. 8. Влияние аргакрила на образование одонитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках линии MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аргакрила при инкубации клеток с препаратом в течение 24 ч.

полученный в данном исследовании, сохранение практически одинаковой цитотоксической активности препарата в отношении чувствительных и резистентных к действию цисплатина и доксорубицина клеток: IC_{50} составляет 4.0 и 3.2 мкг/мл соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что резистентные к цисплатину и доксорубину клетки рака молочной железы человека сохраняют в полной мере чувствительность к цитотоксическому действию аргакрила (табл. 6).

Иными словами, в результате проведенных исследований обнаружено отсутствие перекрестной резистентности у аргакрила с цисплатином и с доксорубицином на модели культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7.

Влияние аргакрила 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 [14].

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 аргакрила индуцировать разрывы ДНК и образование ДНК-сшивок в опухолевых клетках (культура клеток карциномы молочной железы человека MCF-7).

Влияние аргакрила на образование одонитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7 характеризуют данные, представленные на рис. 8.

Как видно по представленным данным, доля клеток в хвосте ДНК-комет увеличивается под влиянием аргакрила, примененного в концентрации 100 мкг/мл, более чем в 6 раз, а под воздействием препарата в концентрации 250 мкг/мл — в 9 раз по сравнению с контролем (контрольное значение показателя составляет 1.88%) при инкубации с клетками в течение 24 ч (рис. 8).

Таким образом, очевидно, что аргакрил через 24 ч воздействия, примененный в концентрациях 100 и 250 мкг/мл, индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 одонитевых разрывов ДНК, число которых возрастает в 6 и 9 раз соответственно по сравнению со спонтанным уровнем, наблюдаемым в контроле.

Сопоставляя данные по способности индуцировать образование одонитевых разрывов ДНК препаратами, содержащими серебро и золото, отметим, что аурумакрил (1000 мкг/мл) также индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 одонитевых разрывов ДНК, число которых возрастает в 3.0–4.5 раза по сравнению со спонтанным уровнем разрывов ДНК, наблюдаемых в контроле уже через 1 ч инкубации и сохраняется на протяжении 24 ч культивирования клеток [12].

При этом следует отметить, что аргакрил вызывает в два раза более значительные повреждения структуры ДНК в виде одонитевых разрывов при применении в концентрации в 10 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 серебра и золота, содержащихся в исследуемых препаратах, с биомакромолекулами.

Ранее было показано, что молекулярный механизм действия аурумакрила на опухолевые клетки связан не только с индукцией одонитевых разрывов, но и образованием сшивок в молекуле ДНК [12].

Проведенное нами экспериментальное исследование показало, что при воздействии аргакрила не зафиксировано образование сшивок в молекуле ДНК опухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя результаты проведенного исследования аргакрила отметим следующие экспериментально установленные факты:

– аргакрил обладает противоопухолевой активностью, вызывая ингибирование солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755) на 55–90% *in vivo*;

– аргакрил обладает дозо- и экспозиционно-зависимым цитотоксическим действием на клетки опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого А-549, рака толстой кишки НСТ116, меланома Mel Me) *in vitro*: IC_{50} препарата колеблется в диапазоне от 2 до 14 мкг/мл, изменяясь в зависимости от типа опухолевых клеток;

– аргакрил усиливает противоопухолевый эффект цисплатина (карцинома легких Льюис) и не проявляет перекрестной резистентности с цисплатином и доксорубицином (рак молочной железы MCF-7);

– молекулярный механизм действия аргакрила связан с индукцией одонитевых разрывов ДНК, при отсутствии образования сшивок в молекуле ДНК (рак молочной железы MCF-7), что указывает на возможные различия в механизме действия аргакрила и аурумакрила.

В заключение отметим, что обнаруженная значительная цитотоксическая и противоопухолевая активность полиакрилатов как золота, так и серебра, отсутствие перекрестной резистентности между этими препаратами и цитостатиками цисплатином и доксорубицином в совокупности с данными об определенных различиях в механизме действия аурумакрила и аргакрила являются экспериментально установленными фактами, свидетельствующими о целесообразности дальнейшего доклинического изучения этих соединений, содержащих оба благородных металла – золото и серебро.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальные работы, проводимые с привлечением лабораторных животных, выполняются в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, которые регламентированы специальными правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS, 123), Страсбург, 1986), а также биоэтическими нормативами, приводимыми в руководствах Guide for care and use of laboratory animals (ILAR publication, National Academy Press, 1996),

Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval, 2nd ed. (Ed. by B.A. Teicher and P.A. Andrews) (Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004, p. 450), и согласованными с Этическим комитетом при ПИМУ Минздрава России (правила № 51 СП 2.2.1.3218-14 от 29.08.2014).

Исполнитель работы ИБХФ РАН включен в Перечень организаций и учреждений, осуществляющих проведение доклинических исследований лекарственных средств, на основании решения МЗ РФ (Разрешение МЗ РФ № 01-45122/06 от 21.09.2006 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Островская Л. А. и Корман Д. Б. *Золото и серебро в экспериментальной терапии опухолей* (Практическая медицина, М., 2023).
2. Ostrovskaya L. A., Voronkov M. G., Korman D. B., Fomina M. M., Bluhterova N. V., Rikova V. A., Abzaeva K. A., and Zhilitskaya L. V. Experimental Study of the Antitumor Activity of Polymetalacrylates against Animal Transplantable Tumors. *J. Cancer Therapy*, **1** (2), 59 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.12010
3. Островская Л. А., Корман Д. Б., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А., Чигасова А. К., Некрасова Е. И., Абзаева К. А., Рябая О. О. и Бурмий Ж. П. Полиакрилат золота: экспериментальное изучение противоопухолевой активности. *Рос. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 74 (2020). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-74-85
4. Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Островская Л. А., Рябая О. О., Блюхтерова Н. В. и Абзаева К. А. Цитотоксическое действие полиакрилата золота (аурумакрил) на фибробласты кожи человека. *Биофизика*, **65** (6), 1093–1098 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920060071
5. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А., Хоченкова Ю. А. и Абзаева К. А. Противоопухолевый и цитотоксический эффект полиакрилатов благородных металлов. *Биофизика*, **66** (5), 978–984 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
6. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Блюхтерова Н. В., Хоченкова Ю. А. и Абзаева К. А. Чувствительность опухолевых и нормальных клеток человека к полиакрилатам благородных металлов. *Биофизика*, **67** (1), 82–87 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
7. Abzaeva K. A., Zhilitskaya L. V., Belozerskaya G. G., and Ostrovskaya L. A. Effect of the metal nature on homeostatic activity of water-soluble gold and silver nanocomposites. *Russ. Chem. Bull.*, **66**, 2314–2316 (2017), DOI: 10.1007/s11172-017-2021-3
8. Трещалина Е. М. *Коллекция опухолевых штаммов животных* (Практическая медицина, М., 2022).
9. Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К., Андропова Н. В. и Гарин А. М. Методические ре-

- комендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 640–654.
10. Mayo J. G. Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemother. Rep.* 2, 3 (1), 325–330 (1972).
11. Чигасова А. К., Островская Л. А. и Корман Д. Б., Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на опухолевые клетки. *Биофизика*, 67 (6), 1185–1191 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922060151, EDN: LKVLQG
12. Чигасова А. К., Островская Л. А. и Корман Д. Б., Индукция повреждений структуры ДНК опухолевых клеток полиакрилатом золота. *Биофизика*, 68 (1), 11–19 (2023). DOI: 10.1134/S0006350923010050
13. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Хоченкова Ю. А., Блюхтерова Н. В. и Абзаева К. А. Полиакрилаты благородных металлов — цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, резистентных к цисплатине и доксорубину. *Биофизика*, 67 (5), 951–959 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050118, EDN: JIVBD
14. Корман Д. Б., *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).

Antitumor and Cytotoxic Effects of Silver Polyacrylate

**L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman*, E.I. Nekrasova*, A.K. Chigasova*, N.V. Bluhterova*,
V.A. Rikova*, M.M. Fomina*, Yu.A. Khochenkova**, and K.A. Abzaeva*****

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

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

***V.V. Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Novosibirsk, 630090 Russia

Silver polyacrylate (argacryl) exerts antitumor activity against murine solid tumors in vivo and exhibits cytotoxic effects on human tumor cells in vitro. Argacryl enhances the antitumor effect of cisplatin (a murine Lewis lung carcinoma cell line) and does not show cross-resistance to cisplatin and doxorubicin (MCF-7, human breast cancer cells). The molecular mechanism of action of argacryl is associated with the induction of DNA single-strand breaks in the absence of cross-linking in the DNA molecule.

Keywords: polyacrylates of silver and gold, argacryl, aurumacryl, antitumor activity, cytotoxic effect