

УДК 615.277.3

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ПОЛИАКРИЛАТОВ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА ДЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

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

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

**Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава Российской Федерации, 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 03.07.2024 г.

После доработки 03.07.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

Проведено изучение *in vitro* цитотоксической активности двух соединений на основе полиакриловой кислоты, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил), в отношении панели клеточных культур опухолей человека (карцинома почки – линии 769-P, Caki-2, SKRC-1, карцинома молочной железы BT-474, мелкоклеточная карцинома легкого NCI-H211). Полученные результаты проанализированы в сопоставлении с данными, полученными нами ранее для других клеточных культур (карцинома молочной железы MCF-7, карцинома легкого A-549, карцинома толстой кишки HCT116, меланома Mel Me). Показатель цитотоксического эффекта IC_{50} препаратов в отношении девяти протестированных линий опухолевых клеток варьирует в пределах от 0.8 до 5.2 мкг/мл для аурумакрила и в диапазоне от 0.2 до 14.4 мкг/мл для аргакрила (в пересчете на содержание золота и серебра соответственно), изменяясь в зависимости от типа. Обнаружены существенные различия в спектрах летального действия аурумакрила и аргакрила на клетки опухолей различной природы.

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

DOI: 10.31857/S0006302924060097, EDN: NLCOTT

Металлоорганические соединения, в том числе вещества, содержащие благородные металлы – золото и серебро, широко исследуются в последние годы в качестве потенциальных противоопухолевых агентов [1].

Ранее нами было показано, что полимерные соединения на основе полиакриловой кислоты, содержащие золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил) обладают значительной противоопухолевой активностью *in vivo* в отношении солидных опухолей животных (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755), а также проявляют цитотоксический эффект *in vitro* на моделях ряда клеточных линий опухолей человека (рак молочной железы MCF-7,

рак легкого A-549, колоректальная карцинома HCT116, меланома Mel Me) [2–4].

В продолжение данного направления исследований проведено сравнительное изучение цитотоксической активности аурумакрила и аргакрила на расширенной панели клеточных культур, результаты которого приведены в представленной работе.

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 $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n$ $(-\text{CH}_2\text{CHCOO}\text{AuCl}_3\text{H}-)_m$, аргакрил – неполная серебряная соль полиакриловой кислоты отвечает формуле $(-\text{CH}_2-$

Сокращения: ОП – оптическая плотность, IC₅₀ – показатель цитотоксичности (значение концентрации вещества, вызывающей гибель 50% клеток).

$\text{CHCOOH}-)_n$ $(-\text{CH}_2\text{CHCOOAgCl}_3\text{H}-)_m$, где $n = 12\,000-35\,000$, $m = 1\,650-6\,650$. Молекулярная масса полимеров составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препаратов содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 cm^{-1} . Субстанции препаратов представляют собой стекловидные пластинки золотистого (аурумакрил) и серебристого (аргакрил) цвета, хорошо растворимые в воде. Оценка цитотоксического эффекта препаратов *in vitro* проведена при их применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 0.244 до 500 мкг/мл для аурумакрила и от 0.976 до 500 мкг/мл для аргакрила.

Оценка цитотоксического эффекта *in vitro*. Для сравнительной оценки цитотоксического эффекта аурумакрила и аргакрила в отношении клеток опухолей человека использованы клеточные культуры карциномы почки трех линий (769-P, Caki-2, SK-RC-1), карциномы молочной железы BT-474, мелкоклеточной карциномы легких NCI-H211. Культуры клеток, протестированные в работе, получены из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Цитотоксичность препаратов оценивали путем определения доли выживших по сравнению с контролем клеток с использованием стандартного МТТ-теста, основанного на сравнительном спектрофотометрическом определении оптической плотности раствора формазана в группах клеток, подвергавшихся воздействию препарата и в контроле, в соответствии с ранее описанной методикой [5].

Долю выживших клеток определяли в соответствии с показателем оптической плотности (ОП) раствора формазана, измеряемой спектрофотометрически при длине волны 570 нм на анализаторе «Multiscan FC» («ThermoScientific», США). В качестве показателя цитотоксического действия препаратов служило соотношение между числом выживших клеток в тестируемой, подвергавшейся воздействию и контрольной группах клеток, выраженное в процентах. Выживаемость клеток, подвергавшихся воздействию препаратов, определялась в соответствии с формулой: (ОП экспериментальной группы/ОП контрольной группы) $\times 100\%$, где ОП – оптическая плотность раствора.

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

Статистический анализ результатов. Статистическая обработка результатов проведена с помощью программ Statistica 6.0, Statistica 8.0 и Excel for Windows 10. Результаты представлены как

среднее из 6 индивидуальных измерений для культивируемых клеток. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена 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 [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

Как видно из приведенных данных, оба изученных препарата обладают дозо-зависимым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации препарата, типа опухоли и природы металла, содержащегося в полимере.

Оба препарата вызывают практически полную гибель опухолевых клеток всех изученных линий при применении в концентрациях, далеких от максимальной, составляющей 250 мкг/мл. Так, концентрации препаратов, вызывающие гибель 90–95% клеток, составляют 62,5 мкг/мл для аурумакрила и 31,25 мкг/мл для аргакрила (рис. 1 и 2).

Вместе с тем очевидно, что концентрационные зависимости, характеризующие цитотоксическое действие препаратов в отношении протестированных клеточных линий, имеют определенные количественные различия, что находит свое отражение в разнице между расчетными значениями концентрации вещества, вызывающей гибель 50% опухолевых клеток (IC_{50}) для аурумакрила и аргакрила (рис. 1 и 2, табл. 1).

Так, значения IC_{50} варьируют в пределах от 10 до 35 мкг/мл для аурумакрила и в границах от 2,5 до 10 мкг/мл для аргакрила, изменяясь в зависимости от типа протестированных в данном исследовании опухолей (табл. 1).

Для более полной характеристики спектра цитотоксического действия препаратов результаты предпринятого исследования, проведенного с вышеупомянутыми культурами клеток (карцинома почки линий 769-P, Caki-2 и SK-RC-1, карцинома молочной железы BT-474, мелкоклеточная карцинома легких человека NCI-H211) проанализированы в сопоставлении с данными, полученными нами ранее для других клеточных культур (рак молочной железы MCF-7, карцинома легкого А-549, колоректальная карцинома HCT116, меланома Mel Me) [3].

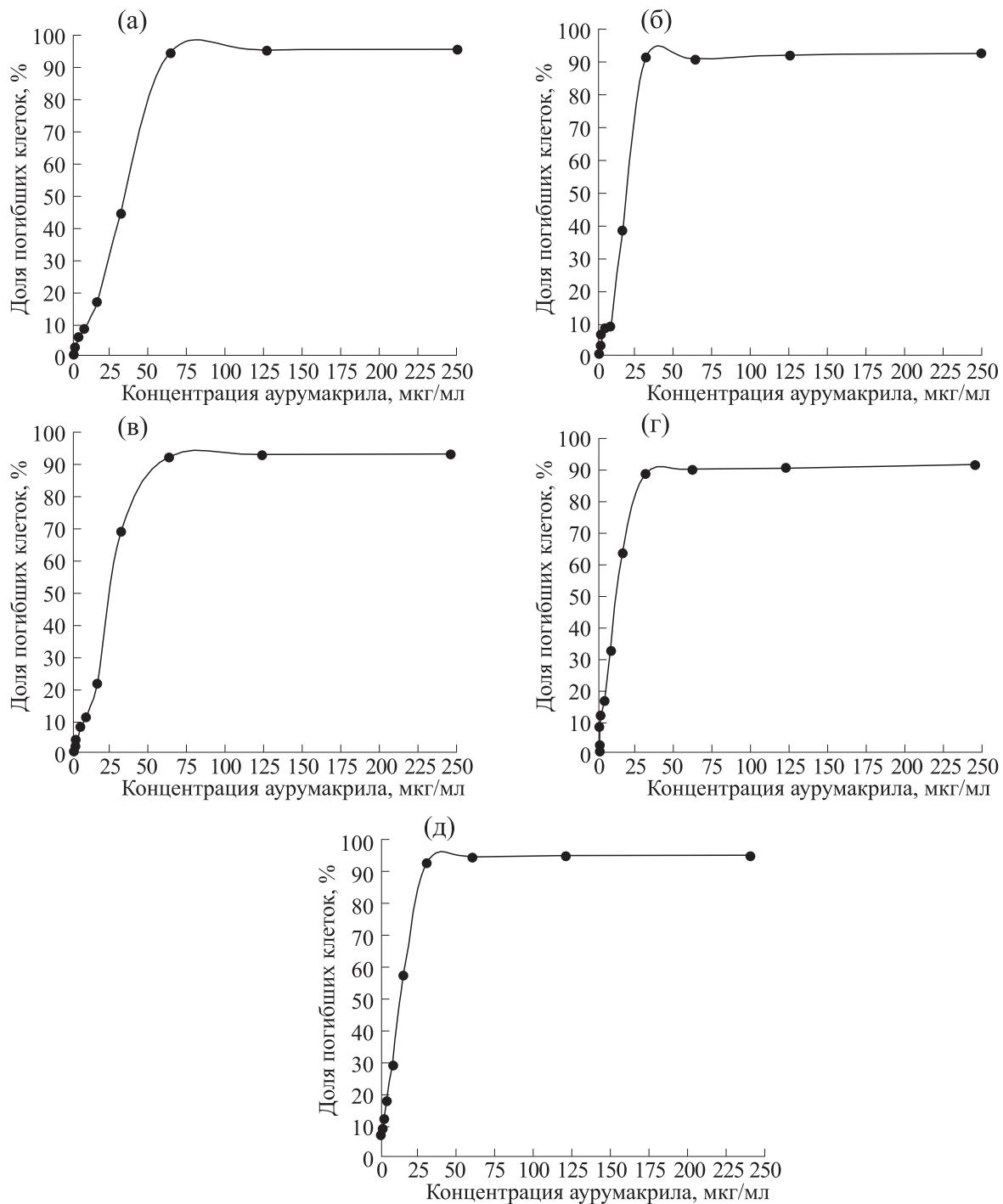


Рис. 1. Изменение доли погибших клеток ряда клеточных культур опухолей человека в зависимости от концентрации препарата аурумакрила: (а) – карцинома почки 769-P, (б) – карцинома почки Caki-2, (в) – карцинома почки SK-RC-1, (г) – карцинома молочной железы BT-474, (д) – карцинома легких NCI-H211.

Обобщенные результаты, характеризующие в соответствии со значениями показателя IC_{50} чувствительность девяти линий различных культур опухолевых клеток к препаратам аурумакрила и аргакрила, представлены в табл. 1.

Учитывая, что аурумакрил и аргакрил являются полимерами на основе полиакриловой кислоты с массовым содержанием металлов в количестве 8%, а противоопухолевый эффект этих соединений связывают в основном с действием

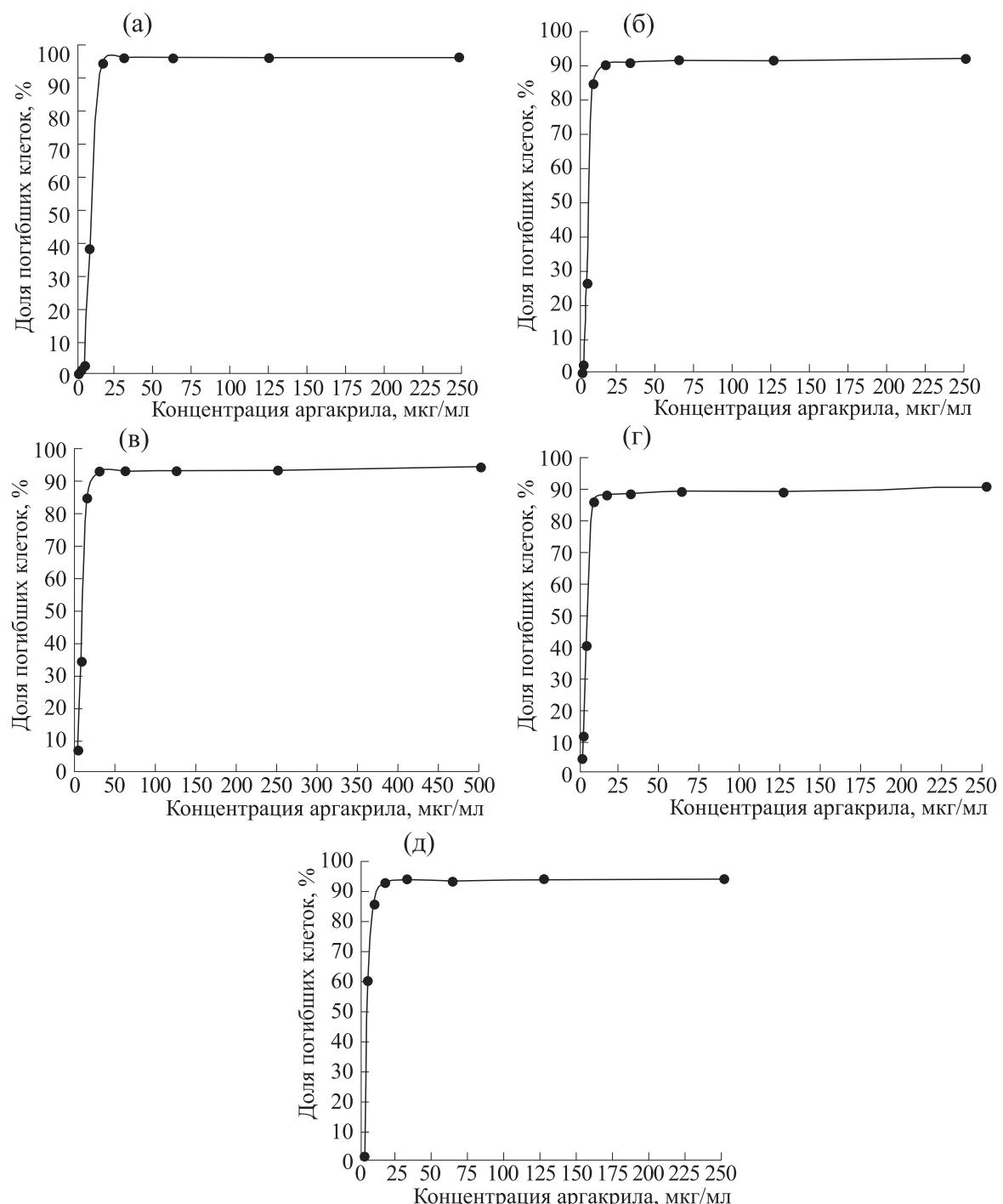


Рис. 2. Изменение доли погибших клеток ряда клеточных линий опухолей человека в зависимости от концентрации препарата аргакрила: (а) – карцинома почки 769-P, (б) – карцинома почки Caki-2, (в) – карцинома почки SK-Rc-1, (г) – карцинома молочной железы BT-474, (д) – карцинома легких NCI-H211.

входящих в них металлов, представляется уместным характеризовать цитотоксическую активность этих препаратов соответствующими показателями в пересчете на содержание золота и серебра, соответственно, которые также приведены в табл. 1.

Коэффициент цитотоксической активности IC_{50} в отношении девяти исследовавшихся клеточных культур изменяется в диапазоне от 0.8 до 5.2 мкг/мл для аурумакрила и в пределах от 0.2 до 14.4 мкг/мл для аргакрила (в пересчете на содержание золота и серебра соответственно).

Таблица 1. Значения показателя IC_{50} аурумакрила и аргакрила для ряда опухолевых клеток человека, культивируемых *in vitro*

Культура клеток	Аурумакрил	Аргакрил
	IC_{50} , мкг/мл	
Аденокарцинома почки 769-P	35 (2.8)	8 (0.6)
Светлоклеточная карцинома почки Caki-2	20 (1.6)	5 (0.4)
Карцинома почки SKRC-1	23 (1.8)	10 (0.8)
Карцинома протока молочной железы BT-474	10 (0.8)	5 (0.4)
Аденокарцинома молочной железы MCF-7	13 (1.0)	25 (2.0)
Мелкоклеточная карцинома легкого NCI-H211	14 (1.1)	2.5 (0.2)
Карцинома легкого A549	50 (4.0)	80 (6.4)
Колоректальная карцинома HCT116	65 (5.2)	180 (14.4)
Меланома Mel Me	62 (5.0)	180 (14.4)

Примечание. В скобках указаны значения концентраций IC_{50} для препаратов аурумакрил и аргакрил в пересчете на содержание золота и серебра, соответственно.

Основываясь на величине показателя IC_{50} , позволяющей дифференцировать опухоли различной природы по чувствительности к испытанным препаратам, представляется возможным охарактеризовать предполагаемый спектр их действия.

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, чувствительность культивируемых опухолевых клеток к аурумакрилу снижается в следующем ряду: карцинома молочной железы BT-474 – рак молочной железы MCF-7 – карцинома легкого NCI-H211 – карцинома почки Caki-2 – карцинома почки SK-RC-1 – карцинома почки 769-P – карцинома легкого A-549 – меланома Mel Me – колоректальная карцинома HCT116.

Чувствительность опухолевых клеток к аргакрилу уменьшается в последовательности: карцинома легкого NCI-H211 – карцинома почки Caki-2 – карцинома молочной железы BT-474 – карцинома почки 769-P – карцинома почки SK-RC-1 – рак молочной железы MCF-7 – карцинома легкого A-549 – меланома Mel Me – колоректальная карцинома HCT116.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой цитотоксической активности поликарилатов как золота, так и серебра. Наблюдаемые при этом весьма существенные различия в спектрах летального действия аурумакрила и аргакрила на клетки разных опухолей очевидно связаны не только с различиями в природе опухолевых клеток, но также и со свойствами металлов, содержащихся в изучаемых препаратах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В экспериментальной терапии опухолей определение цитотоксической активности соединений *in vitro* на клетках разных опухолей человека является важным этапом в изучении потенциальных противоопухолевых агентов. Результаты этих исследований позволяют достаточно быстро установить целесообразность дальнейшего изучения и выбрать из нескольких близких по строению веществ наиболее перспективные. Кроме того, результаты таких исследований могут дать указания относительно опухоли с наиболее вероятной чувствительностью к изучаемому соединению, что может быть использовано при планировании и проведении последующих экспериментальных исследований *in vivo* на ксенографах соответствующих опухолей человека и при клинических испытаниях.

При анализе полученных результатов обращает на себя внимание тот факт, что цитотоксичность аурумакрила и аргакрила практически для каждой отдельной линии клеток существенно отличается.

Основываясь на величине IC_{50} можно полагать, что цитотоксичность аргакрила превосходит цитотоксичность аурумакрила для 5 из 9 изученных клеточных линий.

Особенно это выражено в отношении клеток всех трех протестированных линий опухолей почек. IC_{50} аргакрила колеблется в пределах от 0.4 до 0.8 мкг/мл, а IC_{50} аурумакрила – в диапазоне

не от 1.6 до 2.8 мкг/мл, изменяясь в зависимости от типа опухолевых клеток.

Более высокая цитотоксичность аурумакрила по сравнению с аргакрилом весьма выражена в отношении клеток меланомы Мел Ме и карциномы толстой кишки НСТ116, но при этом отметим, что цитотоксичность обоих соединений для клеток данных опухолей вообще была незначительной, значения IC_{50} были близки или выше того значения этого показателя цитотоксичности (<100 мкг/мл), который принято считать указанием на наличие значимой цитотоксичности.

Следует отметить, что имеются существенные различия в цитотоксичности аурумакрила и аргакрила для клеток разных линий одной и той же опухоли.

Так, в отношении клеток рака молочной железы линии MCF-7 цитотоксичность выше у аурумакрила, а для клеток рака молочной железы линии BT-474 у аргакрила. Возможно, это обусловлено некоторыми различиями в биологических характеристиках клеток этих линий. Исходно обе клеточные линии получены от пациенток с инвазивным протоковым раком молочной железы, но клетки линии MCF-7 происходят из метастатических клеток, выделенных из метастатической плевральной жидкости, а клетки линии BT-474 получены из первичной опухоли молочной железы. Клетки обеих линий содержат рецепторы эстрогена и прогестерона, но для клеток BT-474 характерна еще гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста HER2/new, тогда как в клетках MCF-7 этого не обнаружено.

Аргакрил обладает более выраженной, по сравнению с аурумакрилом, цитостатической активностью в отношении клеток рака легкого линии NCI-H211, тогда как для клеток рака легкого линии A549 более токсичен аурумакрил. Следует отметить, что эти две клеточные линии представляют разные гистологические типы рака легкого — линия NCI-H211 получена из мелкоклеточного рака легкого, A549 — из аденокарциномы легкого. Известно, что эти два типа рака легкого резко отличаются по чувствительности к химиотерапии — при мелкоклеточном раке легкого эффективны алкилирующие препараты, особенно нитрозоалкилмочевины, а при аденокарциноме легкого препараты «традиционной» химиотерапии неэффективны. В то же время при некоторых формах аденокарциномы легкого (в частности при опухолях с мутацией ALK) эффективен ряд таргетных препаратов, которые неэффективны при мелкоклеточном раке легкого.

Важно отметить, что оба препарата показали высокую цитостатическую активность по отношению к клеткам почечно-клеточного рака, который до недавнего времени (до появления таргетных и иммунотерапевтических препаратов)

считался полностью нечувствительным к лекарственной терапии. Особенно это заметно для аргакрила, который вызывал гибель клеток всех трех линий этой опухоли при весьма низких концентрациях. Следует отметить, что клетки всех трех линий относятся к светлоклеточному гистологическому типу почечно-клеточного рака, однако исходные клетки были получены от разных пациентов и, по-видимому, были выделены из разных участков опухолей, что может отразиться на разной чувствительности к цитотоксическому действию, учитывая известную клеточную гетерогенность злокачественных опухолей.

В связи с наблюдениями, свидетельствующими о различиях в спектрах цитотоксичности аурумакрила и аргакрила, представляется уместным отметить, что ранее при исследовании механизма действия этих соединений, были выявлены определенные отличия в механизме влияния препаратов, содержащих золото и серебро, на структуру ДНК опухолевых клеток [7].

Механизм действия аурумакрила реализуется через образование однонитевых разрывов ДНК, трансформирующихся в сшивки типа «ДНК–белок».

Механизм действия аргакрила связан с индукцией однонитевых 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 [7].

Полученные в проведенном исследовании результаты могут рассматриваться в качестве экспериментального подтверждения имеющихся сведений о противоопухолевой и цитотоксической активности аурумакрила и аргакрила, свидетельствующего о целесообразности дальнейшего до-клинического изучения полиакрилатов, содержащих как золото, так и серебро, в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальные работы проведены на клеточных культурах в условиях *in vitro* без привлечения лабораторных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Островская Л. А. и Корман Д. Б. *Золото и серебро в экспериментальной терапии опухолей* (Практическая медицина, М., 2023).

2. 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.
3. 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.
4. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Чигасова А. К., Блюхтерова Н. В., Рыкова В. А., Фомина М. М., Хоченкова Ю. А. и Абзаева К. А. Сосединения золота и серебра как потенциальные противоопухолевые препараты. *Биофизика*, **69** (2), 386–398 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924020221, EDN: OTFKZY.
5. Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Островская Л. А., Рябая О. О., Блюхтерова Н. В. и Абзаева К. А. Чувствительность клеток опухолей человека к цитотоксическому действию полиакрилата золота (аурумакрил). *Биофизика*, **64** (6), 1138–1145 (2019). DOI: 10.1134/S0006350919060125.
6. Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К., Андронова Н. В. и Гарин А. М. Методические рекомендации 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.
7. Чигасова А. К., Островская Л. А., Корман Д. Б. и Блюхтерова Н. В. Полиакрилаты благородных металлов – механизм цитотоксического действия на опухолевые клетки. *Биофизика*, **68** (6), 1187–1199 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923060108, EDN: RORUYD.

Cytotoxicity of Gold and Silver Polyacrylates for Tumor Cells

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

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

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

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

The study of the cytotoxic activity of two polyacrylic acid-based compounds containing gold (aurumacryl) and silver (argacryl) against a panel of human tumor cell cultures (769-P, Caki-2, SK-RC-1 renal carcinoma lines, BT-474 breast carcinoma, NCI-H211 small cell lung carcinoma) was carried out *in vitro*. The results obtained were analyzed in comparison with the data established earlier for other cell cultures (MCF-7 breast carcinoma, A-549 lung carcinoma, HCT116 colon carcinoma, Mel Me melanoma). The IC_{50} cytotoxic index of drugs for the nine tested tumor cell lines ranged from 0.8 to 5.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for aurumacryl and from 0.2 to 14.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for argacryl (in terms of gold and silver content, respectively), varying depending on the type of tumor. Significant differences have been found in the spectra of the lethal effect of aurumacryl and argacryl against tumor cells of various natures.

Keywords: gold polyacrylate (aurumacryl), silver polyacrylate (argacryl), cytotoxic effect, human tumor cell cultures