

## КЛЕТОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА АУРУМАКРИЛА

© 2017 г. Л.А. Островская, А.К. Грехова, Д.Б. Корман, А.Н. Осипов\*,  
Н.В. Блюхтерова, М.М. Фомина, В.А. Рыкова, К.А. Абзаева\*\*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4  
\*ГНЦ РФ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России,  
123098, Москва, Живописная ул., 46

\*\*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, 664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1

E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 23.05.16 г.

Исследованы клеточные эффекты аурумакрила (препарата полиакрилата золота, для которого ранее была показана значительная противоопухолевая активность в отношении солидных опухолей мышей в опытах *in vivo*) на модели стабильной клеточной линии карциномы молочной железы человека MCF7. Установлено, что аурумакрил обладает цитотоксическим и цитостатическим действием на опухолевые клетки. Дозозависимый цитотоксический эффект препарата выражается в гибели 60% опухолевых клеток после 24-часовой инкубации с аурумакрилом в дозе 1 мг/мл. Кинетика пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток также претерпевает существенные изменения, выражающиеся в преимущественном накоплении клеток (93%) в фазе пролиферативного покоя  $G_0$  и в значительном уменьшении – до 7% – доли делящихся клеток. Полученные данные могут быть расценены как свидетельство утраты выжившими клетками репродуктивной способности после воздействия аурумакрила.

*Ключевые слова:* полиакрилат золота, культура клеток опухоли человека MCF7, цитотоксический и цитостатический эффект.

Изучение металлоорганических соединений в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов признано одним из весьма перспективных направлений исследований в области биомедицинской химии, экспериментальной и клинической онкологии [1,2].

Интерес к металлоорганическим соединениям, особенно к структурам, содержащим благородные металлы, в значительной мере обусловлен открытием высокой противоопухолевой активности в ряду комплексных соединений платины (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин и др.), широко применяющихся в современной химиотерапии опухолей [1,3].

Исследования последних лет выявили значительную противоопухолевую активность металлоорганических соединений, содержащих другой металл платиновой группы – золото. Обнаруженные определенные различия в спектре противоопухолевой активности, механизме действия соединений, содержащих золото и платину, наряду с отсутствием перекрестной резистентности опухолей по отношению к некоторым из этих препаратов, придают особую ак-

туальность данному направлению исследований.

В последние два десятилетия исследование содержащих золото соединений в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов получило широкое развитие. Синтезировано большое число разнообразных веществ, содержащих золото, в том числе в виде комплексных соединений и наноструктур, многие из которых проявляют значительную противоопухолевую активность *in vitro* в отношении клеточных линий опухолей человека, в том числе резистентных к препаратам платины [4–6].

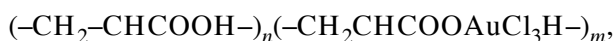
Нами при исследовании новых для онкологии соединений класса металлополиакрилатов впервые обнаружена на моделях солидных опухолей животных значительная противоопухолевая активность полиакрилатов, содержащих благородные металлы, в частности золото (препарат аурумакрил). Установлено, что аурумакрил эффективно ингибирует развитие солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755), вызывая торможение их роста на 70–90% по сравнению с контролем [7–10].

Следует отметить, что металлополиакрилаты, разработанные под руководством академика М.Г. Воронкова, обладают разносторонней биологической активностью, составляя, в частности, группу локальных гемостатиков нового поколения, сочетающих кровоостанавливающее действие с высокой бактерицидной активностью в отношении 27 основных штаммов возбудителей микробных инфекций [11].

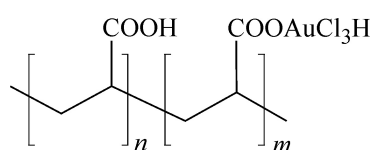
Задача данной работы состояла в исследовании клеточных эффектов аурумакрила в условиях *in vitro* на модели клеток карциномы молочной железы человека MCF7.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Препарат.** Исследуемый препарат с условным названием аурумакрил представляет собой неполную золотую соль полиакриловой кислоты, содержащей 8,03 масс.% Au, и отвечает общей формуле:



где  $n = 1263$ ;  $m = 124$  (см. схему):



В данной работе исследовано действие аурумакрила в концентрациях 0,001; 0,01; 0,1 и 1,0 мг/мл, примененного в виде водного раствора.

**Культура клеток.** Эксперименты проведены *in vitro* с использованием культуры клеток карциномы молочной железы человека линии MCF7. Клетки культивировали в стандартной культуральной среде DMEM/F12 («Life Technologies Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия), 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 10% FBS («Life Technologies Thermo Fisher Scientific», США) путем термостатирования при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> (MCO-18AC, «Sanyo», Япония). В дальнейшем клетки снимали с поверхности флаконов 0,25% раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия) и пассировали с плотностью 200 клеток/см<sup>2</sup> в той же культуральной среде. Пассирование клеток проводили при достижении культурой 80–90% монослоя. Замену среды осуществляли каждые четверо суток.

Экспериментальное изучение аурумакрила проведено на клетках, находящихся в фазе экспоненциального роста (плотность клеточной популяции ~80%). Клетки снимали с пластика

раствором трипсина-ЭДТА, с последующей инактивацией трипсина и отмывкой клеток в полной среде. Клетки пассировали в чашках Петри диаметром 35 мм, содержащих покровные стекла (SPL Lifesciences, Южная Корея). Действие аурумакрила в различных концентрациях изучено при инкубации клеток с препаратом при 37°C в течение 1, 6 и 24 ч, при параллельном инкубировании интактных клеток в качестве контроля.

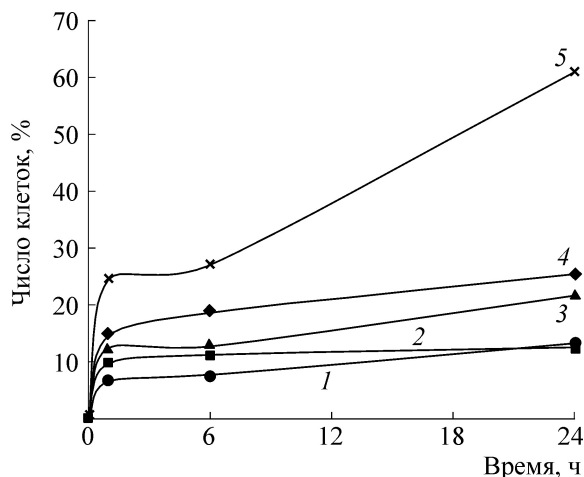
**Жизнеспособность клеток.** Жизнеспособность клеток определяли по их восприимчивости к окраске 0,4%-м раствором трипанового синего. Клетки дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (pH 7,4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспензию. После этого в равных пропорциях смешивали раствор 0,4%-го трипанового синего и клеточной суспензии, смесь ресуспендировали и непосредственно после этого оценивали клеточную гибель путем подсчета окрашенных (погибших) клеток в камере Горяева.

**Клеточная пролиферация.** Для оценки влияния аурумакрила на клеточную пролиферацию использовали иммуноцитохимический анализ маркера клеточного деления – белка Ki-67. Этот белок присутствует в ядрах делящихся клеток, но отсутствует в покоящихся клетках [12]. Анализ экспрессии Ki-67 широко используется в клинической онкологии для оценки эффективности лечения и прогноза рецидивов [12,13].

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 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). Пермеабилizировали 0,3%-м тритоном X-100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина, для блокирования неспецифического связывания.

Слайды инкубировали 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 двукратной промывки в фосфатно-солевым буфере (pH 7,4) слайды инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с вторичными козьими поликлональными антителами к мышинному IgG, конъюгированными с флуорохромом Alexa 488 (Merck–Millipore, США), разведенными в соотношении 1/400 в



**Рис. 1.** Влияние препарата аурумакрила в ряде концентраций на кинетику гибели клеток MCF7. По оси абсцисс – время экспозиции, по оси ординат – число погибших клеток. Концентрации препарата (мг/мл): 1 – контроль, 2 – 0,001, 3 – 0,01, 4 – 0,1, 5 – 1,0.

фосфатно-солевым буфере (рН 7,4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина.

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

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе «Eclipse Ni-U» (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения «ProgRes CFcool» (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров DAPI (возбуждение на 340–380 нм и эмиссия на 435–485 нм) и B-2E/C (возбуждение на 465–495 нм и эмиссия на 515–555 нм). Анализировали не менее 200–500 клеток на точку, после чего подсчитывали долю Ki-67-позитивных/Ki-67-негативных клеток.

**Двунитевые разрывы ДНК.** Оценку двунитевых разрывов ДНК проводили иммуноцитохимически при помощи антител, специфичных к белку-маркеру двунитевых разрывов ДНК – фосфорилированному гистону H2AX ( $\gamma$ H2AX). Образующиеся во время репарации двунитевых разрывов ДНК сложные динамические микроструктуры, состоящие из тысяч копий  $\gamma$ H2AX, визуализируются после иммуноцитохимического окрашивания в виде ярких точек/фокусов (от англ. foci) [14]. Количественная оценка фокусов  $\gamma$ H2AX в настоящее время считается самым чувствительным методом анализа двойных разрывов ДНК [15].

Для анализа фокусов  $\gamma$ H2AX использовали методику, детально описанную нами ранее [16]. Анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов  $\gamma$ H2AX использовали программу Focicounter (<http://focicounter.sourceforge.net/>).

**Статистика.** Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0. Результаты представлены как среднее из трех независимых результатов  $\pm$  стандартная ошибка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование эффектов аурумакрила в условиях *in vitro* включало оценку выживаемости клеток после воздействия препарата, изучение его влияния на кинетику клеточной пролиферации, определение способности данного агента индуцировать двунитевые разрывы ДНК.

Установлено, что аурумакрил обладает цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от времени воздействия препарата и его концентрации (рис. 1). Уже через час инкубации гибель клеток составляет 10–25%, изменяясь в этих пределах в зависимости от дозы. Наблюдающийся эффект возрастает со временем, и после 24 ч инкубации гибель клеток при применении препарата в концентрации 1 мг/мл (7 мкМ/л) достигает 60% (рис. 1).

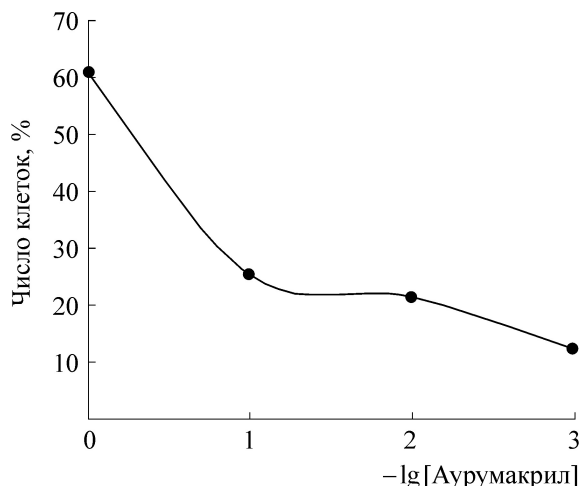
Цитотоксический эффект аурумакрила имеет выраженный дозозависимый характер. Максимальный эффект – гибель 60% опухолевых клеток – наблюдается при воздействии препарата в дозе 1 мг/мл, наибольшей из изученных (рис. 2).

Отметим, что расчетная доза, летальная для 50% опухолевых клеток ( $ED_{50}$ ), составляет для аурумакрила 0,5 мг/мл (рис. 2).

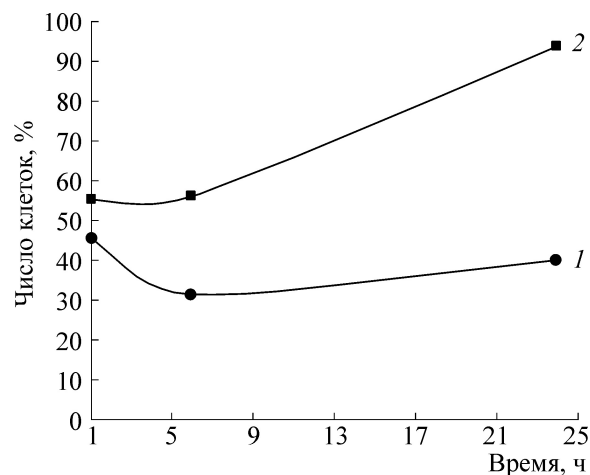
Интенсивность пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток претерпевает под влиянием аурумакрила значительные изменения по сравнению с контролем, наиболее выраженные при применении препарата в самой высокой из изученных доз – 1 мг/мл (рис. 3 и 4).

Установлено, что препарат вызывает накопление клеток, находящихся в фазе пролиферативного покоя  $G_0$ . Как видно из рис. 3, доля «покоящихся» клеток через 24 ч инкубации возрастает с 40%, наблюдающихся в контроле, до 93%, регистрируемых на этот срок при воздействии препарата в дозе 1 мг/мл (рис. 3).

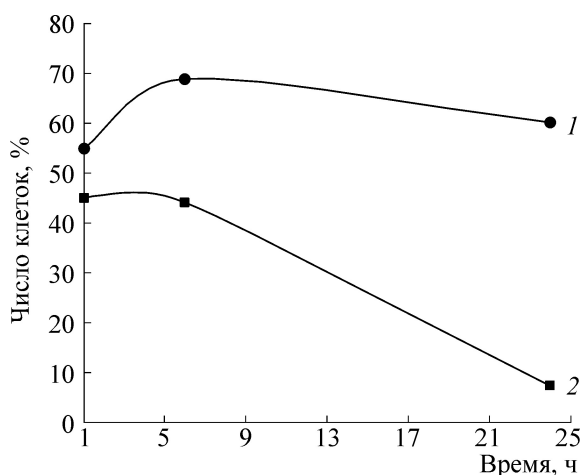
Наряду с этим среди выживших клеток наблюдается уменьшение под влиянием аурумакрила доли делящихся клеток. Так, после инку-



**Рис. 2.** Изменение доли погибших клеток культуры MCF7 в зависимости от дозы аурумакрила (экспозиция 24 ч). По оси абсцисс – логарифм концентрации препарата, по оси ординат – число погибших клеток.



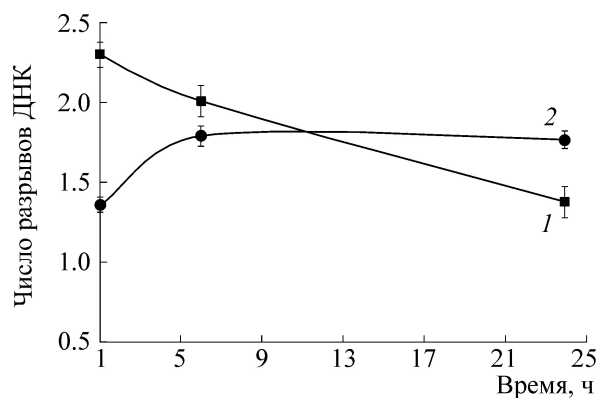
**Рис. 3.** Влияние аурумакрила на кинетику изменения доли покоящихся клеток MCF7: 1 – контроль, 2 – аурумакрил, 1 мг/мл. По оси абсцисс – время экспозиции, по оси ординат – число клеток в фазе G<sub>0</sub> (%).



**Рис. 4.** Влияние аурумакрила на кинетику изменения доли делящихся клеток MCF7: 1 – контроль, 2 – аурумакрил, 1 мг/мл. По оси абсцисс – время экспозиции, по оси ординат – число делящихся клеток.

бации опухолевых клеток с препаратом в дозе 1 мг/мл на протяжении 24 ч доля делящихся клеток уменьшается с 60%, регистрируемых в это время в контроле, до 7% (рис. 4).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что аурумакрил обладает выраженным цитотоксическим и цитостатическим действием, вызывая как гибель клеток (60%), так и значительные изменения интенсивности клеточной пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток, о чем свидетельствует снижение доли делящихся клеток.



**Рис. 5.** Влияние аурумакрила на кинетику изменения количества двунитевых разрывов ДНК на клетку (культура клеток MCF7): 1 – контроль, 2 – аурумакрил, 1 мг/мл. По оси абсцисс – время экспозиции, по оси ординат – число разрывов ДНК на клетку.

При изучении влияния аурумакрила на ДНК опухолевых клеток обнаружено, что кратковременная (одночасовая) инкубация клеток с препаратом приводит к увеличению числа разрывов почти в два раза (с 1,3 в контроле до 2,3 при воздействии препарата). Однако дальнейшее воздействие аурумакрила не усиливает этот эффект, более того, после 24-часовой инкубации число двойных разрывов в контроле и опыте практически не различалось и имело значения, равные 1,8 и 1,4 соответственно (рис. 5).

По всей видимости, это является отражением процесса снижения доли клеток в фазе синтеза ДНК (S-фаза). Известно, что именно в

S-фазе вследствие коллапса репликативных виллок образуется наибольшее количество спонтанных двойных разрывов [17]. Представленные данные свидетельствуют об отсутствии существенного влияния аурумакрила на показатель, характеризующий число двойных разрывов ДНК на клетку.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаруженные в работе клеточные эффекты аурумакрила в условиях *in vitro* на модели клеток карциномы молочной железы человека MCF7 хорошо согласуются с полученными нами ранее данными о противоопухолевой активности препарата в отношении солидных опухолей животных *in vivo* [8–10].

Приведенные результаты свидетельствуют не только о весьма значительном цитотоксическом эффекте аурумакрила, но демонстрируют также влияние препарата на пролиферативную активность опухолевых клеток, что указывает на выраженное цитостатическое действие препарата.

Следует отметить, что эти эффекты в опытах *in vitro* достигались при очень низких, наномольных количествах примененного вещества, существенно меньших, чем дозы, при которых регистрировался противоопухолевый эффект в экспериментах *in vivo*.

Совокупность полученных нами данных о противоопухолевой активности и клеточных эффектах аурумакрила свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения этого соединения в качестве потенциального противоопухолевого средства.

Остаются пока невыясненными возможные молекулярные мишени и механизмы противоопухолевого действия аурумакрила, что необходимо для позиционирования препарата в соответствии с современными подходами к противоопухолевой химиотерапии.

Согласно существующим представлениям, биомишенями для золотосодержащих препаратов могут служить ферментативные белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации опухолевых клеток, в развитии процессов апоптоза и ангиогенеза.

Показано, в частности, на ряде моделей стабильных клеточных линий опухолей человека высокоспецифичное ингибирование под влиянием препаратов золота такого фермента семейства пиридин нуклеотид оксиредуктазы, как митохондриальная тиоредоксин редуктаза, имеющая в активном центре селен, который высокочувствителен к действию тяжелых ме-

таллов. Результатом такого взаимодействия является повреждение митохондриальной мембраны, выход в цитозоль цитохрома *c* и индукция апоптоза. Обнаружено также модулирование препаратами золота активности протеосом и уменьшение содержания антиапоптотических белков, что приводит к стимуляции процессов апоптоза клеток. Высока вероятность влияния золота на белки, входящие в сигнальный каскад трансдукции митогенных сигналов, что может вести к подавлению клеточной пролиферации и гибели клеток [4–6, 18–20].

Учитывая, что аурумакрил является первым и пока единственным полимерным соединением среди изученных золотосодержащих веществ, и основываясь на известных данных о некоторой преимущественной предрасположенности опухолевых клеток к взаимодействию с полианионами, можно полагать, что полиакрилат золота, как выраженный полианион, вероятно, будет избирательно взаимодействовать с опухолевыми клетками. Известно также, что полианионы интенсивно взаимодействуют с положительно заряженными белками, в частности с гистонами, что может вести к нарушению хроматина и последующему нарушению функций ДНК [21].

Исследование детального механизма и мишеней противоопухолевого действия препарата является одной из задач дальнейших исследований этого соединения.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, *Основы противоопухолевой химиотерапии* (Практическая медицина, М., 2006).
2. В. Н. Бабин, Ю. А. Белоусов, В. И. Борисов, и др., *Изв. АН. Сер. хим.*, № 11, 2405, (2014).
3. И. А. Ефименко, *Координационная химия* **24** (4), 282 (1998).
4. D. Saggioro, M. P. Rigobello, L. Paloschi, et al., *Chem. Biol.* **14**, 1128 (2007).
5. S. Nobili, E. Mini., I. Landini, et al., *Med. Res. Rev.* **30**, 550 (2010).
6. A. Markowska, B. Kasprzak, K. Jaszczynska-Nowinka, et al., *Contemp. Oncol. (Pozn.)* **19**, 271 (2015).
7. М. Г. Воронков, К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая и др., Патент РФ № 2372091, 20.05.2008, *Бюл. изобр.* № 31 (2009).
8. L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Ther.* **1** (2), 59 (2010).
9. L. A. Ostrovskaya, D. B. Korman, N. V. Bluhterova, et al., *Biointerface Res. Appl. Chem.* **4** (4), 816 (2014).
10. Л. А. Островская, М. Г. Воронков, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **59** (4), 785 (2014).
11. К. А. Абзаева и Л. Е. Зеленков, *Изв. РАН. Сер. хим.*, № 6, 1233 (2015). DOI.10.1007/s11172-015-1006-3.

12. L. T. Li, G. Jiang, Q. Chen, and J. N. Zheng, *Mol. Med. Rep.* **11** (3), 1566 (2015).
13. R. Pezzilli, S. Partelli, R. Cannizzaro, et al., *Adv. Med. Sci.* **61** (1), 147 (2016).
14. A. N. Osipov, A. Grekhova, M. Pustovalova, et al., *Oncotarget* **6** (29), 26876 (2015).
15. А. К. Грехова, П. С. Еремин, А. Н. Осипови др., *Радиационная биология. Радиоэкология* **55** (4), 395 (2015).
16. A. N. Osipov, M. Pustovalova, A. Grekhova, et al., *Oncotarget* **6** (29), 27275 (2015).
17. M. Lobjrich, A. Shibata, A. Beucher, et al., *Cell Cycle* **9**, 662 (2010).
18. A. Casini and L. Messori, *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2647 (2011).
19. P. I. Maria, V. M. Deflon, and U. Abram, *Future Med. Chem.* **6**, 1515 (2014).
20. L. Ranconi, D. P. Aldinuoi, and D. Fregona, *Anti-cancer Agents. Med. Chem.* **10**, 283 (2010).
21. Н. А. Платэ, *Физиологически активные полимеры* (Химия, М., 1986).

## Cellular Effects of the Antitumor Drug Aurumacryl

**L.A. Ostrovskaya\*, A.K. Grehova\*, D.B. Korman\*, A.N. Osipov\*\*, N.V. Bluhterova\*, M.M. Fomina\*, V.A. Rikova\*, and K.A. Abzaeva\*\*\***

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

*\*\*Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency, Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123098 Russia*

*\*\*\*Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia*

Cellular effects of aurumacryl (the drug polyacrylate containing aurum with considerable antitumor activity against some solid tumors of mice, which was previously revealed *in vivo*) was studied on a stable line of the human breast carcinoma cell line MCF7. It was established that aurumacryl exerted cytotoxic and cytostatic effects on tumor cells. A dose-dependant cytotoxic effect of aurumacryl was expressed as the death of 60% of cells after 24 h incubation of tumor cells with aurumacryl in a dose of 1mg/ml. Kinetics of proliferation of the survived fraction of tumor cells was also changed after the drug treatment. These alterations were expressed as accumulation of cells (93%) in a proliferative rest phase ( $G_0$ -phase) and in a strong decrease in the number of proliferating cells – up to 7%. These data could be interpreted as evidence of the loss of the reproductive activity of the surviving cells after aurumacryl treatment.

*Key words: aurum polyacrylate, human tumor cell line MCF7 in culture, cytotoxic and cytostatic effect*