

УДК 542.957:547.7:547.854:547.857:615.27.3

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИАКРИЛАТА ЗОЛОТА (АУРУМАКРИЛ) НА ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Д.Б. Корман*, Е.И. Некрасова*, Л.А. Островская*, О.О. Рябая**, Н.В. Блюхтерова*, К.А. Абзаева***

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

**Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

***Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН, 664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1
E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 19.03.2020 г.

После доработки 19.03.2020 г.

Принята к публикации 07.08.2020 г.

Проведено исследование цитотоксического действия потенциального противоопухолевого препарата аурумакрил (полиакрилат золота) на фибробласты кожи человека (линия hFB-hTERT6) *in vitro*. Установлено, что аурумакрил обладает значительной цитотоксичностью в отношении фибробластов кожи человека. Максимальный цитотоксический эффект препарата – гибель 75% клеток – отмечается при применении аурумакрила в концентрации 0.125 мг/мл. Концентрация препарата, вызывающая гибель 50% фибробластов кожи человека (IK_{50}), составляет величину, равную 0.09 мг/мл.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), цитотоксическая активность, культура клеток фибробластов кожи человека hFB-hTERT6.

DOI: 10.31857/S0006302920060071

Как известно, практически все цитостатики, применяемые в противоопухолевой химиотерапии, обладают цитостатическим эффектом не только в отношении опухолевых клеток, но также и способностью поражать в различной степени нормальные, в основном быстро пролиферирующие клетки. В связи с этим обязательный комплекс доклинического изучения новых потенциальных противоопухолевых препаратов включает в себя изучение их цитотоксического действия на нормальные клетки.

Моделями для таких исследований, проводимых *in vitro*, служат различные линии культур нормальных клеток человека. Наиболее часто для этих целей используются культуры фибробластов кожи или легких человека.

В течение последних нескольких лет нами интенсивно исследуются противоопухолевые свойства полиакрилата золота (аурумакрила) – препарата, относящегося к золотосодержащим комплексным соединениям, представляющим новый для противоопухолевой химиотерапии класс цитостатиков. Особый интерес золотосодержащие вещества вызывают в связи с тем, что мишени, на ко-

торые направлено их действие, и механизмы его реализации отличают эти соединения от известных, клинически апробированных лекарственных средств, применяемых в онкологии [1–3].

В многочисленных экспериментальных исследованиях установлено, что аурумакрил обладает существенной противоопухолевой активностью. Препарат подавляет рост перевиваемых опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома толстой кишки Акатол, аденокарцинома молочной железы Ca-755) *in vivo* и проявляет выраженный цитотоксический эффект в отношении ряда клеточных культур опухолей человека (рак молочной железы, легких, толстой кишки, меланомы) *in vitro* [4].

Показано, что цитотоксический эффект аурумакрила в основном обусловлен наличием в его молекуле иона трехвалентного золота (Au^{3+}) [5].

Полученные к настоящему времени данные можно расценивать как указание на перспективность дальнейшего экспериментального изучения аурумакрила в качестве потенциального противоопухолевого препарата.

В настоящей работе, в плане продолжения доклинического изучения аурумакрила, представ-

Сокращение: ДМСО – диметилсульфоксид.

лены результаты исследования цитотоксического действия препарата на нормальные фибробласты кожи человека в опытах *in vitro*.

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 $(-CH_2-CHCOOH-)_n(-CH_2CHCOO-AuCl_3H-)_m$, где $n = 1263$, $m = 124$. Препарат представляет собой стекловидные пластинки желтого цвета, ограниченно растворимые в воде.

Исследование проведено с использованием раствора аурумакрила в диметилсульфоксиде (ДМСО). Исходный раствор аурумакрила в 100%-м ДМСО (максимальная растворимость) с концентрацией 20 мг/мл разводили в среде DMEM (арт. 41965039, ThermoFisher Scientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин («ПанЭко», Россия) и 10 Ед/мл пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) для достижения используемых рабочих концентраций препарата, варьируемых в пределах от 2.0 до 0.0039 мг/мл. При этом концентрация ДМСО в конечном растворе изменялась в диапазоне 10% – 0.0195% соответственно. Одновременно с действием препарата исследовали эффект растворителя (ДМСО) в тех же концентрациях.

Оценка цитотоксического эффекта аурумакрила проведена при применении препарата в концентрациях 0.25, 0.125, 0.06 и 0.03 мг/мл. Концентрация ДМСО, использованного в качестве растворителя при приготовлении растворов аурумакрила в указанных концентрациях, составляла 1.25, 0.63, 0.32 и 0.16% соответственно. Выбор использованных концентраций аурумакрила обусловлен необходимостью применения растворителя в минимально возможных концентрациях, позволяющих минимизировать цитотоксический эффект ДМСО.

Культура клеток. В качестве тест-модели в опытах *in vitro* служила культура фибробластов кожи человека линии hFB-hTERT6, полученная из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Оценка цитотоксического эффекта. Цитотоксичность аурумакрила оценивали путем определения доли выживших клеток в культуре после воздействия препарата по отношению к контрольным препаратам с использованием стандартного МТТ-теста [6].

Клетки ($8 \cdot 10^4$ клеток на лунку) вносили в 96-луночный планшет в полной среде DMEM (арт. 41965039, «ThermoFisherScientific», США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки,

2 мМ глутамин («ПанЭко», Россия) и 10 Ед/мл пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия), в конечном объеме 200 мкл на лунку и помещали в CO₂-инкубатор.

Через 24 ч культивирования после замены среды в культуре осуществлялось внесение аурумакрила или ДМСО (в указанных выше концентрациях в квадриплетах) в содержащие клетки лунки. В контрольную группу клеток препарат или ДМСО не вносили.

Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 48 ч, затем добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ-реагента, представляющего собой 3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (AppliChem, Германия), в конечной концентрации 0.5 мг/мл. Клетки инкубировали в присутствии МТТ-реагента в течение 3 ч, затем после отбора среды добавляли к ним по 200 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана (37°C, 10 мин при встряхивании).

В качестве показателя цитотоксического действия аурумакрила служило соотношение между числом выживших клеток в тестируемой, подвергнутой воздействию препарата, и контрольной группах клеток, выраженное в процентах.

Доля выживших клеток определялась в соответствии с показателем оптической плотности раствора формазана, измеряемой спектрофотометрически при длине волны 570 нм на анализаторе Multiscan FC (ThermoScientific, США).

Выживаемость клеток, подвергнувшихся воздействию аурумакрила, определяли в соответствии с формулой: $(OP_{\text{экспериментальной группы}}/OP_{\text{контрольной группы}}) \times 100\%$, где ОП – оптическая плотность раствора.

Для оценки вклада собственной окраски аурумакрила в оптическую плотность раствора был проведен аналогичный тест с внесением препарата и всех реагентов в аналогичных условиях в среду, не содержащую клеток. Показано, что вклад препарата в оптическую плотность раствора при измерении на используемой длине волны крайне мал (около 3% от оптической плотности для контрольной группы) и не зависит от концентрации препарата, что позволяет пренебречь этой крайне малой величиной.

Для того чтобы полностью исключить из оценки цитотоксичности аурумакрила возможный цитотоксический эффект растворителя (ДМСО), были рассчитаны доли погибших клеток при изученных дозах препарата с поправкой на долю клеток, которые могли погибнуть в результате действия одного ДМСО в соответствующих концентрациях.

Результаты экспериментов представлены в виде зависимости «доза–эффект», характеризующей цитотоксическое действие аурумакрила и

Таблица 1. Влияние аурумакрила (AU) на выживаемость фибробластов кожи человека *in vitro*

Доза аурумакрила, мг/мл (концентрация ДМСО %)	Доля выживших клеток, %		Доля клеток, погибших под влиянием аурумакрила, за вычетом эффекта ДМСО, %
	Аурумакрил в растворе ДМСО	ДМСО	
0.25 мг/мл (ДМСО 1.25%)	6.0 ± 0.0	59.3 ± 18.4	53.3 ± 19.8
0.125 мг/мл (ДМСО 0.63%)	9.3 ± 2.6	84.7 ± 4.2	75.4 ± 5.0
0.06 мг/мл (ДМСО 0.31%)	67.3 ± 13.8	78.6 ± 6.0	11.3 ± 2.7
0.03 мг/мл (ДМСО 0.16%)	93.3 ± 9.1	87.7 ± 7.7	0

позволяющей определить показатель цитотоксичности препарата в отношении изучавшейся культуры фибробластов кожи человека $ИК_{50}$ (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток).

Статистическая обработка результатов проведена с помощью программ Statistica и Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние аурумакрила на выживаемость фибробластов кожи человека при применении различных доз препарата охарактеризовано данными, представленными в табл. 1 и на рисунке.

Как видно из представленных данных, аурумакрил обладает значительной цитотоксичностью в отношении фибробластов кожи человека. Максимальный цитотоксический эффект препарата – гибель 75% клеток – отмечается при применении аурумакрила в концентрации 0.125 мг/мл (табл. 1, рисунок).

Расчетное значение концентрации препарата, вызывающей гибель 50% клеток ($ИК_{50}$), составляет величину, равную 0.09 мг/мл (рисунок).

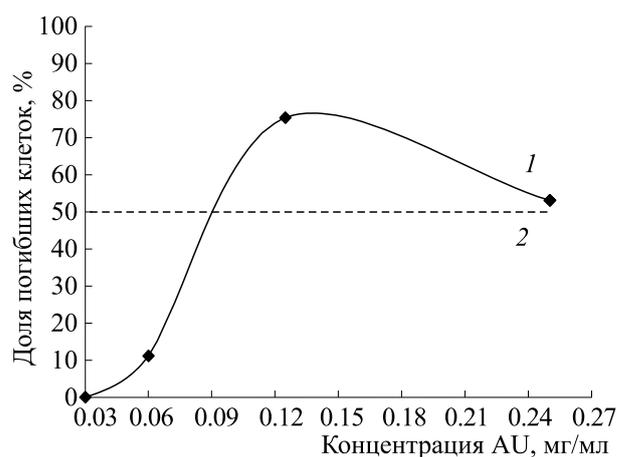
Ранее в аналогичных экспериментах нами была исследована цитотоксичность аурумакрила в отношении клеток некоторых опухолей человека (рак легкого A549, молочной железы MCF-7, толстой кишки HCT116, меланома Mel Mo). Были обнаружены существенные различия в чувствительности к аурумакрилу клеток опухолей различного гистогенеза, которая для исследовавшихся опухолей уменьшалась в ряду «рак легкого – меланома – рак молочной железы – рак толстой кишки» [7].

Цитотоксичность аурумакрила в отношении фибробластов кожи человека и исследовавшихся ранее опухолевых клеток, охарактеризованная показателем $ИК_{50}$, сопоставлена в табл. 2. Согласно общепринятым критериям оценки цитотоксического эффекта, лекарственное средство из нового класса соединений считается цитотоксическим активным при значениях $ИК_{50} \leq 100$ мкг/мл [6].

Как видно из данных, представленных в табл. 2, аурумакрил оказывает примерно одинаковое цитотоксическое действие на фибробласты кожи человека ($ИК_{50} = 90$ мкг/мл) и клетки рака молочной железы и меланомы ($ИК_{50} = 90$ и 80 мкг/мл соответственно). По сравнению с фибробластами кожи клетки рака легкого более чувствительны ($ИК_{50} = 60$ мкг/мл), а клетки рака толстой кишки – менее чувствительны ($ИК_{50} = 180$ мкг/мл) к цитотоксическому эффекту аурумакрила (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление цитотоксичности экспериментальных противоопухолевых агентов в отношении опухолевых и нормальных клеток рассматривается как один из показателей возможной селективности противоопухолевого действия ис-



Влияние аурумакрила на гибель фибробластов кожи человека *in vitro*: 1 – изменение доли погибших клеток в зависимости от концентрации препарата; 2 – расчетное значение концентрации препарата, вызывающей гибель 50% клеток ($ИК_{50}$). По оси абсцисс – концентрация аурумакрила, мг/мл; по оси ординат – доля погибших клеток, %.

Таблица 2. Значения дозы аурумакрила, вызывающей гибель 50% клеток ($ИК_{50}$) для ряда клеточных культур опухолей человека и фибробластов кожи человека

Клеточная линия	$ИК_{50}$ (мкг/мл)
Рак легкого A549	60
Меланома Mel Mo	80
Рак молочной железы MCF-7	90
Рак толстой кишки HCT116	180
Фибробласты кожи hFB-hTERT6	90

следуемого агента на опухоль. Естественно, исследование только на фибробластах кожи не следует рассматривать как достоверный показатель цитотоксичности агента по отношению ко всем нормальным клеткам, для этого необходимо изучить действие агента на нормальные клетки разных тканей.

В то же время следует заметить, что селективность противоопухолевого действия различных соединений в значительной степени зависит не только от их непосредственной цитотоксичности, выявляемой в экспериментах *in vitro*, но и от фармакокинетики и метаболизма изучаемых агентов *in vivo*.

Установление цитотоксичности исследуемого агента в отношении любых нормальных клеток может указывать и на возможность развития нежелательных побочных явлений при применении исследуемого агента – потенциального лекарственного средства. Это следует учитывать при проведении доклинических токсикологических исследований, которые в конечном итоге и определяют вероятность и тяжесть токсических реакций на введение препарата и возможность его клинического изучения с точки зрения безопасности и переносимости.

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что аурумакрил может оказывать цитотоксическое действие на нормальные клетки.

В этом отношении аурумакрил, по-видимому, не отличается от других комплексных золотосодержащих веществ различного химического строения, которые интенсивно исследуются в последние годы в качестве новых для химиотерапии потенциальных противоопухолевых средств [1].

Так, например, препарат ауранофин (мономерный комплекс, состоящий из третичного фосфина и координированной с золотом тиоглюкозы), проходящий клинические испытания в качестве противоопухолевого препарата, обладает одинаковой цитотоксичностью по отношению к опухолевым и нормальным клеткам. Для клеток

рака молочной железы человека линии CMF-7 $ИК_{50}$ ауранофина составляет 13.1 мкМ, а для фибробластов легких человека линии GM07492 – 15.4 мкМ [8]. Следует отметить, что, несмотря на значительную цитотоксичность препарата по отношению к нормальным фибробластам, ауранофин в течение многих лет применяется в качестве лекарственного средства для лечения больных ревматоидным артритом, а с 2012 г. и для лечения амебиоза [1].

Цитотоксический эффект биядерных комплексов фосфана, включающих ион одновалентного золота, был одинаков по отношению к первичным фибробластам человека и к клеткам рака толстой кишки линии HCT116 [9].

Обращает на себя внимание значительное цитотоксическое действие DMSO, обнаруженное в наших экспериментах. Даже при концентрации DMSO в культуральной среде, равной 0.16%, которую принято считать не цитотоксической, мы регистрировали заметную гибель фибробластов. Возможно, использованная в проведенных экспериментах линия фибробластов кожи человека имеет повышенную чувствительность к цитотоксическому действию разных агентов.

Значительная цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам свойственна многим конвенциональным противоопухолевым препаратам, широко применяемым в клинической практике, причем для некоторых препаратов она может даже превосходить цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам.

Показано, что $ИК_{50}$ препарата цисплатины для клеток рака молочной железы человека CMF-7 составляет 111.3 мкМ, а для фибробластов легких человека линии GM07492-A – 69.0 мкМ [8]. Установлено также, что фибробласты периодонтальной связки гораздо более чувствительны к цитотоксическому действию цисплатины ($ИК_{50} = 0,2$ мкМ), чем клетки разных опухолей. Так, $ИК_{50}$ составляет для клеток рака молочной железы линии T47D 13.6 мкМ, для клеток рака легкого линии A549 – 3.7 мкМ, для клеток хронического лимфолейкоза линии K562 – 8.8 мкМ, для рака поджелудочной железы линии PAN – 2.1 мкМ. Только клетки рака кожи оказались сопоставимы по чувствительности к цитотоксическому эффекту цисплатины с чувствительностью фибробластов ($ИК_{50} = 0.2$ мкМ) [10].

Чувствительность к цитотоксическому действию доксорубина клеток нормального эпителия молочной железы линии MCF-10A ($ИК_{50}$ составляет 0.55 мкМ) также значительно превосходит чувствительность к этому, одному из наиболее часто употребляемых в клинике противоопухолевому препарату, разных опухолевых клеток – гепатоцеллюлярного рака линии HepG2

($IK_{50} = 28.04$ мкМ), рака молочной железы линии MCF-7 ($IK_{50} = 6.0$ мкМ), рака головы-шеи линии FaDu ($IK_{50} = 1.27$ мкМ) [11].

Полученные в настоящей работе результаты подтверждают наличие значительной цитотоксичности у полиакрилата золота и при этом свидетельствуют об отсутствии преимущественной по сравнению с нормальными клетками непосредственной цитотоксичности препарата в отношении опухолевых клеток. Возникает вопрос — не является ли цитотоксичность этого соединения в отношении фибробластов указанием на вероятную бесперспективность его дальнейшего изучения в качестве потенциального противоопухолевого средства. Очевидно, что ответ на этот вопрос должен быть отрицательным, поскольку, как показано выше, цитотоксичность в отношении фибробластов не явилась препятствием для введения в широкую клиническую практику эффективных противоопухолевых препаратов, в частности таких, как цисплатина и доксорубин.

Представляется, что не следует рассматривать выявляемую в опытах *in vitro* непосредственную цитотоксичность в отношении фибробластов в качестве указания на отсутствие селективности действия препарата по отношению к опухоли *in vivo*. Известно, что важную роль в обеспечении селективности фармакологического действия лекарственного средства играет фармакокинетика препарата *in vivo*, которая может обеспечить более или менее полную селективность попадания препарата (его активной формы) в пораженную ткань и в клетки-мишени.

Ранее нами при изучении фармакокинетики аурумакрила у мышей с перевиваемой карциномой Льюис было обнаружено, что после внутрибрюшинного введения аурумакрила он значительно быстрее попадает в опухоль, по сравнению с нормальными тканями. Максимум концентрации препарата в опухоли отмечен через 24 ч после его введения, а в тканях нормальных органов — через 48 ч. Такие различия в достижении максимальной концентрации аурумакрила между опухолевыми и нормальными тканями могут оказаться существенными для реализации противоопухолевого эффекта препарата [12].

Подобное предположение обусловлено тем, что, как было показано в опытах *in vitro* с культурой клеток рака молочной железы MCF-7, цитотоксичность аурумакрила прямо пропорциональна содержанию в препарате иона трехвалентного золота [5]. Известно, что в физиологических условиях ионы одновалентного или трехвалентного золота, входящие в состав комплексных золотосодержащих соединений, обладающих противоопухолевым эффектом, подвергаются быстрому восстановлению [2]. Можно полагать, что

аурумакрил не является исключением. Очевидно, что чем раньше после введения в организм препарат попадет к клеткам — мишеням, тем больше будет концентрация в них Au^{3+} и, следовательно, более значительным цитотоксический эффект. Весьма вероятно, что реализация такого рода механизма может способствовать определенной селективности действия аурумакрила на опухоль по сравнению с нормальными тканями.

Нет оснований также рассматривать цитотоксичность в отношении фибробластов *in vitro* как указание на вероятную высокую токсичность препарата *in vivo*.

Следует отметить, что терапевтический индекс (ТИ) аурумакрила, характеризующий соотношение летальной и эффективной доз препарата при его применении на моделях солидных опухолей мышей, имеет величину, равную 2.1, что соответствует пороговому значению общепринятого критерия терапевтического индекса для цитостатиков ($ТИ_{50} \geq 2$). Установленные токсиметрические характеристики аурумакрила при исследовании его острой токсичности *in vivo* позволяют отнести препарат к веществам третьего класса токсичности [4].

Естественно, вопрос о клинической безопасности препарата может быть решен только после проведения стандартного доклинического токсикологического изучения в специальных экспериментах.

Полученные в настоящей работе результаты, подтверждающие наличие значительной цитотоксичности у полиакрилата золота, могут рассматриваться как указание на целесообразность его дальнейшего изучения в качестве потенциального противоопухолевого препарата.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии* **64** (6), 697 (2018).
2. S. Nobili, E. Mini, I. Landini, et al., *Med. Res. Rev.* **30**, 580 (2010).
3. C. I. Yeo, K. K. Ooi, and E. R. Tiekink, *Molecules* **23**, 1410 (2018).
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика* **38** (12), 64 (2019).

5. А. В. Шибаева, Н. В. Позднякова, В. В. Спиридонов и др., Вестн. РГМУ **5**, 111 (2018).
6. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 642–657.
7. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., Биофизика **64**, (6) 1138 (2019).
8. A. M. de Almeida, B. A. de Oliveria, P. P. de Castro, et al., *Biometals* **30** (6), 841 (2017).
9. N. Svahn, A. J. Moro, C. Roma-Rodrigues, et al., *Chem. Eur. J.* **24** (55), 14654 (2018).
10. M. Alkhalil, Y. Al-Hiari, V. Kasabri, et al., *Drug Develop. Res.* **81** (4), 470 (2020).
11. J. Wang, G. Vlong, G. Li, et al., *Molecules* **24** (24), 4505 (2019).
12. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Ж. П. Бурмий и др., Биофизика **63** (3), 606 (2018).

The Cytotoxic Effect of Aurum Polyacrylate (Aurumacril) on Human Skin Fibroblasts

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

*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

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

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

The cytotoxic effect of the potential antitumor drug aurumacryl (aurum polyacrylate) on the hFB-hTERT6 human skin fibroblast cell line has been studied in vitro. It has been established that aurumacril exhibits substantial cytotoxicity to human skin fibroblasts. The maximum of cytotoxic effect (75% cell death) was observed when the concentration of aurumacryl was 0.125 mg/ml. The inhibitory concentration of aurumacryl causing 50% human skin fibroblast death (IC50) was 0.09 mg/ml.

Keywords: aurumacryl (aurum polyacrylate), cytotoxic activity, hFB-hTERT6 human skin fibroblast cell line