

ИНДУКЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ СТРУКТУРЫ ДНК ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОЛИАКРИЛАТОМ ЗОЛОТА

© 2023 г. А.К. Чигасова*, Л.А. Островская*, #, Д.Б. Корман*

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

#E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 14.10.2022 г.

После доработки 14.10.2022 г.

Принята к публикации 18.10.2022 г.

Изучена способность полиакрилата золота (аурумакрила) вызывать изменения в структуре ДНК опухолевых клеток (на примере культуры клеток карциномы молочной железы человека MCF-7). Установлено, что молекулярный механизм действия аурумакрила на опухолевые клетки связан с индукцией однонитевых разрывов и сшивок в молекуле ДНК. Наряду с этим показана способность аурумакрила снижать число спонтанных либо индуцированных облучением двухнитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках MCF-7.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), культура клеток MCF-7, однонитевые разрывы ДНК, двухнитевые разрывы ДНК, сшивки ДНК.

DOI: 10.31857/S0006302923010027, EDN: NYQIWK

Современные подходы к разработке и изучению новых противоопухолевых препаратов включают в себя обязательное установление мишеней, на которые направлено действие изучаемого соединения, а также механизмов этого действия.

В последние годы внимание исследователей, разрабатывающих инновационные подходы к лекарственному лечению злокачественных опухолей, привлекают комплексные соединения благородных металлов, в первую очередь, золотосодержащие соединения, для многих из которых установлена существенная цитотоксичность и противоопухолевая активность, свидетельствующие о перспективности изучения такого рода веществ в качестве лекарственных средств для лечения злокачественных опухолей. В то же время сведения о мишенях и механизмах действия этих препаратов пока достаточно противоречивы, что указывает на необходимость проведения исследований в данном направлении [1, 2].

Ранее нами было установлено, что, оригинальное золотосодержащее соединение — полиакрилат золота (аурумакрил) — представляющее собой золотосодержащий полимер, оказывает выраженное цитотоксическое действие на культуры клеток ряда опухолей человека *in vitro* и обладает противоопухолевой активностью, зарегистрированной на нескольких штаммах перевиваемых опухолей мышей *in vivo* [3–6].

Полученные результаты указывают на необходимость исследования механизмов действия аурумакрила и установление мишеней, взаимодействие с которыми включает эти механизмы.

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 [7].

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

Целью настоящего исследования было изучение способности аурумакрила индуцировать разрывы ДНК и образование ДНК-сшивок в опухолевых клетках (культура клеток карциномы молочной железы человека MCF-7).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат. Исследовавшийся препарат аурумакрила представляет собой неполную золотую соль полиакриловой кислоты, содержащую 8 массовых процентов (8 масс. %) ионов металла, отвечает общей формуле $(-\text{CH}_2-\text{CH}-$

$\text{COOH-})_n(-\text{CH}_2\text{CHCOO}(\text{AuCl}_3\text{H-}))_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимера составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препарата содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 см^{-1} соответственно. Субстанция препарата представляет собой стекловидные пластинки золотистого цвета, хорошо растворимые в воде. Оценка эффектов препарата *in vitro* проведена при его применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 1 до 1000 мкг/мл.

Культура клеток. Эксперименты проведены с использованием культуры клеток рецептор-положительной карциномы молочной железы человека MCF-7, полученной из банка опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Культивирование клеток проводили 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_2 (МСО-18АС, Саноу, Япония). В дальнейшем клетки снимали с поверхности флаконов 0.25%-м раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия) и пассировали с плотностью 200 кл/см² 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 ~70–80%). Клетки снимали с пластика раствором трипсина-ЭДТА с последующей инактивацией трипсина и отмывкой клеток в полной среде. Клетки пассировали в 35 мм чашки Петри, содержащие покровные стекла (SPL Lifesciences, Южная Корея). Действие аурумакрила в различных концентрациях (1, 10, 100 и 1000 мкг/мл) изучено при инкубации клеток с препаратом при 37°C в течение 1, 6 и 24 ч при параллельном инкубировании интактных клеток в качестве контроля [8].

Анализ одонитевых разрывов ДНК. Для анализа одонитевых разрывов ДНК, индуцированных аурумакрилом, использовали метод электрофореза единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет). Суспензию контрольных или обработанных аурумакрилом клеток MCF-7 смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1:1) и наносили по 70 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали при

4°C в течение 10 мин. Затем в течение 60 мин клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: 2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 10% диметилсульфоксида, 1% Triton X100) и щелочному электрофорезу (раствор для электрофореза: 300 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, pH >13; стабилизация по напряжению – 0.75 В/см; 20 мин при 4°C) с дальнейшей нейтрализацией в течение 3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C. Для окраски ДНК использовали краситель акридиноранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4). Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab, Польша).

Образование одонитевых разрывов в структуре ДНК определяли по уровню миграции ДНК в геле агарозы, используя показатель «процент ДНК в хвосте ДНК-комет». Влияние аурумакрила на образование одонитевых разрывов ДНК оценивали, сравнивая показатель «процент ДНК в хвосте ДНК-комет» в обработанных препаратом золотых клетках с аналогичным показателем в контрольных клетках. Превышение этого показателя в клетках, инкубированных с аурумакрилом, по сравнению с контрольными клетками свидетельствует о том, что аурумакрил в исследуемой концентрации индуцирует одонитевые разрывы.

Анализ двухнитевых разрывов ДНК. Для выяснения способности аурумакрила индуцировать двухнитевые разрывы ДНК использовали иммуноцитохимический метод определения в клетках фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γH2AX), детектирующего двухнитевой разрыв ДНК. Полагают, что один фокус H2AX соответствует сайту репарации одного двухнитевого разрыва ДНК.

Количественный анализ фокусов γH2AX в настоящее время широко используется для изучения радиационно-индуцированных двухнитевых разрывов ДНК, образующихся в большом количестве в клетках после облучения.

В ряде экспериментов по изучению способности аурумакрила влиять на двухнитевые разрывы ДНК нами было использовано облучение клеток в качестве фактора, индуцирующего образование большого числа двухнитевых разрывов ДНК.

Для этого клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, предварительно инкубированные с аурумакрилом в концентрациях 10, 50, 100, 500 и 1000 мкг/мл при 37°C в течение 24 ч, облучали на рентгеновской биологической установке «РУСТ-М1» (ООО «Диагностика-М», Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излуча-

телями, в дозе 5 Гр (мощность дозы 0.85 Гр/мин, напряжение 100 кВ, ток 0.8 мА, фильтр 1.5 мм Al) при температуре 4°C (для охлаждения использовались термогранулы «LAB ARMOR BEADS», Life Technologies Thermo Fisher Scientific, США). Погрешность отпускаемой дозы не превышала 15%. Облученные клетки инкубировали в стандартных условиях в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂) в течение 24 ч с параллельной инкубацией интактных клеток в качестве контроля, после чего определяли уровень фокусов γ H2AX в соответствии с приводимой ниже методикой.

Интактные и облученные клетки MCF-7 фиксировали на покровных стеклах параформальдегидом (4% в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4) в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и пермеабилizировали 0.3%-м Тритон X100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания.

При проведении иммуноцитохимического окрашивания слайды инкубировали в течение часа при комнатной температуре с первичными антителами к белку γ H2AX (разведение 1/200, клон EP854(2)Y, Merck-Millipore, США) в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. Затем промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и инкубировали при комнатной температуре в течение часа с вторичными антителами IgG (H + L), конъюгированными с флуорохромами (антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с Rhodamine (Merck-Millipore, США), в разведении 1/400) в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. Для окраски ДНК и предотвращения фотоблещивания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MF-cool (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340–380 нм – возбуждение и 435–485 нм – эмиссия), B-2E/C (465–495 нм – возбуждение и 515–555 нм – эмиссия) и Y-2E/C (540–580 нм – возбуждение и 600–660 нм – эмиссия).

Анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов γ H2AX использовали программу DARFI.

Анализ ДНК-сшивок. Изучение влияния аурумакрила на ДНК опухолевых клеток MCF-7 проводили путем детектирования сшивок ДНК с ис-

пользованием метода ДНК-комет в щелочных условиях.

Клетки инкубировали с аурумакрилом в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкг/мл в течение часа при 37°C. Затем клетки дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (pH 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспензию, содержащую 1·10⁶ клеток в 1 мл. Суспензию контрольных или обработанных полиакрилатом золота клеток смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1 : 1) и наносили по 70 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали 10 мин при 4°C. Затем в течение часа клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: 2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л Na₂ЭДТА, 10% диметилсульфоксида, 1% Triton X100) и щелочной денатурации с последующим проведением электрофореза (раствор для щелочной денатурации и электрофореза: 100 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л Na₂ЭДТА, pH 12.5; стабилизация по напряжению – 2 В/см, 20 мин при 4°C) и с дальнейшей нейтрализацией в течение 3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C. Для окраски ДНК использовали краситель акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4). Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab, Польша).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенное экспериментальное исследование влияния аурумакрила на структуру ДНК клеток рака молочной железы человека MCF-7 включает в себя оценку способности препарата индуцировать одно- и двухнитевые разрывы, а также сшивки ДНК.

Однонитевые разрывы ДНК. Влияние аурумакрила на образование однонитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7 характеризуют данные, представленные на рис. 1.

Как видно, аурумакрил индуцирует образование однонитевых разрывов ДНК при применении только в наибольшей из изученных концентраций (1000 мкг/мл), причем этот эффект практически не зависит от сроков инкубирования

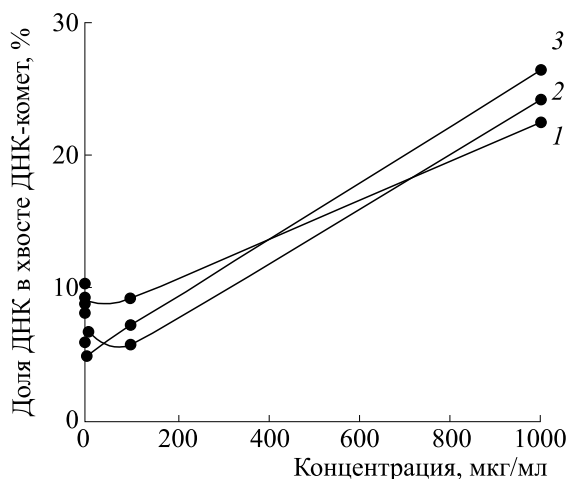


Рис. 1. Влияние аурумакрила на образование одностранных разрывов ДНК в клетках MCF-7: изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аурумакрила при различных сроках инкубации (кривая 1 — 1 ч, кривая 2 — 6 ч, кривая 3 — 24 ч).

клеток с препаратом. Так, доля ДНК в хвосте комет через 1, 6 и 24 ч инкубации клеток с препаратом составляет 22, 24 и 26% соответственно, увеличиваясь в 2.4, 4.7 и 4.5 раза по сравнению с контролем (рис. 1).

Этот эффект также наглядно иллюстрируют данные диаграммы распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет, в контроле и при воздействии аурумакрила (рис. 2). Как видно из представленных на диаграмме данных, количество клеток с

долей ДНК в хвосте ДНК-комет более 20% увеличилось после 6 ч культивирования с аурумакрилом с ~3% в контроле до 47%. Примерно такое же соотношение между числом клеток в хвосте ДНК-комет для интактных и обработанных аурумакрилом клеток зарегистрировано и после инкубирования в течение 24 ч — 6% и 47% соответственно (рис. 2).

Таким образом, очевидно, что аурумакрил в концентрации 1000 мкг/мл индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 одностранных 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.

Двухнитевые разрывы ДНК. Способность аурумакрила вызывать двухнитевые разрывы ДНК охарактеризована в соответствии с показателем уровня фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), регистрируемого в клетках MCF-7, подвергавшихся воздействию препарата, по сравнению с контролем.

Изменение уровня фокусов γ H2AX в ДНК опухолевых клеток после инкубации с различными концентрациями аурумакрила в течение 24 и 48 ч показано на рис. 3.

Как видно, культивирование клеток MCF-7 в течение 24 и 48 ч приводит к спонтанному образованию двухнитевых разрывов ДНК, при котором уровень фокусов γ H2AX имеет значения, равные 1.92 и 2.17 соответственно (рис. 3).

Влияние аурумакрила на уровень фокусов γ H2AX (двухнитевые разрывы ДНК), имеет дозо-

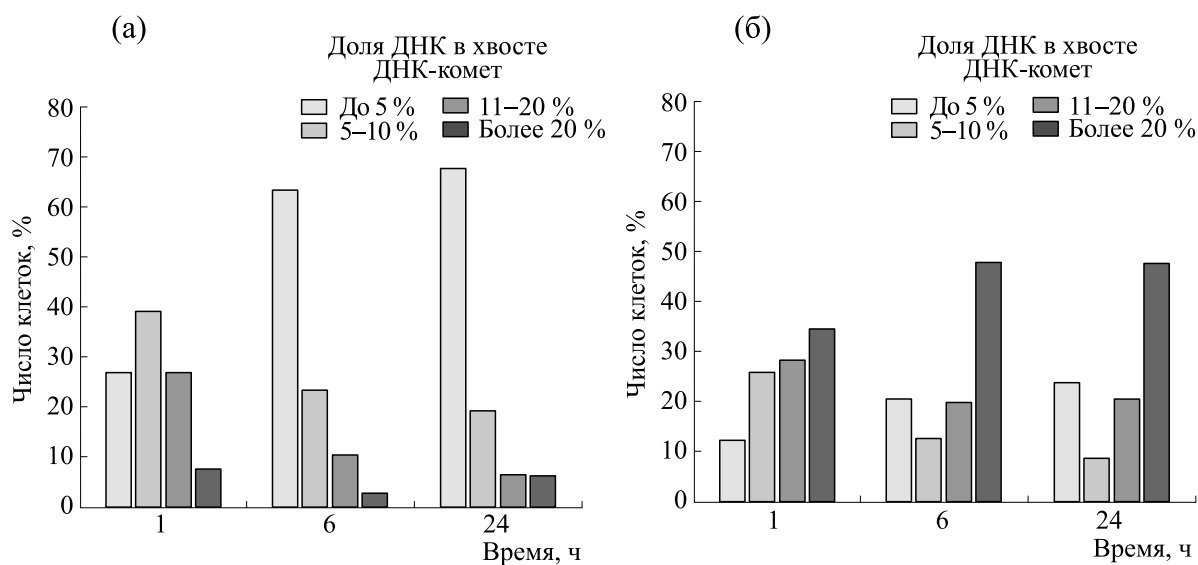


Рис. 2. Диаграмма распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет, в контроле (а) и при воздействии аурумакрила в концентрации 1 мкг/мл (б) в зависимости от сроков инкубирования клеток с препаратом.

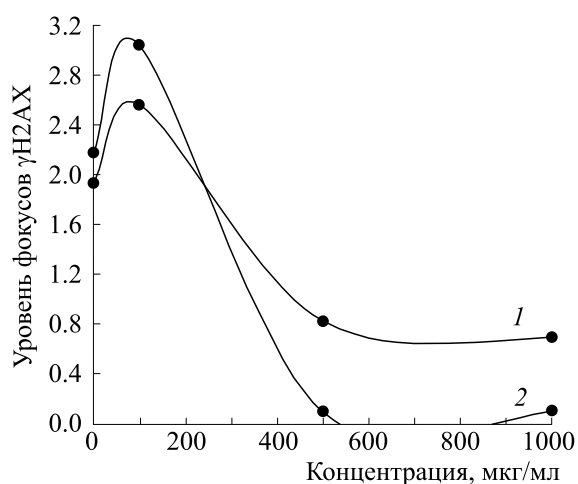


Рис. 3. Влияние аурумакрила на образование двухнитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7: изменение числа фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в зависимости от концентрации аурумакрила при инкубации клеток в течение 24 ч (кривая 1) и 48 ч (кривая 2).

зависимый характер. При воздействии аурумакрила в концентрации 100 мкг/мл спонтанный уровень двухнитевых разрывов ДНК практически не изменяется. Однако при увеличении концентрации препарата до 500 и 1000 мкг/мл уровень фокусов γ H2AX снижается до значений, составляющих соответственно 0.7–0.8 и 0.1, при инкубации как в течение 24 ч, так и 48 ч (рис. 3).

Иными словами, аурумакрил через 48 ч инкубации с опухолевыми клетками вызывает снижение уровня спонтанных двухнитевых разрывов в 21 раз при применении в концентрациях как 500, так и 1000 мкг/мл (рис. 3).

Для того чтобы подтвердить способность аурумакрила снижать уровень двухнитевых разрывов ДНК, нами были проведены эксперименты с использованием облучения клеток в качестве фактора, индуцирующего образование большого числа двухнитевых разрывов ДНК.

С этой целью клетки, предварительно инкубированные в течение 24 ч с различными концентрациями аурумакрила, облучали на рентгеновской биологической установке и определяли количество фокусов γ H2AX спустя 24 ч после облучения.

Как видно из данных, приведенных на рис. 4, облучение, действительно привело к значительному возрастанию уровня двухнитевых разрывов ДНК. Количество фокусов γ H2AX в облученных клетках, не подвергавшихся воздействию аурумакрила, составило 9.56, что примерно в 5 раз превышает спонтанный уровень двухнитевых разрывов (равный ~2), возникающих в процессе культивирования клеток (рис. 3 и 4).

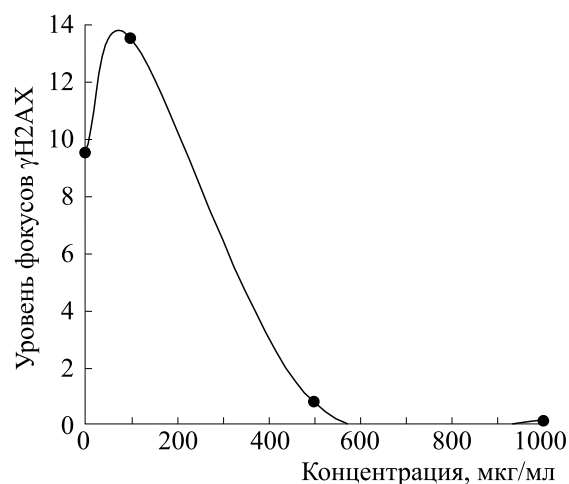


Рис. 4. Влияние аурумакрила на уровень двухнитевых разрывов ДНК, индуцированных облучением, в клетках MCF-7: изменение уровня фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в зависимости от концентрации аурумакрила.

В то же время характер влияния аурумакрила на количество фокусов γ H2AX в облученных клетках практически не отличался от наблюдаемого в интактных клетках. Применение аурумакрила в концентрации 100 мкг/мл достоверно не изменило уровень фокусов γ H2AX в облученных клетках при сохранении тенденции к увеличению этого параметра. Применение более высоких концентраций аурумакрила (500 и 1000 мкг/мл) привело к резкому снижению уровня фокусов γ H2AX в облученных клетках до значений, составляющих 0.75 и 0.12 соответственно (рис. 4).

Таким образом, показано, что предварительное (до облучения) воздействие аурумакрила приводит к значительному снижению числа двухнитевых разрывов ДНК, индуцируемых облучением. Уровень фокусов γ H2AX в облученных клетках при применении аурумакрила в концентрациях 500 и 1000 мкг/мл снижается в 12.7 и 80 раз соответственно.

Приведенные данные убедительно свидетельствуют о способности аурумакрила снижать число спонтанных, либо индуцированных облучением, двухнитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках MCF-7.

ДНК-сшивки. Известно, что при использовании метода ДНК-комет ДНК, мигрирующая во время электрофореза в геле агарозы к аноду, создает так называемый «хвост» ДНК-комет, который может содержать, в зависимости от условий проведения электрофореза, только фрагментированную ДНК (одно- и двухнитевые разрывы ДНК) или одновременно фрагментированную и неповрежденную ДНК. В последнем случае доля ДНК, остающаяся в «голове» ДНК-кометы, ха-

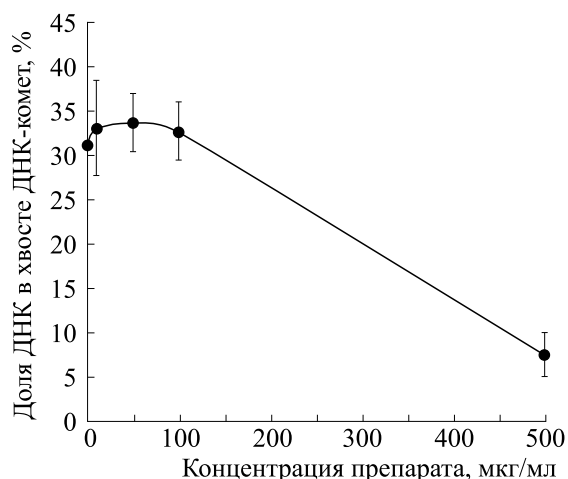


Рис. 5. Влияние аурумакрила на образование сшивок ДНК в клетках MCF-7: изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет клеток MCF-7 в зависимости от концентрации аурумакрила.

рактически не отличается от контроля. В то же время в клетках, подвергавшихся воздействию аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл, доля ДНК в хвосте ДНК-комет снижается в ~ 4 раза — с 31.2%, регистрируемых в контрольном образце, до 7.4%, определяемых в клетках, подвергавших-

ся воздействию аурумакрила. Соответственно, возрастает доля «сшитой» ДНК, остающейся в голове ДНК-кометы и не мигрирующей к аноду (рис. 5).
Полученные данные свидетельствуют о выраженном влиянии аурумакрила на структуру ДНК опухолевых клеток, выражающемся в индуцировании препаратом сшивок ДНК.
Этот эффект наглядно иллюстрирует диаграмма распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет через 1 ч после инкубации с аурумакрилом, показанная на рис. 6.
Как видно, около 70% интактных клеток карциномы MCF-7 в контроле после проведения электрофореза содержали более 25% ДНК в хвосте ДНК-комет.

Аналогичное распределение клеток в соответствии с содержанием ДНК в хвосте ДНК-комет наблюдается для клеток, подвергавшихся в течение часа воздействию аурумакрила в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл.

Иное распределение клеток наблюдается при воздействии аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл. Показано, что около 60% клеток содержали менее 5% ДНК в хвосте ДНК-комет, что свидетельствует о выраженной способности аурумакрила вызывать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток (рис. 6).

Очевидно, что представленные данные свидетельствуют о выраженной способности аурумакрила вызывать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток.

Таким образом, в результате исследования влияния аурумакрила на структуру ДНК клеток карциномы молочной железы человека MCF-7

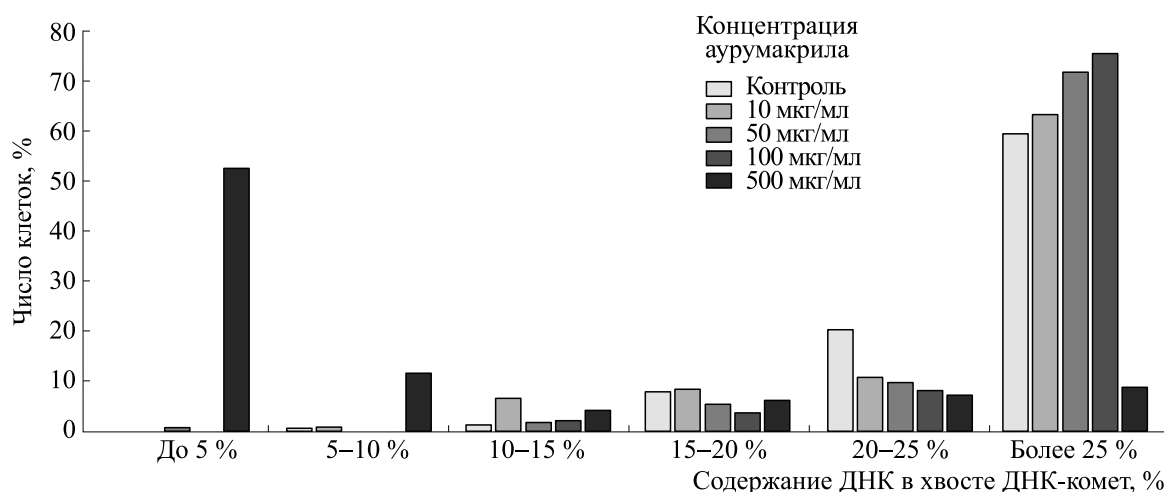


Рис. 6. Распределение клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 в соответствии с содержанием ДНК в хвосте ДНК-комет после воздействия аурумакрила в различных концентрациях (время инкубации 1 ч).

установлено, что молекулярный механизм действия аурумакрила на опухолевые клетки связан с индукцией односторонних разрывов и сшивков в молекуле ДНК. Наряду с этим показана способность аурумакрила снижать число спонтанных, либо индуцированных облучением, двусторонних разрывов ДНК в опухолевых клетках MCF-7.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования механизмов действия золотосодержащих комплексных соединений, обладающих цитостатической и противоопухолевой активностью, показывают, что эти соединения могут рассматриваться как мультитаргетные препараты.

Установлено, что мишенями для действия золотосодержащих комплексов могут быть клеточные органеллы (митохондрии, протеосома 26S, эндоплазматический ретикулум), различные внутриклеточные молекулы, играющие важную роль в опухолевом росте (тиоредоксинредуктаза; деубиквитиназы UCHL5 и USP14; протеосомы 26S; белки внутриклеточных сигнальных путей MARK, PI3K/AKT, TOR, JAK2, STAT3, EKR1/2; специфический ингибитор транскрипционного фактора FOXO3 – IKKB; рецептор эпидермального фактора роста – EGFR; фактор роста эндотелия сосудов – VEGF; топоизомераза I). Механизм действия разных комплексов, также как их различная цитотоксичность, во многом определяются природой лигандов, соединенных с одно- или трехвалентным золотом в структуре конкретного комплекса [2].

Практически для всех изученных золотосодержащих комплексов показано, что их цитотоксический эффект во многом опосредован воздействием на ферментную систему антиоксидантной защиты – систему «тиоредоксин–тиоредоксинредуктаза», регулируемую уровнем активных форм кислорода в митохондриях и цитозоле. Ингибирование золотосодержащими соединениями тиоредоксинредуктазы, обусловленное высокой аффинностью золота к селену, входящему в селеноцистеин в активном центре фермента, с образованием связей Au-Se, ведет к повышению уровня окисленного тиоредоксина и тем самым лишает тиоредоксин антиоксидантной активности. В результате меняется внутриклеточный окислительно-восстановительный баланс, что ведет к увеличению интрацеллюлярного уровня активных форм кислорода, развитию оксидативного стресса и апоптотической гибели клеток [2].

Следует отметить, что индукция разными способами оксидативного стресса, рассматривается как одно из перспективных направлений в поисках средств для противоопухолевой лекарственной терапии [9].

Влияние золотосодержащих комплексов на структуру ДНК изучено гораздо меньше, полученные результаты весьма противоречивы.

В большинстве исследований влияние золотосодержащих комплексов на структуру ДНК выполнены в модельных экспериментах с изолированной ДНК тимуса теленка.

Показано, что комплексы одно- и трехвалентного золота с различными лигандами слабо связываются с ДНК, при этом связь по природе не ковалентная, а электростатическая и обратимая [10]. Так, показано, что в ДНК опухолевых клеток, инкубированных с комплексами трехвалентного золота с терпиридинами в качестве лигандов, ион золота связывается с нуклеотидами в соотношении 1 : 6400 и 1 : 4900. При этом интенсивность электростатического связывания золота с ДНК зависела от стерических особенностей лигандов и коррелировала с цитотоксичностью комплексов [11].

В ряде исследований показана способность некоторых комплексов трехвалентного золота с разными лигандами (алкинилы, пирозин-дипиразолы, инертные доноры NO) интеркалировать ДНК [12]. В то же время при исследовании двух комплексов трехвалентного золота с тиосемикарбазонатными лигандами интеркаляции ДНК не зарегистрировано [13].

В экспериментах с изолированной ДНК плазмиды pBR322 установлено связывание с ДНК комплексов одно- и трехвалентного золота с разными лигандами с образованием межнитевых ДНК-сшивков. Показано, что на способность комплексов образовывать сшивки не влияет степень окисленности золота; более эффективны комплексы, в которых имеется два или более лигандов, слабо координированных с ионами золота [14].

Обнаружено в опытах *in vitro* с разными линиями опухолевых клеток (HeLa, MCF-7, HCT11), что комплекс одновалентного золота с парациклофаном, обладающий значительной цитотоксичностью (IC_{50} колебался в пределах от 3.5 мкМ до 38 мкМ), способен индуцировать двусторонние разрывы ДНК [15].

Следует заметить, что для комплексного соединения двухвалентной платины (противоопухолевый препарат цисплатин – дихлордиаминоплатина) основной внутриклеточной мишенью является ДНК. Возникающий в результате внутриклеточного гидролиза исходного соединения платиносодержащий ион образует аддукты с ДНК путем формирования координационных связей между атомом платины и двумя основаниями ДНК (преимущественно гуанином). В результате образуются плохо репарируемые и длительно существующие внутри- и межнитевые сшивки ДНК [7].

Как показано в проведенном нами исследовании, молекулярный механизм действия полиакрилата золота (аурумакрил), представляющего собой, в отличие от всех изученных золотосодержащих комплексов, золотосодержащий полимер, связан с воздействием на ДНК опухолевых клеток.

Так, аурумакрил способен дозозависимо индуцировать образование однонитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках линии MCF-7. Под влиянием препарата (1000 мкг/мл) число однонитевых разрывов ДНК в клетках возрастает в 3.0–4.5 раза по сравнению со спонтанным уровнем разрывов ДНК, наблюдаемых в контроле, уже через час инкубации и сохраняется на протяжении 24 ч культивирования клеток.

Следует отметить, что максимальный цитотоксический эффект аурумакрила в отношении клеток MCF-7 отмечался также при концентрации препарата, равной 1000 мкг/мл [5, 6].

В то же время увеличение двухнитевых разрывов ДНК под влиянием аурумакрила не отмечено. Более того, показана способность препарата снижать число как спонтанных, так и индуцированных облучением двухнитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках MCF-7.

Так, 24-часовая инкубация клеток с аурумакрилом (500–1000 мкг/мл) приводит к снижению уровня спонтанных двухнитевых разрывов ДНК (регистрировался по количеству фокусов γ H2AX) в два-три раза, а после 48-часовой инкубации уровень γ H2AX снижается на порядок по сравнению с контролем. В облученных клетках MCF-7, предварительно в течение 24 ч инкубированных с аурумакрилом, уровень фокусов γ H2AX, регистрируемый через 24 ч после облучения, снизился на порядок по сравнению с наблюдаемым в облученных клетках, не подвергавшихся воздействию аурумакрила.

Показано, что аурумакрил способен вызывать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток. Так, уже после часовой инкубации клеток MCF-7 с аурумакрилом (500 мкг/мл) уровень сшивок ДНК в клетках увеличился примерно в четыре раза.

Экспериментально обнаруженный факт уменьшения в клетках под влиянием аурумакрила уровня двухнитевых разрывов ДНК требует для своего объяснения специального изучения и предположительно может быть связан с ранним образованием ДНК-сшивок. Характер образующихся ДНК-сшивок (ДНК–ДНК или/и ДНК–белок) остается неясным. Ответ на это вопрос является задачей последующих исследований.

Основываясь на полученных данных следует констатировать, что препарат аурумакрил способен изменять структуру ДНК опухолевых клеток, индуцируя образование однонитевых разрывов ДНК и сшивок ДНК. Таким образом, молекула

ДНК может рассматриваться в качестве одной из мишеней для реализации цитотоксического действия полиакрилата золота.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, Л. А. Островская, Н. В. Блюхтерова и др., *Биофизика*, **66** (6), 1229 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106020X
2. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии*, **64** (6) 697 (2018).
3. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика*, **38** (12), 64 (2019).
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Росс. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 74 (2020).
5. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **66** (5), 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
6. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (1), 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
7. Д. Б. Корман. *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).
8. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Биофизика*, **62** (3), 598 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917030150
9. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика*, **64** (3), 552 (2019). DOI: 10.1134/S0006350919030102
10. L. Messori, P. Orioli, C. Tempi, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 852 (2001). DOI: 10.1006/bbrc.2001.4348
11. P. Shi, Q. Jiceng, Y. Zhao, et al., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **11**, 745 (2006). DOI: 10.1007/s00755-006-0120-y
12. M. S. Alsaedi, B. A. Babgi, M. A. Hussein, et al., *Molecules*, **25**, 1933 (2020). DOI: 10.3390/j.molecules.25051033
13. B. Possato, L. R. Dalmolin, L. M. Pereira, et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **162**, 105834 (2021). DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105834
14. C. K. Mirabelli, J. B. Zimmerman, H. R. Bartus, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 1435 (1986). DOI: 10.1016/0006-2952(86)90107-3
15. S. Bestgen, C. Seide, T. Wiesher, et al., *Chemistry*, **23**, 6315 (2017). DOI: 10.1002/chem.201605337

Induction of Damage to the DNA Structure of Tumor Cells by Aurum Polyacrylate**A.K. Chigasova*, L.A. Ostrovskaya*, and D.B. Korman*****Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

The ability of aurum polyacrylate (aurumacryl) to cause changes in the DNA structure of tumor cells (culture of MCF-7 human breast cancer cells) was studied. It was established that the molecular mechanism underlying the effects of aurumacryl on tumor cells is associated with the induction of single-strand breaks and cross-links in the DNA molecule. At the same time, it was shown that aurumacryl can reduce the number of spontaneous, or irradiated, DNA double-strand breaks in MCF-7 cells.

Keywords: aurum polyacrylate (aurumacryl), culture of MCF-7 cells, DNA single-strand breaks, DNA double-strand breaks, DNA cross-links