

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 61:615.28:612.42

© Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ НОВОГО АЦИДОКОМПЛЕКСА ПАЛЛАДИЯ (II) И ЦИСПЛАТИНА В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

А.К. Грехова^{1*}, Л.Б. Горбачева¹, Н.А. Иванова², И.А. Ефименко², А.Н. Осипов³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва,
ул. Косыгина, 4; тел.: (495) 939-7254; факс: (499)137- 4101;
эл. почта: annagrekhoval@gmail.com

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва

³Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный
медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

На лимфоцитах крови человека *in vitro* проведены сравнительные исследования генотоксического действия цисплатина и первого представителя нового класса катионно-анионных комплексов палладия – препарата морфозол ($[AH]_2[PdCl_4]$, где А - метилморфолин). В результате изучения процессов образования сшивок ДНК-ДНК, показано, что для обоих изученных соединений наблюдается двухфазность зависимости эффекта от дозы: линейное снижение доли ДНК в “хвосте” ДНК-комет и область “плато”. Однако, в области “плато” морфозол снижает долю ДНК в “хвосте” ДНК-комет в 6 раз, а цисплатин – всего в 2 раза. Морфозол, подобно цисплатину, индуцируя сшивки ДНК - белок и генерируя активные формы кислорода, оказался более эффективным по сравнению с цисплатином.

Ключевые слова: противоопухолевые препараты, цисплатин, соединение палладия, морфозол, повреждения ДНК, оксидативный стресс.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время препараты на основе платины занимают одно из ведущих мест в лечении различных форм злокачественных новообразований. Вместе с тем эти препараты характеризуются серьезными побочными эффектами, такими как нефротоксичность и нейротоксичность [1]. В 2002 году в докладе ВОЗ было отмечено, что соединения палладия потенциально должны обладать значительно более высокой противоопухолевой активностью как следствие их более высокой реакционной способности по сравнению с соединениями платины [2].

В Институте общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова (ИОНХ РАН) под руководством профессора И.А. Ефименко был открыт новый класс обладающих высокой противоопухолевой, радиопротекторной и иммуномодулирующей активностью ацидокомплексов палладия (II), $(AH_n)_m[PdCl_4]$, где А - амин [3, 4].

Среди большого числа изученных соединений этого класса наиболее перспективным оказался комплекс $[AH]_2[PdCl_4]$ (где А – метилморфолин, – морфозол [3]) как при его предклиническом исследовании, так и в плане оценки его противоопухолевой активности, оцененной *in vitro* на 7 различных культурах клеток солидных и асцитных опухолей [4].

* - адресат для переписки

ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ НОВОГО АЦИДОКОМПЛЕКСА ПАЛЛАДИЯ (II) *IN VITRO*

Исследование взаимодействия катионно-анионных комплексов палладия с ДНК показало их активное связывание с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями ДНК [5, 6]. Морфозол в условиях *in vitro* образует комплексы с пуриновыми, и в меньшей степени, с пиримидиновыми основаниями ДНК с образованием сшивок ДНК-ДНК [6], блокирующими репликацию *in vivo* [7]. Однако механизм генотоксического действия морфозола на ДНК практически не изучен.

Целью данной работы было сравнительное исследование генотоксического действия цисплатина $cis\text{-PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$ и морфозола $(\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO})_2[\text{PdCl}_4]$, на лимфоциты крови здоровых доноров. Лимфоциты крови обладают высокой чувствительностью к генотоксикантам, что очень важно не только при отборе новых соединений с высокой противоопухолевой активностью, но и будущем использовании в качестве модели, при оценке общей токсичности фармакологических препаратов. Полученные данные могут быть использованы также в качестве модели оценки общей токсичности фармакологических препаратов.

МЕТОДИКА. В работе использованы: коммерческий препарат “Цисплатин-Тева” (“Teva Pharmaceutical industries LTD”, Израиль) в виде 0,5% раствора в 0,9% NaCl, далее цисплатин, и комплекс палладия – морфозол, который был синтезирован в ИОНХ РАН [3]. Морфозол растворяли в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) непосредственно перед экспериментами.

Для исследования использовали гепаринизированную кровь пяти здоровых женщин-доноров в возрасте 23-25 лет, у которых было получено информированное согласие на проведение исследования.

Выделение лимфоцитов из крови проводили путём центрифугирования в градиенте плотности фикол-верографина (Histopaque-1077, “Sigma-Aldrich”, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. После выделения из крови отмытые лимфоциты ресуспензировали в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл.

Суспензию свежевыделенных лимфоцитов инкубировали с растворами цисплатина или морфозола различных концентраций при 37°C в течение 60 мин.

Для изучения сшивок ДНК-ДНК, индуцированных цисплатином и морфозолом, использовали метод электрофореза единичных клеток в щелочных средах (метод ДНК-комет) с дополнительной предобработкой клеток пероксидом водорода. Концентрация пероксида водорода – 50 мкмоль/л, была выбрана в результате предварительного эксперимента по влиянию пероксида водорода на индукцию односторонних разрывов ДНК. Показано, что в области концентраций пероксида водорода до 150 мкмоль/л, кривая “доза-эффект” хорошо описывается линейной функцией $y=4,9+0,7x$ ($R^2=0,91$), где y – % ДНК в “хвосте” ДНК-комет, x – концентрация пероксида водорода в мкмоль/л. Суспензию контрольных или обработанных цисплатином и морфозолом клеток подвергали воздействию пероксида водорода для индукции разрывов ДНК (50 мкмоль/л H_2O_2 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) в течение 15 мин при 4°C). Затем смешивали с 1% раствором легкоплавкой агарозы при 37,5°C (1:1) и наносили по 75 мкл на предметные стёкла, предварительно покрытые 1% раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и помещали на 10 минут при 4°C. 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% ДМСО; 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) и нейтрализация (3-5 мин в 0,4 ммоль/л Трис-HCl буфере при 4°C).

Для окраски ДНК использовали акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4). Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили с помощью программы AxioVision 4.8 (“Carl Zeiss”, Германия) на люминесцентном микроскопе Axioskop 40 FL (“Carl Zeiss”), оснащённом цифровой видеокамерой MRc5 (“Carl Zeiss”). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (“CASPlab”).

Для определения количества сшивок ДНК-белок использовали метод детергентного осаждения в модификации Осипова и др. [8], который включал в себя диссоциацию нековалентных ДНК-белковых комплексов посредством жесткой обработки додецилсульфатом натрия и селективное осаждение сшитого ДНК-белкового комплекса после замены ионов Na на K. Содержание ДНК определяли с использованием реактива PicoGreen (“Invitrogen”, США) на флуориметре Qubit фирмы “Invitrogen”. Количество сшивок ДНК-белок прямо пропорционально отношению количества ДНК в осадке к общему количеству ДНК в пробе.

Для оценки генерации активных форм кислорода (АФК) использовали краситель 5(6)-хлорометил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (“Invitrogen”), который легко проникает через клеточную мембрану и гидролизуется в клетке эстеразами с последующим окислением до флуоресцирующего комплекса. Окисленный краситель хорошо удерживается клетками и считается маркером внутриклеточных АФК [9]. Контрольные или обработанные противоопухолевыми препаратами клетки (1×10^6 клеток/мл) инкубировали при 37°C в фосфатном буфере (pH 7,4) с красителем (2 мкмоль/л) в течение 60 мин, а затем измеряли интенсивность их флуоресценции на флуориметре Qubit (“Invitrogen”) при длине волны возбуждения 480–490 нм и длине волны излучения 520–530 нм.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 7.0. Результаты представлены как среднее из пяти независимых результатов \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Основными мишенями цисплатина являются атомы азота гуанина и аденина ДНК. Связывание цисплатина с ДНК начинается с образования монофункциональных аддуктов ДНК с продуктом гидролиза исходного цисплатина *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)]:ДНК. В дальнейшем происходит замещение координированной молекулы воды в монофункциональном аддукте фрагментом ДНК с образованием бифункциональных аддуктов [*cis*-[Pt(NH₃)₂]:ДНК], формирующих внутри- и межнитевые “платинированные” сшивки ДНК, блокирующие репликацию и/или предотвращающие транскрипцию ДНК [10]. Известно, что 60-65% аддуктов, образованных цисплатином, являются внутринитевыми, а 20-25% - межнитевыми сшивками [11]. Известно, что морфозол также образует бифункциональные аддукты с азотистыми основаниями, преимущественно с гуанином и аденином, образуя сшивки в молекуле ДНК [6, 7].

На рисунке 1 представлены выборочные микрофотографии ДНК-комет контрольных лимфоцитов, после обработки пероксидом водорода в концентрации 50 мкмоль/л, а также после сочетанного воздействия цисплатина/морфозола и пероксида водорода в той же концентрации. Видно, что пероксид водорода вызывает значительное увеличение доли ДНК в “хвосте” ДНК-комет за счёт индукции одонитевых разрывов ДНК (рис. 1Б). Воздействие цисплатина, и в особенности морфозола, приводит к противоположному эффекту – снижению доли ДНК в “хвосте” ДНК-комет клеток, обработанных пероксидом водорода. Результаты исследований

ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ НОВОГО АЦИДОКОМПЛЕКСА ПАЛЛАДИЯ (II) *IN VITRO*

зависимости снижения электрофоретической подвижности поврежденной пероксидом водорода ДНК лимфоцитов от концентрации сшивающих агентов показали, что для обоих изученных соединений наблюдается двухфазная зависимость доза-эффект: 1) линейное снижение доли ДНК в “хвосте” ДНК-комет; 2) “плато” (рис. 2). Однако, если в случае цисплатина линейная зависимость описывается функцией $y=39,2-0,6x$ ($R^2=0,82$, где y – % ДНК в “хвосте” ДНК-комет, x – концентрация цисплатина, мкмоль/л) и наблюдается в диапазоне концентраций до 33 мкмоль/л, то в случае морфозола этот процесс имеет место при концентрации 22 мкмоль/л и описывается функцией $y=39,8-1,6x$ ($R^2=0,94$, y – % ДНК в “хвосте” ДНК-комет, x – концентрация морфозола, мкмоль/л). Сравнение линейных угловых коэффициентов, характеризующих изменение эффекта на единицу дозы, показывает, что морфозол эффективнее цисплатина приблизительно в 2,7 раза. Обращает на себя внимание тот факт, что доля ДНК в “хвосте” ДНК-комет в областях “плато” для морфозола значительно ниже, чем для цисплатина (рис. 2) Морфозол в концентрациях 22-55 мкмоль/л снижает долю ДНК в “хвосте” ДНК-комет приблизительно в 6 раз, а цисплатин в концентрациях 33-84 мкмоль/л приблизительно только в 2 раза. В целом морфозол вызывает образование большего количества сшивок, чем цисплатин.

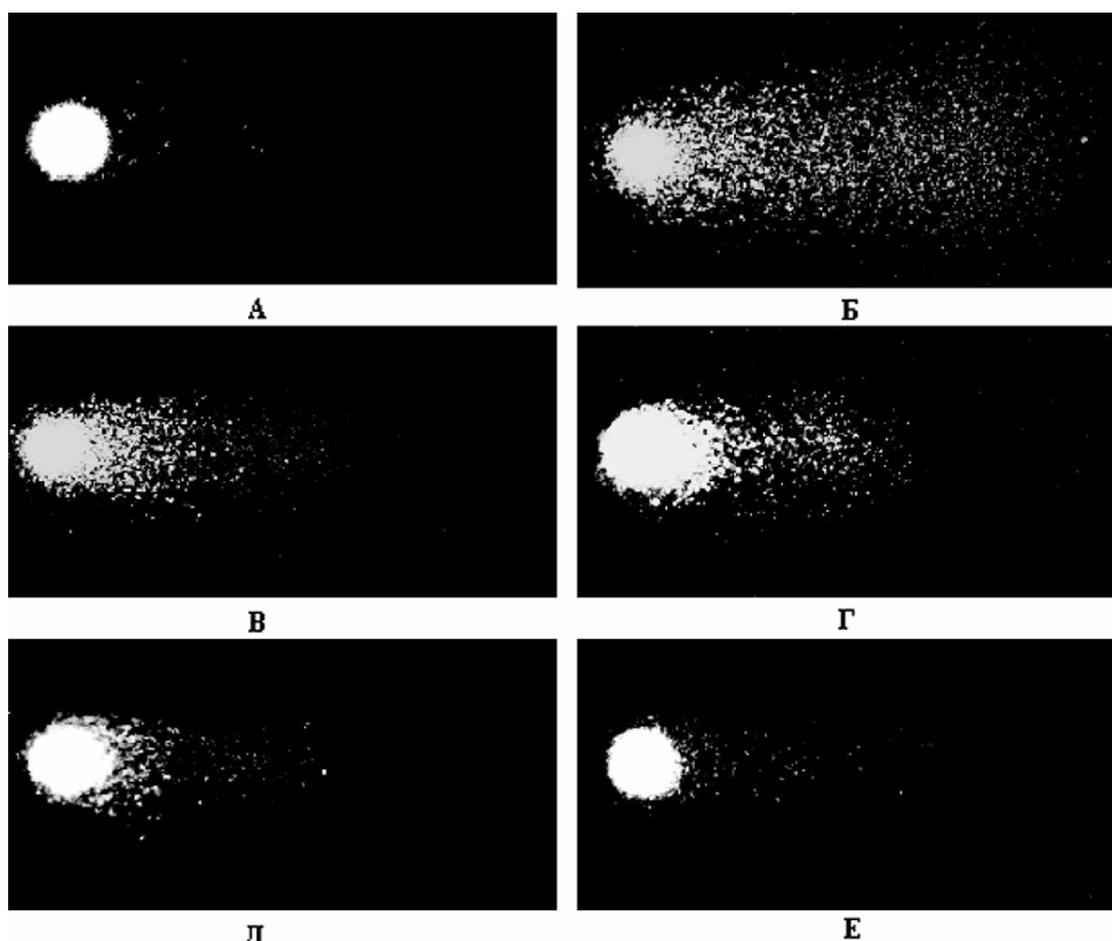


Рисунок 1.

Микрофотографии ДНК-комет.

А) контроль. Б) перекись водорода в концентрации 50 мкмоль/л. В) 17 мкмоль/л цисплатин + 50 мкмоль/л перекись водорода. Г) 33 мкмоль/л цисплатин + 50 мкмоль/л перекись водорода.

Д) 11 мкмоль/л морфозол + 50 мкмоль/л перекись водорода. Е) 22 мкмоль/л морфозол + 50 мкмоль/л перекись водорода.

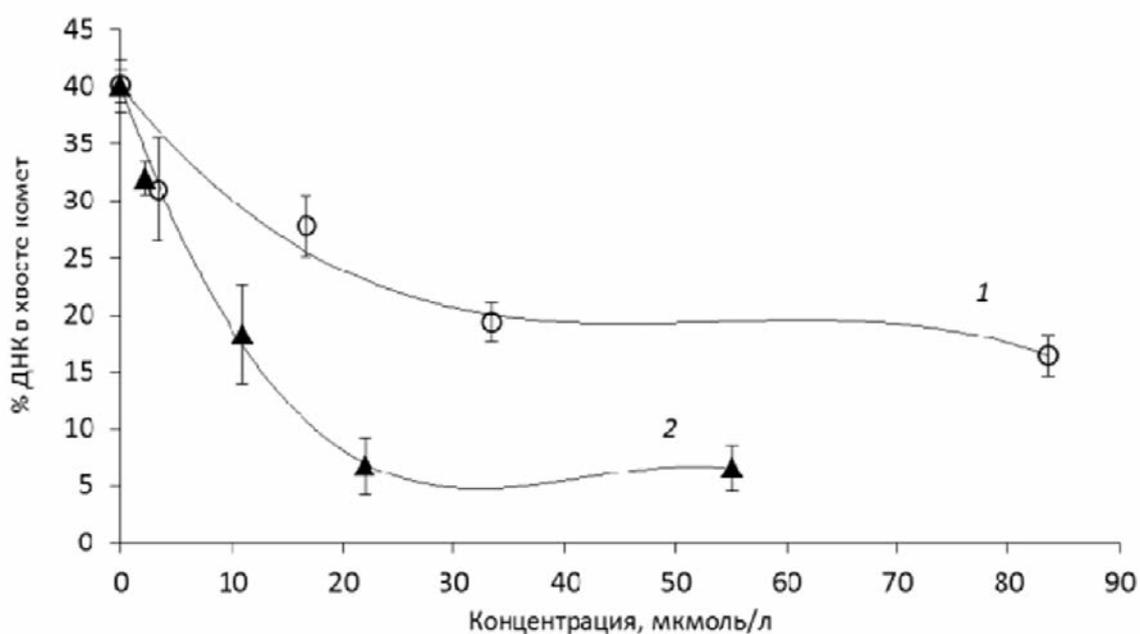


Рисунок 2.

Зависимость снижения электрофоретической подвижности ДНК лимфоцитов в геле агарозы от концентрации цисплатина (1) и морфола (2).

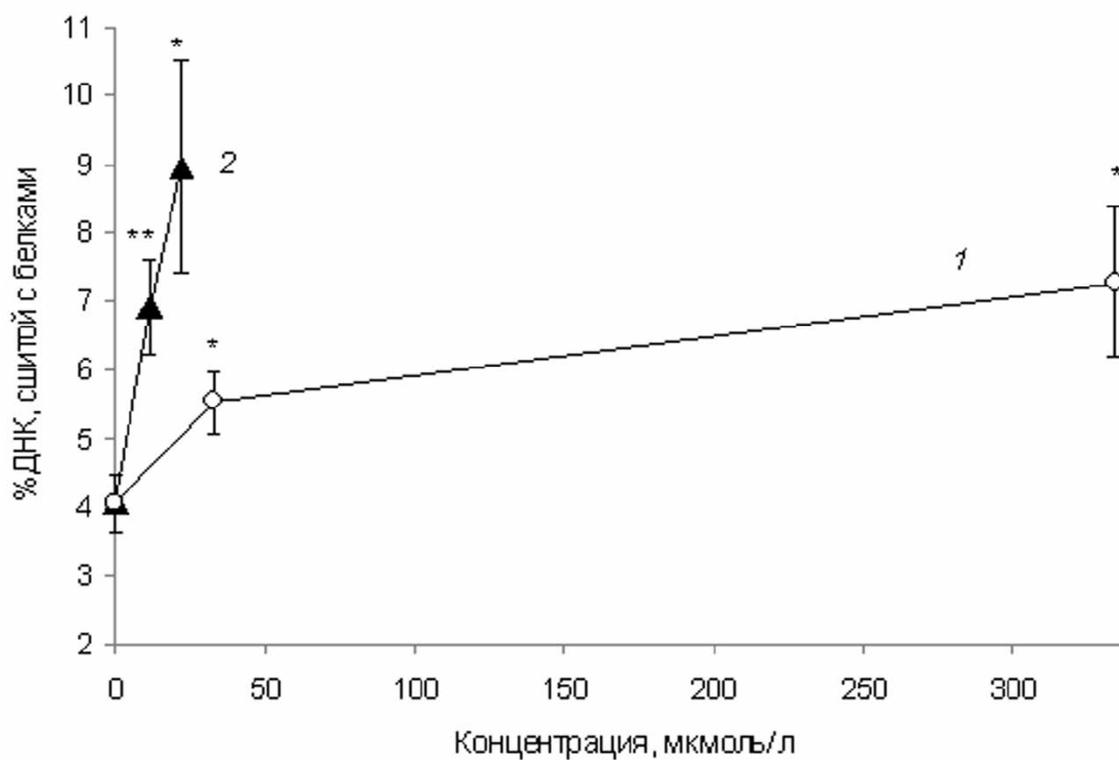


Рисунок 3.

Доля ДНК, сшитой с белком, после инкубации лимфоцитов крови с цисплатином (1) и морфоолом (2) в различных концентрациях.

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ - достоверность различий от контроля.

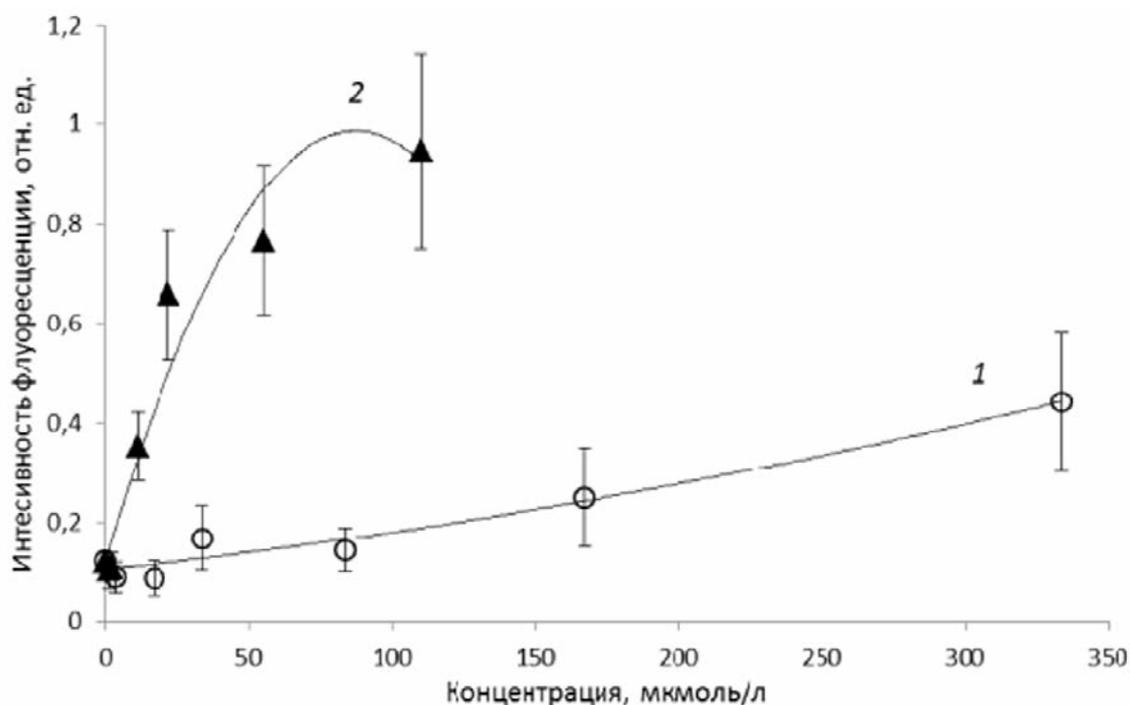


Рисунок 4.

Зависимость относительной генерации активных форм кислорода в лимфоцитах крови от концентрации цисплатина (1) и морфозола (2).

Следует принять во внимание, что на электрофоретическую подвижность ДНК в геле агарозы влияет не только появление сшивок ДНК-ДНК, но и наличие сшивок ДНК-белок. Индукция цисплатином сшивок ДНК-белок была показана ранее [12]. Для морфозола подобные данные отсутствуют, хотя известно, что соединения палладия характеризуются более высокой реакционной способностью по сравнению с соединениями платины в отношении различных биологических молекул, в том числе и клеточных белков [13]. Дополнительная обработка лизированных клеток протеиназой К (2 мг/мл в ТЕ-буфере в течение 2 ч при 37°C) перед электрофорезом не вызывает значимого увеличения электрофоретической подвижности ДНК в геле агарозы как для цисплатина, так и для морфозола. Метод ДНК-комет не позволяет корректно определять сшивки ДНК-белок в случае одновременной индукции и сшивок ДНК-ДНК. Поэтому для исследования сшивок ДНК-белок был использован метод детергентного осаждения [8], который показал, что морфозол, также как и цисплатин, индуцируют сшивки ДНК-белок. Однако морфозол в концентрации 11-22 мкмоль/л вызывает эффект, сравнимый с эффектом цисплатина в концентрации 334 мкмоль/л (рис. 3).

Механизм действия генотоксических агентов может быть опосредованным, например, через индукцию оксидативного стресса. В последнее десятилетие появились работы, о роли активных форм кислорода (АФК) в иницировании апоптоза клетки цисплатином [14, 15]. Количественное исследование генерации АФК с помощью маркера оксидативного стресса 5(6)-хлорометил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата показали, что как цисплатин, так и морфозол индуцируют дозозависимое увеличение генерации АФК в лимфоцитах *in vitro*, более

выраженное для морфозола (рис. 4). Зависимость “доза-эффект” для морфозола при концентрациях до 110 мкмоль/л лучше аппроксимируется полиномиальной функцией, очевидно вследствие гибели клеток при концентрациях выше 55 мкмоль/л, но возможна и аппроксимация линейной функцией ($y=0,123+0,009x$ ($R^2=0,76$), где y – интенсивность флуоресценции в отн. ед., а x – концентрация морфозола в мкмоль/л). Для цисплатина была получена линейная дозовая зависимость $y=0,123+0,001x$ ($R^2=0,92$), где y – интенсивность флуоресценции в отн. ед., а x – концентрация цисплатина в мкмоль/л. Сравнение линейных угловых коэффициентов показывает, что морфозол примерно в 9 раз эффективнее цисплатина по показателю “генерация АФК”. Однако после воздействия на ДНК морфозола или цисплатина не наблюдалось увеличения разрывов ДНК. По всей видимости, это является следствием образования прочных координационных связей Pt-N и Pd-N в системе “металлированных” шивок ДНК-ДНК и ДНК-белок. Шивки приводят к суперконденсации хроматина и тем самым ограничивают доступ свободных радикалов к ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Проведённые исследования свидетельствуют об общности механизмов генотоксического действия морфозола и цисплатина на лимфоциты крови здоровых доноров *in vitro*. Однако морфозол характеризуется значительно более высокой реакционной способностью и генотоксичностью по сравнению с цисплатином. Такое заключение сделано на основе результатов сравнительного изучения процесса образования шивок ДНК-ДНК и ДНК-белок и индукции оксидативного стресса под действием морфозола и цисплатина. Линейное снижение доли ДНК в “хвосте” ДНК-комет наблюдается при снижении дозы морфозола до 22 мкмоль/л, а для цисплатина – до 33 мкмоль/л. Морфозол снижает долю ДНК в “хвосте” ДНК-комет в области “плато” при концентрации 22-33 мкмоль/л приблизительно в 6 раз, а цисплатин при концентрации 33-84 мкмоль/л – приблизительно только в 2 раза. Морфозол с большей эффективностью, чем цисплатин индуцирует образование шивок ДНК-белков и генерирует активные формы кислорода. Увеличение доли шивок ДНК-белков при действии морфозола в концентрации 11-22 мкмоль/л сравнимо с эффектом увеличения доли шивок ДНК-белок при действии цисплатина в концентрации 334 мкмоль/л. По показателю “индукция АФК” морфозол эффективнее цисплатина примерно в 9 раз.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Giaccone G.* (2000) *Drugs*, **59**, 9-17.
2. Environmental Health Criteria (EHC) 226. Palladium, Geneva: World Health Organization (2002) 202 pp.
3. *Ефименко И.А., Иванова Н.А., Локшин Б.В.* (2007) Комплексы палладия с гетероциклическими лигандами. Патент Ru № 2291872 С2. Б.И. №2. 21.01.2007.
4. *Трещалин И.Д., Бодягин Д.И., Переверзева Э.Р., Бухман В.М., Ефименко И.А., Либензон А.В.* (2002) *Росс. биотерапевт. журн.*, **1**, 145-147.
5. *Касьяненко Н.А., Левыкина Е.В., Ерофеева О.С., Иванова Н.А., Ефименко И.А.* (2009) *Журн. Структ. Химии*, **50**, 1034-1044.
6. *Тихомиров А.Г., Иванова Н.А., Ерофеева О.Н., Горбачева Л.Б., Ефименко И.А.* (2003) *Коорд. химия*, **29**, 525-529.

ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ НОВОГО АЦИДОКОМПЛЕКСА ПАЛЛАДИЯ (II) *IN VITRO*

7. Горбачева Л.Б., Тихомиров А.Г., Дедерер Л.Ю., Иванова Н.А., Ерофеева О.С., Очертянова Л.И., Ефименко И.А. (2008) Химико-фарм. журн., №2, 3-5.
8. Осипов А.Н., Сытин В.Д., Пучков П.В., Разумова А.С., Кузнецова Е.М. (2000) Радиационная биология. Радиоэкология, **40**, 516-519.
9. Nakajima Y., Tsuruta K., Shimazawa M., Mishima S., Hara H. (2009) BMC Complement Altern. Med., **9**:4.
10. Payet D.G., Sip F., Leng M. (1993) Nucl. Acids Res., **21**, 5846-5851.
11. Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J.M. (2007) Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, **7**, 3-18.
12. Fuertes M.A., Alonso C., Pérez J.M. (2003) Chem. Rev., **103**, 645-662.
13. Жмарева Е.Н., Зегжда Г.Д., Касьян Г.Б., Ливенская О.А. (1996) Укр. биохим. журн., **68**(3), 74-79.
14. Itoh T., Terazawa R., Kojima K., Nakane K., Deguchi T., Ando M., Tsukamasa Y., Ito M., Nozawa Y. (2011) Free Radic. Res., **45**, 1033-1039.
15. Khan R., Khan A.Q., Qamar W., Lateef A., Ali F., Rehman M.U., Tahir M., Sharma S., Sultana S. (2012) Br. J. Nutr., **6**, 1-12.

Поступила: 22. 05. 2012.

COMPARATIVE STUDIES ON THE GENOTOXIC ACTIVITY OF A NEW PALLADIUM (II) ACIDOCOMPLEX VS CISPLATIN IN HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES *IN VITRO*

A.K. Grekhova¹, L.B. Gorbacheva¹, N.A. Ivanova², I.A. Efimenko², A.N. Osipov³

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina, 4, Moscow, 119334 Russia; tel.: (495) 939-7254; fax: (499)137-4101; e-mail: annagrekhova1@gmail.com

²Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

A comparative study on the genotoxic activity of cisplatin versus morfozol, the first representative of a new class of cation-anion complexes of palladium [AH]₂[PdCl₄] (where A-methylmorpholine) has been performed using human lymphocytes *in vitro*. The results of the DNA-DNA cross-linking activity investigations showed that both compounds studied exhibited biphasic dose-effect relationship: a linear decrease in the DNA percent in the comet tail and the region of the "plateau". However, in the "plateau" region, morfozol reduced the DNA percent in the comet tail up to 6 times while cisplatin caused a 2-fold decrease only. Morfozol, like cisplatin, inducing DNA-protein cross-linking and generating reactive oxygen species, was more effective than cisplatin.

Key words: anticancer drugs, cisplatin, palladium compounds, morfozol, DNA damage, oxidative stress.