

Н. С. Жангабылов<sup>1</sup>, Л. Ю. Дедерер<sup>2</sup>, Л. Б. Горбачева<sup>2</sup>, С. В. Васильева<sup>2</sup>,  
А. С. Терехов<sup>2</sup>, С. М. Адекенов<sup>1</sup>

## ВЛИЯНИЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВОГО ЛАКТОНА АРГЛАБИНА НА СИНТЕЗ ДНК В КЛЕТКАХ ЛЕЙКОЗА P388 *in vivo*

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Институт фитохимии Министерства образования и науки, Караганда, Республика Казахстан

В 70-х годах была выявлена противоопухолевая активность сесквитерпеновых лактонов гермакранового ряда [1].

Сесквитерпеновый  $\gamma$ -лактон гваянового типа 1, (10)-эпокси-5,7 (H),6,11 $\beta$ (H)-гвай-3(4)-11-(12)-диен-6-(12)-олид (арглабин) впервые был выделен в 1980 году из эндемичного растения полыни гладкой *Artemisia glabella* Kar. et Kir., произрастающего на территории Центрального Казахстана.

Арглабин после аминирования диметиламином, обработки газообразным HCl и лиофилизации превращается в субстанцию противоопухолевого препарата “Арглабин” (рис. 1), который применяется в онкологических клиниках Республики Казахстан в комплексной терапии опухолей молочной железы, легких и печени [2].

В настоящее время в ОНЦ РАМН проводятся исследования терапевтической эффективности этого препарата в сочетании с лучевой терапией в отношении опухолей молочной железы.

Следует отметить, что в доклинических исследованиях арглабин и препарат “Арглабин” проявляет высокую противоопухолевую активность в отношении ряда экспериментальных опухолей (опухоль легкого Льюис карцинома Ca-755, саркома 37, лимфолейкозы L1210 и P388, карциносаркома Уокера), а также опухолей, резистентных к проспидину, лейкофидину, сарколизину и 5-фторурацилу [3].

В культуре нормальных клеток (гепатоциты, спленциты и клетки костного мозга) и трансформированных вирусом RAS (мастоцитомы P815, миелома X-P3  $\times$  63Ag8.653 и эритролейкемия K-562) препарат “Арглабин” легко разрушается с образованием арглабина, который в 50 – 100 раз более токсичен в отношении опухолевых клеток по сравнению с нормальными [4].

В настоящей работе было изучено влияние арглабина на синтез ДНК в клетках лейкоза P388 при однократном и многократном введении мышам-опухоленосителям.

С целью выявления нарушений в структуре ДНК, индуцированных препаратом “Арглабин”, были использованы бактериальные тест-системы штаммов *E. coli* дикого типа (PQ65 *uvr*<sup>+</sup>) и мутанта, имеющего дефект системы репарации на уровне гена *uvrA* (штамм PQ66 *uvrA*).

### Экспериментальная часть

**Материалы:** сесквитерпеновый лактон (арглабин), гидрохлорид диметиламиноарглабина (препарат “Арглабин”), мыши BDF1(C<sub>57</sub>Bl  $\times$  DBA<sub>2</sub>), лимфоцитарный лейкоз P388, предшественники синтеза ДНК: 2-<sup>14</sup>C-тимидин и 2-<sup>14</sup>C-дезоксисуридин, системы штаммов *E. coli* дикого типа (PQ65 *uvr*<sup>+</sup>) и мутанта, имеющего дефект системы репарации на уровне гена *uvrA* (штамм PQ66 *uvrA*).

**Условия опытов.** Изучали влияние арглабина при однократном и 5-кратном введении в дозах 110 и 50 мг/кг соответственно на синтез ДНК по основному (*de novo*) и запасному пути в опухолевых клетках лимфолейкоза P388. Синтез ДНК по запасному пути оценивали по включению 2-<sup>14</sup>C-тимидина, а *de novo* — 2-<sup>14</sup>C-дезоксисуридина.

Эксперименты проводили на мышах BDF1(C<sub>57</sub>Bl  $\times$  DBA<sub>2</sub>) массой 20 – 23 г с привитым внутрибрюшинно лейкозом P388.

Опытные группы животных забивали через 3, 24, 48 и 72 ч после внутрибрюшинного введения арглабина (за 1 ч до забоя внутрибрюшинно вводили 2-<sup>14</sup>C-тимидин или 2-<sup>14</sup>C-дезоксисуридин по 2 мкКи/мышь).

Контрольной группе внутрибрюшинно вводили смесь ДМСО/масло растительное (1:9) при однократном введении в дозе 10 мл/кг, при 5-кратном — 5 мл/кг, затем через 1 ч внутрибрюшинно вводили 2-<sup>14</sup>C-тимидин или 2-<sup>14</sup>C-дезоксисуридин по 2 мкКи/мышь. Животных забивали путем смещения шейных позвонков через 1 ч после введения радиоактивной метки. Асцитическую жидкость отбирали в охлажденный 0,83 % NH<sub>4</sub>Cl для лизиса эритроцитов. Дальнейшую обработку опухолевых клеток проводили по методике, описанной ранее [5]. Концентрацию ДНК определяли методом спектрофотометрии по Спирину [6], радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике Дельта 300 (“Tim Analytic”, США).

При исследовании цитотоксических и генотоксических свойств препарата “Арглабин” использовали как стационарные (асинхронные, 18-часовые), так и логарифмические (синхронизированные, 3 ч) культуры штаммов *E. coli* дикого типа (PQ65 *uvr*<sup>+</sup>) и мутанта, имеющего дефект системы репарации на уровне гена *uvrA* (штамм PQ66 *uvrA*), выращенных при 37 °C на полноценной среде (L-среда) следующего состава (на литр): пептон — 10 г, дрожжевой экстракт 5 г, NaCl — 5 г, агар — 2 %. Клеточные суспензии этих культур инкубировали при 37 °C 60 мин в водных растворах арглабина (1,10, 30 или 100 мг/мл). Выживаемость оце-

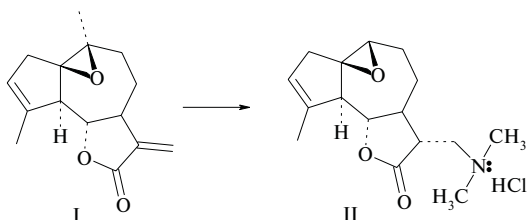


Рис. 1. Структурные формулы сесквитерпенового лактона арглабина (I) и препарата “Арглабин” (II)

нивали по данным учета численности колоний на чашках Петри в посевах ряда последовательных 10-кратных разведений этих суспензий (L-среда, 37 °С) через 24 ч. Эксперименты проводились в трехкратной повторности [7, 8].

### Результаты и их обсуждение

Влияние арглабина на синтез ДНК в клетках лейкоза Р388 мышей *in vivo* представлено на рис. 2 и 3. Можно видеть, что ингибирование синтеза ДНК наиболее выражено при включении 2-<sup>14</sup>С-дезоксигуанидина в ДНК как при однократном, так и при многократном введении арглабина (рис. 2). Однократное введение этого препарата вызывает первоначально незначительное ингибирование включения 2-<sup>14</sup>С-тимидина, при многократном введении этот эффект более выражен (рис. 3).

В опухолевых клетках синтез ДНК в S фазе преимущественно осуществляется по запасному пути, который не зависит от пути *de novo* [8, 9].

Известно, что противоопухолевая активность лактона и препарата “Арглабин” более выражена при их многократном введении мышам с привитыми экспериментальными опухолями [3].

В наших экспериментах ингибирование включения 2-<sup>14</sup>С-тимидина в большей степени также наблюдается при многократном введении препарата.

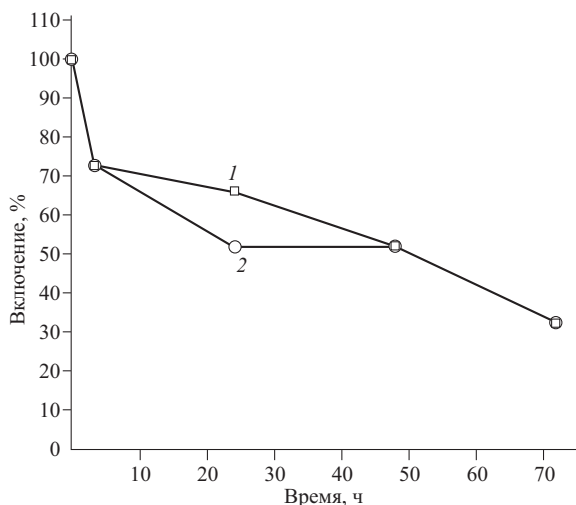


Рис. 2. Влияние арглабина на включение 2-<sup>14</sup>С-дезоксигуанидина в ДНК клеток лейкоза Р388 при однократном (1) и пятикратном (2) введении

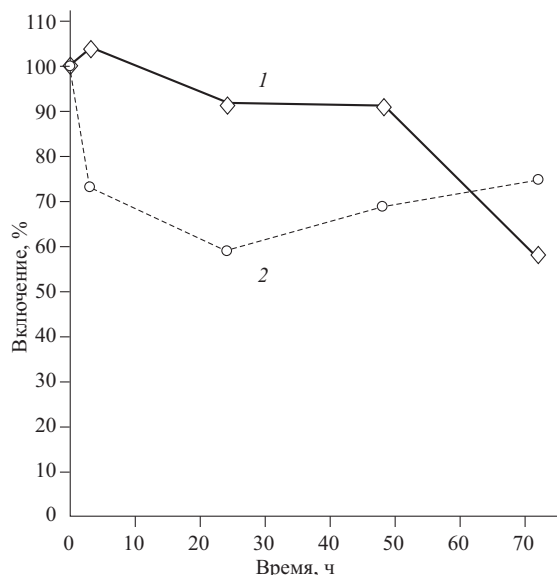


Рис. 3. Влияние арглабина на включение 2-<sup>14</sup>С-тимидина в ДНК клеток лейкоза Р388 при однократном (1) и пятикратном (2) введении

Таким образом, выявлена корреляция между ингибированием синтеза ДНК в опухолевых клетках по запасному пути и противоопухолевой активностью арглабина.

Для выявления способности противоопухолевых препаратов повреждать структуру ДНК живых клеток широко используются бактериальные тест-системы. Эти исследования основаны на сравнительной оценке цитотоксичности соединений на гомологичных штаммах бактерий, один из которых имеет заведомо установленные дефекты в системе репарации ДНК. В данной работе использовали штамм *E. coli* дикого типа (штамм PQ65 *uvr+*), и мутанта, имеющего дефект в системе репарации *uvrA* (штамм PQ66 *uvrA*). Установлено, что препарат “Арглабин” обладает весьма низкой токсичностью по отношению к обоим штаммам *E. coli*

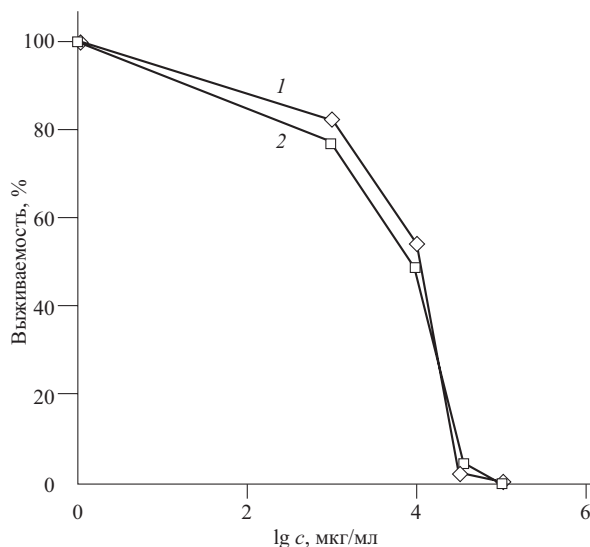


Рис. 4. Цитотоксическое действие препарата “Арглабин” на клетки *E. coli* PQ65 *uvr+* (1) и PQ66 *uvrA* (2)

ii. После инкубации клеток в растворе препарата в концентрациях 1, 10, 30 и 100 мг/мл выживаемость культуры составляет соответственно 100, 50, 5–7 и менее 1 % каждого из штаммов (рис. 4). Таким образом, токсичность препарата по отношению к штаммам *E. coli* дикого и мутантного типов не различалась. Это означает, что токсическое действие “Арглабина” не связано с нарушениями в структуре ДНК, которые распознаются и репарируются системой *uvrABC* — эксцизионной репарации. На этом основании мы можем утверждать, что этот препарат не образует межнитевых, а также внутринитевых сшивок в ДНК, которые распознаются и репарируются указанной системой.

Ранее нами показано, что “Арлабин” в условиях *in vitro* не индуцирует образование разрывов в ДНК, но взаимодействует с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, причем в большей степени с dAMP и dGMP, чем с dCMP и dTMP.

Известно, что сесквитерпеновые лактоны взаимодействуют с нуклеофильными центрами биомакромолекул [1]. Можно предположить, что ингибирование синтеза ДНК, индуцированное этими лактонами, обусловлено не только взаимодействием с нуклеотидами,

но также и с сульфгидрильными группами ДНК полимера.

## ЛИТЕРАТУРА

1. S. M. Kupchan, M. Maruyama, R. J. Hemingway, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**(19), 4914–4916 (1971).
2. К. Ж. Мусулманбеков, *Сб. трудов межд.научно-практической конф. “Клинические аспекты применения противоопухолевого препарата “Арглабин”*, Караганда (2002), сс. 46–51.
3. К. Д. Рахимов, *Фармакологическое изучение природных соединений Казахстана*, Алматы (1999), сс. 43–64.
4. Т. Е. Шайкенов, *Сб. трудов межд. научно-практической конф. “Клинические аспекты применения противоопухолевого препарата “Арглабин”*, Караганда (2002), сс. 57–67.
5. И. В. Аникин, Г. В. Кукушкина, И. С. Соколова и др., *Изв. АН СССР, сер. биол.*, № 2, 291–295 (1981).
6. А. С. Спирин, *Биохимия*, **23**(5), 656–660 (1958).
7. С. В. Васильева, А. М. Серебряный, И. А. Рапопорт, *Генетика*, **IX**(7), 80–84 (1973).
8. L. Grossman, and A. T. Yeung, *Photochem. Photobiol.*, **51**(6), 749–755 (1990).
9. S. Chwalinski and C. S. Potten, *Cell Tissue Kinet.*, **19**(6), 647–659 (1986).
10. L. Thelander, P. Reichard, *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 133–158 (1979).

Поступила 13.11.03