

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2008

Л. Б. Горбачева¹, А. Г. Тихомиров¹, Л. Ю. Дедерер¹, Н. А. Иванова²,
О. С. Ерофеева², Л. И. Очертянова², И. А. Ефименко²

НОВЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ МОРФОЗОЛ: ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ВЛИЯНИЕ НА СИНТЕЗ ДНК

¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва;

² Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва

Изучение взаимодействия ДНК с морфозолом (ацидокомплекс палладия II) *in vitro* выявило активное связывание морфозола с ДНК, что проявляется в уменьшении доступности ДНК для актиномицина D. Было обнаружено глубокое и устойчивое торможение синтеза ДНК в клетках лейкозов L1210 и P388, менее выраженное в клетках Акатол и меланомы В16. Изучение внутриклеточного распределения палладия в опухолях Акатол и P388 после введения морфозола мышам-опухоленосителям показало его преимущественное накопление во фракции цитозоля, что свидетельствует об активном взаимодействии препарата с клеточными белками. При внутрибрюшинном введении этого препарата достаточно высокое содержание палладия обнаруживается и в ядерной фракции. Поскольку морфозол отличается высокой реакционной способностью, вероятно, для этого препарата существуют и другие мишени, такие как ДНК-полимеразы и регуляторные белковые факторы.

Поиск соединений палладия (II), обладающих противоопухолевой активностью, начался сразу же параллельно исследованию цисплатина [1]. До 2002 года было синтезировано большое количество соединений палладия. Однако противоопухолевая активность их была ниже, чем активность соединений платины [2–4]. Вместе с тем было установлено отсутствие перекрестной резистентности этих соединений и палладия [5], а также выявлены отличия в конформационных изменениях спирали ДНК, индуцированных соединениями палладия по сравнению с цисплатином [6–8].

Интерес к соединениям палладия объясняется также и тем, что соединения этого металла значительно менее токсичны по сравнению с соединениями платины [9].

В Институте общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН был синтезирован класс соединений палладия с циклическими аминами. Наиболее активный из них — морфозол ($C_{10}H_{24}O_2N_2PdCl_4$) — обладает высокой противоопухолевой активностью в отношении широкого спектра экспериментальных опухолей [10, 11]. В настоящее время проводятся экспериментальные предклинические исследования этого соединения.

В данной работе представлены результаты исследования связывания морфозола с ДНК в условиях *in vitro*, влияние морфозола на синтез ДНК в условиях *in vivo*, а также его распределение в субклеточных структурах опухолевых клеток.

Экспериментальная часть

Материалы и методы исследования

В работе использованы: морфозол, полученный в Институте общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН; 2- C^{14} -тимидин (фирмы Amersham), актиномицин D, ДНК тимуса теленка (фирмы Serva).

Для изучения взаимодействия морфозола с ДНК *in vitro* готовили раствор, содержащий либо 600 мкг ДНК в 3 мл смеси 6,3 мМ фосфатного буфера с 0,15 М NaCl (pH = 7,2), либо аналогичный раствор, содержащий различные количества морфозола (от 0 до 270 мкг). Растворы с морфозолом инкубировали в течение 30 мин при 20 °С. Затем к смесям, содержащим ДНК, обработанную морфозолом или только нативную ДНК, добавляли порциями раствор актиномицина D с исходной концентрацией 250 мг/мл. Спектрофотометрические измерения проводили на Specord M-40, используя длины волн 425 и 470 нм в соответствии с методикой [12].

Эксперименты *in vivo* проводили на мышах-самцах BDF₁ (C57Bl × DBA₂) массой 20–23 г с привитыми внутрибрюшинно лейкозами P388 и L1210, на мышах-самцах СВF₁ (СВА × C57B1) с привитой подкожно меланомой В16, и на мышах-самках BALB с привитой подкожно опухолью Акатол. В каждой группе было по 5–8 мышей. Во всех опытных группах животным за 1 ч до забоя вводили 2- C^{14} -тимидин по 2 мКи/мышь. Синтез ДНК в клетках опухолей исследовали по включению меченого предшественника в ДНК и рассчитывали по общепринятой методике как процент включения от контроля [13]. Всего в опытах *in vivo* было использовано 250 мышей-опухоленосителей.

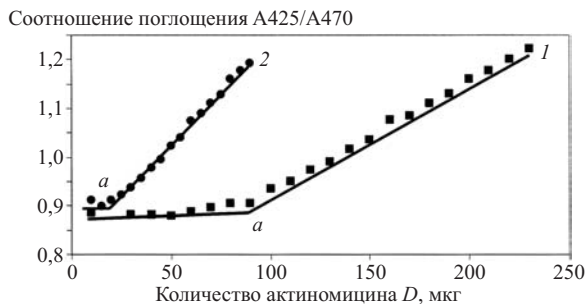


Рис. 1. Связывание актиномицина D с нативной ДНК (кривая 1) и ДНК, обработанной морфозолом (кривая 2)

Внутриклеточное распределение палладия в опухолях Акатол, P388 и L1210 определяли методом дифференциального центрифугирования гомогенатов этих опухолей [14] с последующим определением содержания палладия атомно-абсорбционным методом, включающим подготовку проб в микроволновой печи, на атомно-абсорбционном спектрофотометре фирмы Перкин-Элмер, модель AAS-2100, с электротермической атомизацией в HGA-700. Источником излучения служила лампа с полым катодом фирмы Перкин-Элмер. Аналитическая длина волны палладия — 247,6 нм. Результаты выражены в массовых % от сухого вещества субклеточных фракций. Относительное стандартное отклонение (Sr) составляет — 0,02 – 0,03.

При изучении внутриклеточного распределения морфозола животным вводили препарат однократно в терапевтической дозе (25 мг/кг) внутривенно или внутрибрюшинно и через 0,5 – 72 ч забивали путем смещения шейных позвонков. Всего было проведено 7 опытов.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами показано, что морфозол не взаимодействует с фосфатами ДНК *in vitro*, но образует комплексы с пуриновыми и, в меньшей степени, с пиримидиновыми основаниями ДНК с образованием межнитевых сшивок [8], что должно привести к уменьшению доступности ДНК для известного интеркалятора — актиномицина D. На рис. 1 представлены результаты связывания актиномицина D с ДНК нативной (600 мкг) и обработанной морфозолом (138,6 мкг). Связывание актиномицина D определялось по изменению соотношения выбранных частот поглощения. Точки перегиба “а” на кривых 1 и 2 (рис. 1) свидетельствуют о насыщении системы актиномицином D. Однако, четко видно, что на кривой 2 (ДНК,

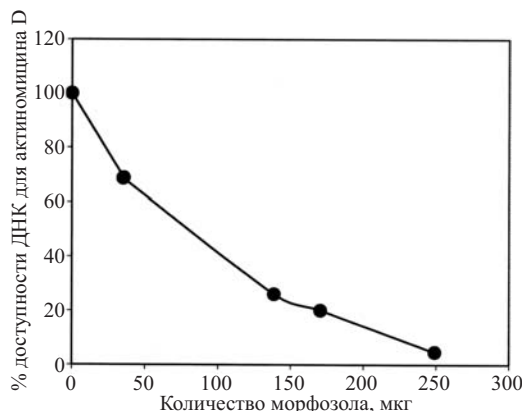


Рис. 2. Влияние морфозола на доступность ДНК для актиномицина D

обработанная морфозолом) это насыщение происходит при 20 мкг актиномицина D, тогда как в случае нативной ДНК (кривая 1) — при 80 мкг, т. е. в 4 раза уменьшена доступность ДНК для актиномицина D в присутствии морфозола.

Установлено, что ДНК, предварительно обработанная морфозолом (250 мкг), практически недоступна для связывания с актиномицином D (рис. 2). Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что морфозол, связываясь с ДНК, может блокировать репликацию ДНК *in vivo*.

Подтверждением этого являются результаты исследования влияния морфозола на синтез ДНК в клетках солидных опухолей и лейкозов *in vivo* (рис. 3). Ингибирующий эффект морфозола в описанных условиях наиболее выражен в клетках лейкозов L1210 и P388 по сравнению с солидными опухолями (Акатол и меланома В-16). Ранее нами было показано, что цисплатин в МПД (8 мг/кг) вызывает более выраженное торможение синтеза ДНК в клетках меланомы В16 [15]. Однако, следует отметить, что в настоящей работе морфозол использовался в терапевтической дозе (25 мг/кг). МПД морфозола составляла 56 мг/кг при внутривенном введении мышам и — 64 мг/кг — при внутрибрюшинном.

Высокий ингибирующий эффект морфозола в отношении синтеза ДНК в опухолевых клетках вероятно обусловлен проникновением этого препарата в ядра клеток.

Для исследования внутриклеточного распределения морфозола использованы два режима введения этого препарата. При внутривенном введении морфозола мы-

Таблица 1
Влияние однократного внутривенного введения морфозола на внутриклеточное распределение палладия в клетках опухоли Акатол у мышей

Субклеточная фракция	Содержание палладия, масс. %				
	Время после введения морфозола, ч				
	0,5	1	3	24	48
Ядра	0,12	0,14	0,11	0,16	0,15
Митохондрии	0,16	0,14	0,09	0,15	0,03
Микросомы	0,14	0,11	0,08	0,10	0,08
Цитозоль	2,18	2,52	3,82	1,12	2,84

Таблица 2
Влияние однократного внутривенного введения морфозола на внутриклеточное распределение палладия в клетках меланомы В-16 у мышей

Субклеточная фракция	Содержание палладия, масс. %			
	Время после введения морфозола, ч			
	3	24	48	72
Ядра	0,10	0,95	0,17	0,05
Митохондрии	0,02	0,06	0,09	0,06
Микросомы	0,01	0,03	0,06	0,03
Цитозоль	0,72	1,60	0,58	0,68

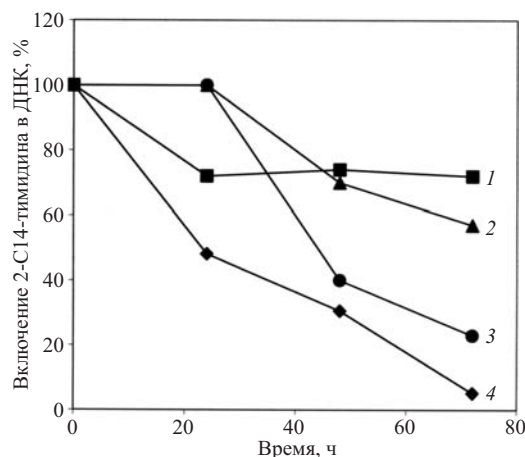


Рис. 3. Влияние морфозола на включение 2-С¹⁴-тимидина в ДНК клеток меланомы В16 (1), Акатол (2), лейкозов Р388 (3) и L1210 (4)

шам с солидной опухолью Акатол отмечается высокое содержание палладия во фракции цитозоля с двумя максимумами (через 3 и 48 ч после введения), что в 10–30 раз превышает аналогичные значения в остальных субклеточных фракциях (табл. 1). Преимущественное накопление палладия в цитозоле имеет место и при внутрибрюшинном введении морфозола мышам с меланомой В-16 (табл. 2). Следует отметить, что достаточно высокое содержание палладия в случае внутрибрюшинного введения обнаруживается и в ядерной фракции (через 24 ч), так же как и в цитозоле.

Известно, что содержимое цитозоля составляют белки и ферменты в основном с мол. массой до 100 кДа. Ранее было показано связывание платины с белками плазмы при внутрибрюшинном введении [2, 14]. Соединения палладия характеризуются более высокой реакционной способностью в отношении белков по сравнению с соединениями платины.

Таким образом, изучение взаимодействия ДНК с морфозолом *in vitro* выявило активное связывание морфозола с ДНК, что проявляется в уменьшении доступности ДНК для актиномицина D. Взаимодействие морфозола с ДНК может оказывать существенное влияние на процесс репликации ДНК в условиях *in vivo*. Было обнаружено глубокое и устойчивое торможение синтеза ДНК в клетках лейкозов L1210 и P388 менее выраженное в клетках Акатол и меланомы В16.

Изучение внутриклеточного распределения палладия в опухолях Акатол и P388 после введения морфозола

показало его преимущественное накопление во фракции цитозоля как при внутривенном, так и при внутрибрюшинном введении, что свидетельствует об активном взаимодействии препарата с клеточными белками [16]. Достаточно высокое содержание палладия в случае внутрибрюшинного введения обнаруживается и в ядерной фракции.

Поскольку морфозол отличается высокой реакционной способностью, вероятно, для этого препарата существуют и другие мишени, такие как ДНК-полимеразы, а также различные регуляторные белковые факторы, содержащиеся в цитозоле.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. J. Cleare, J. D. Hoeschele, *Bioinorg. Chem.*, **2**, 157 (1973).
2. H. Mansuri-Torshizu, N. Akbarzadeh, *Chem. Pharm. Bull.*, **49**(2), 1517–1520 (2001).
3. D. Kovala, M. A. Demertzis, E. Filiou, et al., in: *Bio Metals*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, **16**, 411–418 (2003).
4. E. Budzisz, V. Krajevskaja, M. Rozalski, *Polish J. Pharmacol.*, **56**, 473–478 (2004).
5. A. G. Quroda, J. M. Perez, E. I. Montero, et al., *J. Inorg. Biochim.*, **75**(4), 293–301 (1999).
6. A. I. Matesanz, J. M. Perez, P. Navarro, et al., *Inorg. Biochim.*, **76**(1), 29–37 (1999).
7. Л. Б. Горбачева, Л. Ю. Дедерер, А. Г. Тихомиров, и др., *Рос. биотерапевт. журн.*, **1**(1), 21 (2003).
8. А. Г. Тихомиров, Н. А. Иванова, О. С. Ерофеева, и др., *Корд. химия*, **29**(7), 525–529 (2003).
9. *Report of International Labour Organization of the World Health Organization*, Palladium World Health Organization, Geneva. 188 (2002).
10. *Международная заявка на патент PCT / RU 00495 от 12.11.2002 г.*, Номер индивидуальной публикации WO 2004 / 043975 A1 от 02.05.2004 г.
11. И. Д. Трещалин, *Рос. биотерапевт. журн.*, **1**(2), 145–147 (2002).
12. В. А. Поспелов, А. Б. Пупышев, *Мол. биол.*, **7**(3), 390–397 (1973).
13. Г. В. Кукушкина, Н. М. Перетолчина, Е. А. Миненкова и др., *Биохимия*, **49**(7), 1189–1197 (1984).
14. R. P. Sharma, I. R. Edwards, *Biochem. Pharmacol.*, **32**(18), 2665–2669 (1983).
15. И. С. Соколова, Ф. Пелькис, Г. Е. Баженова и др., *Докл. АН УССР. Сер. Б*, № 10, 77–79 (1987).
16. Е. Н. Жмарева, Г. Д. Зегжда, Г. Б. Касьян и др., *Укр. биохим. журн.*, **68**(3), 74–79 (1996).

Поступила 30.05.06

THE NEW ANTITUMOR AGENT MORFOZOL: INTRACELLULAR DISTRIBUTION AND EFFECT ON DNA SYNTHESIS

L. B. Gorbacheva¹, A. G. Tikhomirov¹, L. Yu. Dederer¹, N. A. Ivanova², O. S. Erofeeva², L. I. Ochertyanova², and I. A. Efimenko²

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

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

In vitro study of the interaction of DNA with morfozol—a new palladium(II) acidocomplex—revealed the active binding of the drug to DNA, which was manifested by a decrease of the accessibility of DNA for actinomycin D. Morfozol produced strong and stable suppression of DNA synthesis in leukemia L1210 and P388 cells and a less pronounced effect in Akatol and melanoma B16 cells. The intracellular distribution of Pd in Akatol and P388 tumor cells after the administration of morfozol to tumor-bearing mice revealed preferential accumulation of the drug in the cytosol fraction. This is evidence for an active interaction of morfozol with the cell proteins. After intraperitoneal administration of morfozol, a rather high content of Pd was also found in the nuclear fraction. Since morfozol is characterized by a high reactivity, some other targets also probably exist for this compound, such as DNA-polymerases and various regulatory protein factors.