

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ЦИСПЛАТИН

*¹ Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск,
кафедра биоорганической химии,*

*² Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск,*

³ Institute of Physics, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan

Противоопухолевый препарат цисплатин (цис-диаминдихлорплатина) начал широко использоваться в клинической практике с 1978 г. и в настоящее время составляет около 50 % назначений в химиотерапии [1]. Цисплатин эффективен лишь для ограниченного круга опухолей. Лечение цисплатином таких злокачественных заболеваний, как рак матки, мочевого пузыря, остеогенная саркома, опухоли шеи и головы вызывает побочные эффекты (нефротоксичность, позывы к рвоте и нейротоксичность). В связи с этим ведется широкий поиск новых препаратов на основе платины, однако лишь карбоплатин, обеспечивающий более эффективное проникновение в клетку и уменьшение побочных эффектов, а также оксалиплатин, эффективный для некоторых других типов опухолей, нашли клиническое применение.

Биологическое действие цисплатина проявляется путем прямого ковалентного связывания с ДНК с образованием внутрицепочечных и межцепочечных сшивков, что приводит к остановке репликации ДНК и деления клеток, за которыми следует апоптоз [1].

И промежуточные, и конечные продукты связывания цисплатина с ДНК вызывают очень сильные нарушения двойной спирали ДНК. Это проявляется в изменении ее термической стабильности (температуры плавления) [1]. Однако до последнего времени влияние промежуточных продуктов на стабильность ДНК не изучалось. Это связано с тем, что не был разработан метод, который бы фиксировал промежуточные продукты платинирования при высоких температурах в ходе экспериментов по плавлению. Вместе с тем, особенности кинетики играют большую роль в возникновении противоопухолевой активности.

Ранее нами было установлено, что присутствие в растворе хлорид-ионов в концентрации 0.1М и щелочная среда не только фиксируют промежуточные продукты платинирования при высоких температурах, но и усиливают сдвиг температуры плавления ДНК, обусловленный цисплатином [2, 3].

Цель нашего исследования — изучение кинетики формирования продуктов связывания цисплатина с ДНК. Для сравнения мы исследовали очень похожий, но клинически неактивный аналог трансплатин (*trans*-Pt(NH₃)₂Cl₂).

В работе использовали особо чистую ДНК тимуса теленка, выделенную по разработанной нами методике [4], цисплатин и трансплатин от фирмы Sigma-Aldrich. Смесь ДНК-цисплатин инкубировали в 0,01 М NaClO₄ в течение 48 часов в темноте при температурах 37 °С. Через промежутки времени от 1 мин до 48 часов из реакционных смесей отбирали образцы, в которых реакцию платинирования останавливали, добавляя NaCl до 0,1 М и разбавляя раствор ДНК до концентрации 0,075 мг/мл (рН ~ 6) с последующим замораживанием растворов при -28 °С. Непосредственно перед плавлением растворы ДНК размораживали и разбавляли до концентрации 0,04 мг/мл. Плавление проводили в растворах: 1) 0,1 М NaCl; 5 мМ Na₂CO₃; 0,05 мМ ЭДТА; рН 7; 2) 0,1 М NaCl, 0,005М Na₂CO₃, 0,001М NaClO₄, 5·10⁻⁵ М ЭДТА, рН 10,5.

Кинетические кривые изменения стабильности ДНК в присутствии цисплатина и трансплатина проиллюстрированы на рис. 1.

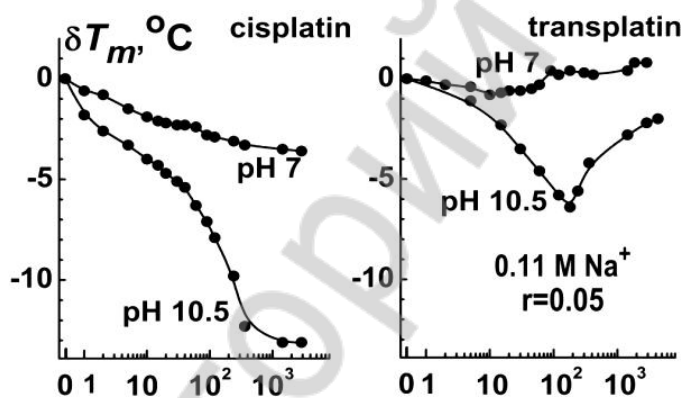


Рис. 1. Влияние соединений платины на изменение температуры плавления ДНК в нейтральной и щелочной средах

Из рис. 1 видно, что воздействие на ДНК цисплатина и его неактивного аналога трансплатина сильно различается.

При проведении плавления в нейтральной среде конечные бифункциональные продукты цисплатина вызывают дестабилизацию, а продукты трансплатина — стабилизацию двойной спирали. Для обоих рассматриваемых соединений структура кинетических кривых отсутствует.

В щелочной среде возникает сильный дестабилизирующий эффект, четко видна стадия формирования монофункциональных продуктов при малых временах инкубации и их последующего превращения в бифункциональные продукты. В целом кинетическая кривая изменения термостабильности ДНК при инкубации с цисплатином характеризуется двухступенчатой формой. Первая «быстрая» ступень кинетической кривой обусловлена образованием и накоплением монофункциональных продуктов платинирования. Вторая ступень обусловлена медленным накоплением бифункциональных продуктов.

Нами была проведена математическая обработка кривой рН 10,5 на рис. 1 (цисплатин), результаты которой представлены на рис. 2 в виде временных зави-

симостей общей доли несвязанного цисплатина (θ_{cis_tot}), его монофункциональных (θ_m) и бифункциональных (θ_b) продуктов.

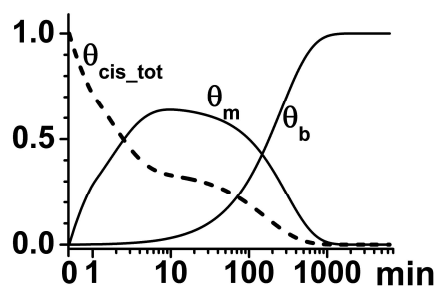


Рис. 2. Результаты расчета временных зависимостей общей доли несвязанного цисплатина (θ_{cis_tot}), его монофункциональных (θ_m) и бифункциональных (θ_b) продуктов связывания с ДНК

Из рис. 2 видно, что доля несвязанного цисплатина (θ_{cis_tot}) убывает в течение всей инкубации. Доля монофункциональных продуктов первоначально увеличивается, но после 10 минут инкубации начинает убывать из-за их превращения в бифункциональные продукты. Доля бифункциональных продуктов монотонно возрастает.

Таким образом, с помощью разработанного метода фиксации промежуточных продуктов платинирования выявлено существенное различие в характере связывания с ДНК противоопухолевого препарата цисплатин и его неактивного аналога трансплатина. В ходе связывания цисплатина температура плавления ДНК монотонно снижается. При связывании трансплатина первоначально наблюдается снижение температуры плавления с последующим ее ростом. Форму кинетической кривой в случае трансплатина можно объяснить образованием дестабилизирующих двойную спираль монофункциональных продуктов в начале инкубации. Бифункциональные продукты (межцепочечные сшивки) образуются через более продолжительное время инкубации. Поскольку трансплатин образует большее количество межцепочечных сшивок, и локальные нарушения, которые они вызывают, слабее, чем в случае цисплатина, это приводит к увеличению температуры плавления через определенный период времени после ее начального снижения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pinto, A. L.* Binding of antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) to DNA / A. L. Pinto, S. J. Lippard // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. Vol. 780. P. 167–180.
2. *Galyuk, E. N.* The alkaline medium hinders the development of platination for DNA-cisplatin complexes at high temperatures / E. N. Galyuk, D. Y. Lando, Chin-Kun Hu // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф., IX съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. 2010. Т. 1. С. 277–279.
3. *Temporal behavior of DNA thermal stability in the presence of platinum compounds. Role of monofunctional and bifunctional adducts* / D. Y. Lando [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* 2012. Vol. 117, N 1. P. 164–170.
4. *Determination of protein contaminants in DNA preparations of high purity* / D. Y. Lando [et al.] // *Molecular Biology.* 1996. Vol. 30. P. 701–706 (Russian, Engl. transl. 30, 418–421).