

УДК 577.3

А.Е. ЗАКАРЯН, М.А. ДАВТЯН, Н.А. САРКИСЯН

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Работа посвящена изучению противоопухолевых препаратов хемилюминесцентными методами. Показано, что все препараты угнетают реакцию свободнорадикального окисления липидов гомогената мозга. В течение инкубации наблюдается изменение уровня спонтанной хемилюминесценции, которое неодинаково для отдельных препаратов. А также выявлено, что срок инкубации влияет на ингибирующую способность этих препаратов.

Химиотерапия злокачественных опухолей является актуальной проблемой современной онкологии, конечной целью которой является создание и тестирование таких лекарств, применение которых способствовало бы излечению злокачественных опухолей, не оказывая при этом вредного влияния на организм.

В этом направлении проделано достаточно большое количество исследований по изучению как механизмов воздействия противоопухолевых препаратов (ПОП), так и по определению степени их токсичности [1–4]. В указанных работах применялись различные биохимические и биофизические методы и подходы.

Исследователи прибегали к изучению таких процессов, как перекисное окисление липидов (ПОЛ) и интенсивность свободнорадикальных процессов в связи с состоянием биоантиоксидантов (БАО). В этих работах [5] стали часто применять метод хемилюминесцентного (ХЛ) анализа, позволяющий оценить наличие нарушения вышеуказанных процессов и получить информацию, имеющую значительную клиническую ценность при многих распространенных заболеваниях человека, в том числе и при злокачественных новообразованиях [6, 7].

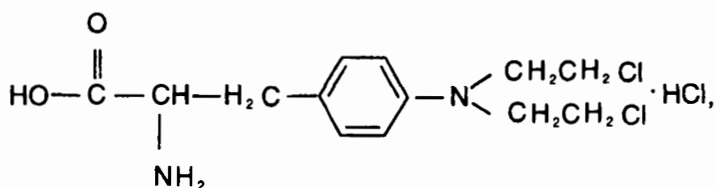
В настоящее время ХЛ анализ часто предлагается для прогнозирования и диагностики в клинической онкологии [7–9]. Такой подход обосновывается тем, что при нарушении многих метаболических процессов в организме, в том числе и свободнорадикального окисления липидов и липидоподобных структур [8] наблюдается изменение интенсивности этих процессов, что и выражается в виде изменения спонтанных и индуцированных форм ХЛ в пробах, взятых из больных органов до и после воздействия ПОП [9, 10]. Наряду с этим были выявлены некоторые закономерности, свидетельствующие о том, что при разных формах злокачественного роста характер изменения ХЛ параметров может быть неодинаковым [11]. Так, если опухолевый процесс сопровождается выраженными и закономерными отклонения-

ми от нормы (с учетом возраста и пола), то определение этого показателя в процессе лечения и по его окончании может дать объективную информацию о степени радикальности проводимого лечения.

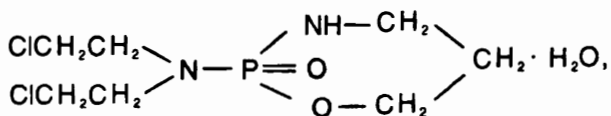
В данной работе в плане вышесказанного предпринята попытка с помощью ХЛ исследований изучить взаимодействие некоторых ПОП с биологическими структурами, особенно липидсодержащими и липидами по определению их перекисного окисления, протекающего по цепному свободнорадикальному механизму.

Для исследования действия ПОП на процесс свободнорадикального окисления липидов в качестве "мишени" (источника спонтанной ХЛ) использовали гомогенат мозга крупного рогатого скота в 0,175 М КСl: 0,25 М трисНСl буферном растворе (рН=7,4) в соотношении 1:10. Гомогенизация проводилась в течение 3 минут с помощью гомогенизатора Эвельхейма-Потера. При выборе ПОП учитывались направленность действия препаратов, их химическая структура и степень растворимости. Исходя из этого, в эксперименте использовали следующие препараты:

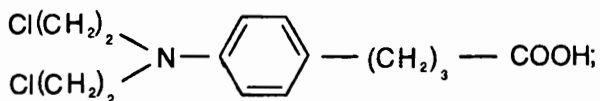
- а) из ряда алкилирующих – сарколизин



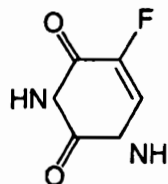
циклофосфан



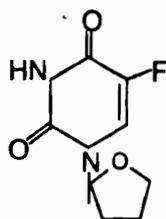
хлорбутил



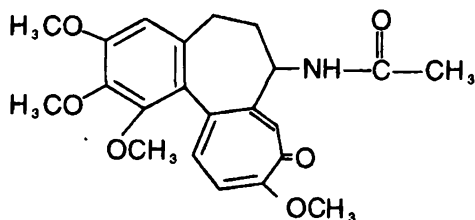
- б) из ряда антиметаболитов – 5-фторурацил



фторафур



в) из ряда препаратов растительного происхождения – колхицин



Для стандартизации исследуемых гомогенатов определяется содержание белка по методу Лоури [12].

Регистрация ХЛ осуществлялась на квантометрической установке, собранной в лаборатории кафедры биофизики биологического факультета ЕГУ [13].

Полученные результаты подвергались статистической обработке по критерию Стьюдента и представлены в виде средних арифметических величин и их среднеквадратичных отклонений.

На начальном этапе экспериментов были исследованы действия испытуемых ПОП на интенсивность СХЛ гомогената мозга с целью выяснения возможной ингибирующей или иницирующей способности этих препаратов. Для этого вначале регистрировалась СХЛ гомогената мозга, помещенного в оптическую кювету [13] в объеме 2 мл. Далее на аналогичный образец добавлялся соответствующий ПОП с конечной концентрацией 10^{-3} М. Измерение СХЛ осуществлялось при $40^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Уровень СХЛ гомогената мозга принимался за исходную величину, а изменение ее интенсивности от присутствия растворов ПОП служило мерой для оценки активности испытуемых препаратов. Полученные в этих экспериментах данные указывают на то, что ингибирующая СХЛ способность свежеприготовленных образцов, содержащих ПОП, распределилась следующим образом: хлорбутил > фторафур > колхицин > сарколизин > циклофосфан > тиофосфамид > 5-фторурацил (см. рис.).

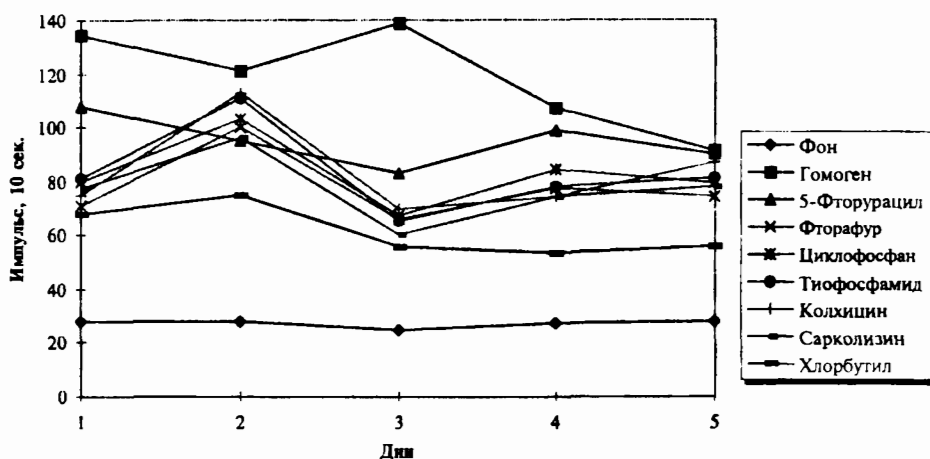
В следующих экспериментах исследовалось действие ПОП на СХЛ в зависимости от времени их инкубации в гомогенате в течение 5 дней при $T=6^{\circ}\text{C}$. Согласно полученным данным, приведенным на рисунке, в течение инкубации наблюдается изменение уровня СХЛ, которое неодинаково для отдельных препаратов. Так, если у хлорбутила наибольшая активность проявляется после четвертых суток инкубации, то для других (напр., для 5-фторурацила) наибольшая активность регистрируется на третьи сутки. Кроме того, однозначно можно сказать, что срок инкубации влияет на ингибирующую способность этих препаратов.

Степень ингибирования интенсивности СХЛ испытуемыми препаратами оценивалась следующей формулой:

$$I = \frac{I_g - I_p \cdot 100\%}{I_g},$$

где I_g – интенсивность свечения гомогената мозга, I_p – интенсивность свечения гомогената мозга в присутствии ПОП. Из таблицы можно видеть, что наибольший процент тушения ХЛ наблюдается у сарколизина на третьи сутки инкубации (56,8%), далее у 5-фторурацила (52,5%), а для других препара-

тов процент ингибирования интенсивности СХЛ колеблется от 51,8% до полного отсутствия эффекта тушения.



Влияние ПОП на интенсивность СХЛ при их инкубации в гомогенате мозга.

Анализируя полученные экспериментальные данные, можно однозначно заметить, что используемые нами во всех экспериментах ПОП проявляют ингибирующую СХЛ способность.

Ингибирование ПОП процесса СХЛ гомогената мозга

| ДНИ | Фон закрыт | Фон открыт | Гомогенат | Iг-15Ф Iг | Iг-1Ф Iг | Iг-1Ц Iг | Iг-1Т Iг | Iг-1К Iг | Iг-1С Iг | Iг-1Х Iг |
|-----|------------|------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | 28 | 43 | 134.0 | 19.4 | 47.0 | 40.3 | 39.6 | 41.0 | 42.5 | 49.2 |
| 2 | 28 | 34 | 121.0 | 21.5 | 17.4 | 14.9 | 8.3 | 6.6 | 20.6 | 38.0 |
| 3 | 25 | 35 | 139.0 | 40.3 | 52.5 | 51.8 | 51.8 | 49.6 | 56.9 | 30.9 |
| 4 | 27 | 35 | 107.0 | 7.5 | 28.0 | 27.1 | 27.1 | 30.8 | 30.8 | 50.5 |
| 5 | 28 | 29 | 91.0 | 1.1 | 18.7 | 11.0 | 11.0 | 4.4 | 14.3 | 38.5 |

Поскольку, как известно, классификация ПОП (академик Н. М. Эмануэль, 1980) приводится по их химической реакционной способности, т. е. по их способности участвовать в электрофильных, нуклеофильных и других реакциях, а также в свободнорадикальных процессах [14], то можно полагать, что в основе механизма действия, скажем, алкилирующих препаратов на уровень СХЛ гомогената, вероятно, лежат именно реакции свободнорадикального катализа, действующие на свободнорадикальные окислительные процессы в липидах и липидных структурах, отражающихся, в свою очередь, в виде ингибирования ХЛ процесса. При этом можно допустить возможность модели реакции типа $RO \cdot + R'CI \rightarrow R \cdot OCl + R'^{\cdot}$.

Таким образом, алкилирующие препараты ($R'CI$) нейтрализуют свободные радикалы, ответственные за генерацию излучения квантов света.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ларионов Л.Ф. Химиотерапия злокачественных опухолей. М.: Медгиз, 1962.
2. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., Наука, 1975.
3. Бабаян Ю.С., Сигрян А.Е. и др. Исследование взаимодействия противоопухолевых соединений митоксандрона и аметантрона с ДНК по характеру изменения спектров кругового дихроизма. Ер.: Изд-во ЕГУ, 1998.
4. Vabayan Yu.S., Khudaverdyan N.V. et al. A Comparative Study of Effect of Three Alkylating Anti-Tumour Preparations on DNA. Yerevan: Redaction of Yerevan State University, Armenia, 1996.
5. Серкиз Н.И., Чеботарев Е.Е., Барабой В.А. и др. Хемиллюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии. Киев: Наукова думка, 1984.
6. Шаров А.П., Владимиров Ю.А., Лопухин Ю.М. Сверхслабое свечение плазмы крови в присутствии ионов Fe^{2+} как дополнительный диагностический тест. – В кн.: Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике. М., 1974, с. 49–55.
7. Шполянский А.М., Бондарев И.М. Сверхслабое свечение сыворотки крови кроликов при опухолевых и воспалительных процессах. – В кн.: Сверхслабое свечение в биологии. М.: Наука, 1972, с. 170–173.
8. Закарян А.Е. Свободнорадикальное окисление липидов в биологических и модельных системах в норме и патологии. Ер.: 1995.
9. Серкиз Я.И., Рябова Э.З. Кинетические ХЛ характеристики плазмы крови при экспериментальном канцерогенезе. – В кн.: ХЛ метод в биологии и медицине. Киев, 1978, с. 85–86.
10. Закарян А.Е., Кочур Н.А., Тарусов Б.Н. О сверхслабой ХЛ сыворотки крови онкологических больных. – В кн.: Физико-химические механизмы злокачественного роста. М.: 1970.
11. Серкиз Я.И. Некоторые изменения параметров индуцированной ХЛ плазмы крови при злокачественном росте. – В кн.: Экспериментальная онкология. Киев, 1980, N3, с. 67–71.
12. Lowry O.H., Roserbrough W.D., Farr A.Y. – V. Biol. Chem., 1951, v. 193, N1, p. 265.
13. Закарян А.Е., Цакикян А.Р., Погосян Г.П., Паносян Г.А. – БЖА, 1990, т. 3, N1, с. 51–54.
14. Проценко Л.Д., Булкина З.П. Химия и фармакология синтетических ПОП. Киев, Наукова думка, 1985.

Ա. Ե. ՉԱԲԱՐՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Ն. Ա. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

ՈՐՈՇ ՀԱԿԱՌՈՒՌՈՒՑՔԱՅԻՆ ՊՐԵՊԱՐԱՏՆԵՐԻ
ՔԻՄԻԼՅՈՒՄԻՆԵՍԵՆՏԱՅԻՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո մ

Աշխատանքը նվիրված է հակառուսոցքային պրեպարատների հետազոտմանը քիմիլյումինեսցենցիայի մեթոդներով: Ցույց է տրված, որ այս բոլոր պրեպարատները ճնշում են ուղեղի հոմոգենատի լիպիդների ազատ ռադիկալային օքսիդացման ռեակցիաները: Ինկուբացիայի ընթացքում նկատվում է սպոնտան քիմիլյումինեսցենցիայի մակարդակի փոփոխություն, որը միատեսակ չէ տարբեր պրեպարատների համար: Նաև հայտնաբերված է, որ ինկուբացիայի ժամկետը նույնպես ազդում է այս պրեպարատների ընկճող հատկության վրա:

A.E. ZAKARYAN, M.A. DAVTYAN, N.A. SARKISYAN

RESEARCH ON SOME ANTI-CANCER SUBSTANCES
BY METHODS OF CHEMILUMINESCENCE

Summary

This work is devoted to examination of anticancer preparations by methods of chemiluminescence. It shows that all the preparations have the ability to suppress the process of chemiluminescence, that means they suppress the reaction of free-radical oxidation of lipids of brain homogenat. During the incubation period the change of the level of chemiluminescence is observed, which is different for some preparations. It is found that the incubation period also influences the suppressing ability of these preparations.