

УДК 612.014.4.083.36

К. С. МАРГАРЯН

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПОРФИРИНА FeTOBut4PyP В КЛЕТОЧНОЙ И НЕКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМАХ МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

Методом ДНК-комет была изучена генотоксичность порфирина FeTOBut4PyP в клеточной и неклеточной системах. Выявленные различия в чувствительности двух моделей отражают разные уровни их организации. Примененный подход может быть рекомендован для оценки генотоксических эффектов разных соединений, а также для сравнительного анализа роли клеточных механизмов в формировании повреждений ДНК.

**Введение.** В последние годы порфирины приобрели большое применение в фармакологии, т.к. они широко распространены в природе (хлорофилл, гем, бактериохлорофилл [1], порфирины нефти и других минеральных пород). Особенностью порфиринов является их способность селективно накапливаться в опухолевых тканях [2]. Применение порфиринов в клинической практике стимулировало поиск их новых производных с улучшенными свойствами [3].

В связи с тем, что FeTOBut4PyP (Fe-производное тетраоксибутилпиридил порфирина) является новым порфирином, механизмы его действия на клетку и, в том числе, на клеточную ДНК ранее не описаны. Согласно литературным данным, порфирины, имеющие пространственную структуру, внешне связываются с ДНК преимущественно в АТ-богатых участках [4].

Для изучения потенциальной генотоксичности FeTOBut4PyP и роли клеточных механизмов в формировании индуцированных порфирином повреждений ДНК применяли метод ДНК-комет (гель-электрофорез отдельных клеток), позволяющий быстро и эффективно оценивать уровни разрывов ДНК как в клеточной, так и в неклеточной системах [5].

При стандартном методе ДНК-комет (*клеточная система*) погруженные в легкоплавкую агарозу клетки наносятся на предметные стекла, предварительно покрытые слоем агарозного геля [6]. Клетки при помощи детергентов и солей высокой концентрации лизируются при pH 10 (при этом

разрушаются 95% протеинов и клеточных мембран). После лизиса и электрофореза заключенных в агарозный слой эукариотических клеток поврежденная ДНК мигрирует в электрическом поле по направлению к аноду, образуя структуру, похожую на комету с «головой» из клубка ДНК и «хвостом» из мигрировавших ДНК. При этом по степени миграции ДНК из ядра можно судить о степени ее повреждения.

Другая версия метода ДНК-комет позволяет оценивать уровень повреждений ДНК в *неклеточной системе*. Необходимым этапом предобработки изучаемыми веществами при этом варианте метода является лизис клеточной и ядерной мембран и частичное разрушение внутриядерных белков, участвующих в упаковке хроматина, с целью освобождения ДНК для относительно свободной миграции в геле при электрофорезе [7]. При этом действие вещества на клетки изучается после процедуры лизиса.

Целью нашего исследования было сравнительное изучение генотоксичности нового порфирина FeTOBut4PyP в лейкоцитах крови человека методом ДНК-комет в клеточной и неклеточной системах.

#### **Материал и методика.**

*Обработка клеток.* Для проведения исследования непосредственно перед экспериментом брали гепаринизированную капиллярную кровь у здоровых доноров в возрасте от 20 до 25 лет.

*Характеристика FeTOBut4PyP.* Это новое соединение, синтезированное на кафедре фармакологической химии Ереванского государственного медицинского университета. FeTOBut4PyP – темно-вишневый кристаллический порошок со слабым специфическим запахом, хорошо растворимый в воде.

*Стандартный метод ДНК-комет (клеточная система).* В работе использовали щелочную версию метода комет, предложенную П. Синхом и соавторами [8] с небольшими модификациями Киффе и соавторов [7].

На предметные стекла наносились два агарозных слоя в следующей последовательности:

- 1%-ый раствор агарозы с последующей инкубацией при 37<sup>0</sup>С на ночь;
- смесь 10 мкл цельной крови человека с 90 мкл 0,5%-го раствора агарозы (LMA), имеющей низкую температуру плавления.

После нанесения второго слоя препараты помещались в холодильник до образования геля (~10 мин). Клетки крови после заключения в агарозный слой обрабатывали на препарате порфирином FeTOBut4PyP в концентрациях 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> М. Растворы порфирина раскатывали непосредственно на предметные стекла, чтобы создать те же экспериментальные условия, что и при методе с неклеточной системой.

Затем препараты инкубировали в течение 2 часов при 37<sup>0</sup>С во влажной камере. Контрольные варианты одновременно обрабатывали буфером 0,4 М Tris, рН 7,5. После инкубации с порфирином лимфоциты на 1 час при 4<sup>0</sup>С помещали в лизирующий раствор, содержащий 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA, 10 мМ Tris (рН 10,0), затем добавляли Тритон X-100. По окончании лизиса препараты погружали на 40 минут в аппарат для электрофореза, содержащий щелочной буфер (300 мМ NaOH и 1 мМ EDTA) для раскручивания цепей

ДНК и выявления щелочно-лабильных сайтов. Электрофорез проводили при напряжении 26 В и силе тока 300 мА в течение 25 минут. После электрофореза препараты обрабатывали нейтрализационным буфером (0,4 М Tris, рН 7,5) и окрашивали раствором этидиума бромидом (20 мкг/мл).

*Модифицированный метод ДНК-комет (неклеточная система).* Для оценки уровня повреждений ДНК, индуцированных порфирином FeTOBut4PyP в неклеточной системе, использовали щелочную версию метода [8] с модификациями [7].

Клетки крови, заключенные в слой агарозы, обрабатывали FeTOBut4PyP после процедуры лизиса (в концентрациях  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  М в течение 2 часов при  $37^{\circ}\text{C}$ ).

Все остальные процедуры осуществляли аналогично таковым для клеточной системы.

*Анализ изображений комет.* Изображения комет регистрировали с помощью видеокамеры (Variocam, PCO, Германия) с повышенной чувствительностью и записывали в компьютер, снабженный программой автоматического анализа CASP (www.Casp.com).

В каждом варианте анализировали по 150 клеток. Уровень повреждений ДНК изучали на основе автоматических измерений процента ДНК в хвосте, момента хвоста Олива (МХО), отношения длины кометы к ее высоте (L/H).

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ Microsoft EXCEL и STATGRAPHICS Plus 5.1 с применением непараметрического теста Mann-Whitney (U-test).

**Результаты и обсуждение.** Подробные результаты измерений % ДНК в хвосте, L/H и МХО по 150 клеткам лейкоцитов крови при действии FeTOBut4PyP в концентрациях  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  М в клеточной и неклеточной системах приведены в таблице.

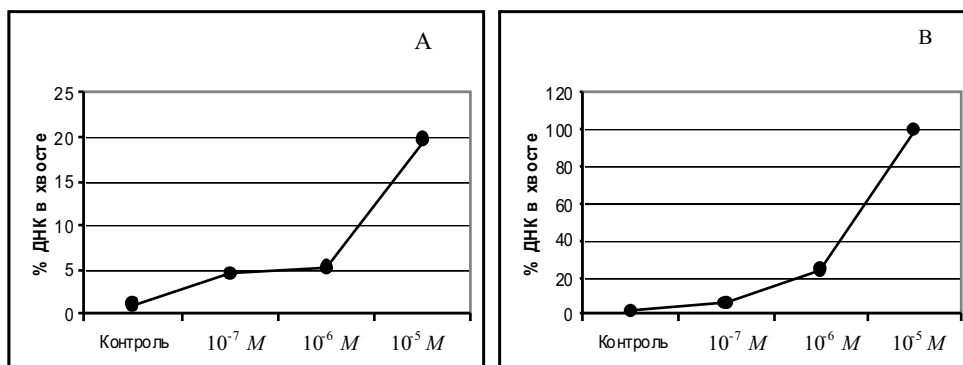
| Концентрация порфирина, М                              | % ДНК в хвосте             |                     | L/H                        |                    | МХО                        |                     |
|--------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|---------------------|
|                                                        | среднее±стандартная ошибка | медиана             | среднее±стандартная ошибка | медиана            | среднее±стандартная ошибка | медиана             |
| Стандартный метод ДНК-комет (клеточная система)        |                            |                     |                            |                    |                            |                     |
| Контроль                                               | 1,16±0,08                  | 0,87                | 1,07±0,01                  | 1,06               | 0,51±0,04                  | 0,42                |
| $10^{-7}$                                              | 4,54±0,28                  | 3,28*               | 1,21±0,01                  | 1,18*              | 2,21±0,17                  | 1,73*               |
| $10^{-6}$                                              | 5,16±0,56                  | 4,02*               | 1,28±0,02                  | 1,19*              | 2,52±0,29                  | 1,81*               |
| $10^{-5}$                                              | 19,61±1,17                 | 15,49*              | 1,83±0,04                  | 1,72*              | 20,42±2,16                 | 11,58*              |
| Модифицированный метод ДНК-комет (неклеточная система) |                            |                     |                            |                    |                            |                     |
| $10^{-7}$                                              | 6,24±0,36                  | 5,35* <sup>a</sup>  | 1,32±0,01                  | 1,29* <sup>a</sup> | 4,05±0,28                  | 3,24* <sup>a</sup>  |
| $10^{-6}$                                              | 24,45±1,06                 | 21,83* <sup>a</sup> | 1,81±0,03                  | 1,73* <sup>a</sup> | 25,02±1,49                 | 19,23* <sup>a</sup> |
| $10^{-5}$                                              | 100% разрушение ДНК        |                     | 100% разрушение ДНК        |                    | 100% разрушение ДНК        |                     |

\* – достоверная разница по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ );

a – достоверная разница по сравнению с клеточной системой ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, FeTOBut4PyP во всех изученных концентрациях и по всем исследуемым параметрам вызывает достоверное повышение уровня повреждений ДНК по сравнению с контролем.

Для наглядности приведены диаграммы эффектов по проценту ДНК в хвосте в клеточной (А) и неклеточной (В) системах метода ДНК-комет.



Сравнение действия FeTOBut4PyP в клеточной и неклеточной системах показывает, что порфирин повреждает ДНК как при воздействии на неповрежденную клетку, так и на нуклеоид во всех изученных концентрациях. Это означает, что порфирин способен проникать через клеточную и ядерную мембраны и прямо действовать на ДНК. Однако уровень разрывов ДНК, вызванных действием FeTOBut4PyP в исследованных концентрациях, в неклеточной системе достоверно выше, чем при действии на интактные клетки ( $p < 0,05$ ). Очевидно, клеточные мембраны в определенной степени задерживают проникновение порфирина в ядро и тем самым ослабляют генотоксический эффект.

Таким образом, примененный подход может быть рекомендован для оценки генотоксических эффектов разных соединений и сравнительного анализа роли клеточных механизмов в формировании повреждений ДНК.

Кафедра генетики и цитологии

Поступила 10.11.2006

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bonnett R. – Chem. Soc. Rev., 1995, v. 24, p. 19–33.
2. Vicente Mg.H. – Current Med. Chem., Anti-Cancer Agents, 2001, v. 1, p. 175–194.
3. Zalessky V.N., Mikhalkin I.A. – Europ. J. Clin. Pharm. Ther., 1989, v. 21, p. 23–24.
4. Далян Е.Б. Структурообразование в комплексах ДНК–лиганд. Обратимое и необратимое связывание. Автореф дисс. на соискание уч. ст. докт. физмат наук Ер., 2002.
5. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartman A., Kobayashi H., Miyamae Y., Royas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. – Environ. Mol. Mutagen, 2000, v. 35, p. 206–221.
6. Fairbairn D.V. et al. – Mutation Research, 1995, v. 339, p. 37–59.
7. Kiffe M., Christenand P., Arni P. – Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2003, v. 537, № 2, p. 151–168.
8. Singh N.P. et al. – Exp. Cell Research, 1988, v. 175, p. 184–191.

Կ. Ս. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ

FeTOBut4PyP ՊՈՐՖԻՐԻՆԻ ԳԵՆՈՏՈՔՍԻԿ ԷՖԵԿՏՆԵՐԻ  
ՀԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ ԱՆԱԼԻԶԸ ԲԶՁԱՅԻՆ ԵՎ ՈՉ ԲԶՁԱՅԻՆ  
ՀԱՍԱԿԱՐԳԵՐՈՒՄ ԴՆԹ-ԳԻՍԱՍՏՂԵՐԻ ՄԵԹՈԴՈՎ

Ա մ փ ո փ ու մ

ԴՆԹ-գիսաստղերի մեթոդով բջջային և ոչ բջջային համակարգերում ուսումնասիրվել է նոր FeTOEt4PyP պորֆիրինի գենոտոքսիկությունը: Երկու մոդելների զգայունության ներկայացված տարբերությունները արտահայտում են նրանց կազմավորման տարբեր մակարդակները: Կիրառված մոտեցումը կարելի է երաշխավորել տարբեր միացությունների գենոտոքսիկ էֆեկտների գնահատման և ԴՆԹ-ի վնասվածքների առաջացման դեպքում բջջային մեխանիզմների դերի համեմատական անալիզի համար:

K. S. MARGARYAN

COMPARATIVE ANALYSIS OF GENOTOXIC EFFECTS OF  
PORPHYRIN FeTOBut4PyP AT CELL AND ACELLULAR SYSTEMS  
IN COMET ASSAY

Summary

The genotoxicity of the new porphyrin FeTOEt4PyP was investigated at cell and acellular systems. Experimental cell and acellular systems used were based on Comet-assay. The differences in the sensitivity of two models presented are to reflect the different levels of their organisation. The approach applied may be recommended for the estimation of genotoxic effects of different agents and comparative analysis of role of cellular mechanisms in DNA damage.