

Л. Б. Бондаренко¹, Т. А. Карацуба¹, О. О. Хавич¹,
Г. М. Шаяхметова¹, Н. І. Шарикіна¹, В. М. Коваленко¹,
О. І. Харченко², Н. М. Сергійчук³, М. М. Калачінська³

Ефект етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[*b*]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду на ДНК, РНК, білки хроматину та вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп у саркомі 45 і незмінених тканинах шкіри щурів

¹Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

²Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка, м. Київ

³Відкритий міжнародний університет розвитку людини «Україна», м. Київ

Ключові слова: похідне хіназоліну, саркома 45, ДНК, РНК, фрагментація, антиоксидантна система

Останніми десятиріччями відбувається значна інтенсифікація пошуку індивідуальних підходів до лікування захворювань. Врахування індивідуальних особливостей окремих організмів дає можливість одержувати якісно кращі рівні виліковування навіть тяжких патологій. На жаль, традиційні методи хіміотерапії пухлин не дозволяли дотепер досягати хоч якоїсь специфічності цитотоксичної дії застосовуваних препаратів. Наразі виник й інтенсивно розвивається новий напрям – таргетна протипухлинна терапія зі застосуванням препаратів, які мають високо специфічно взаємодіяти з молекулами, що регулюють процеси диференціації та проліферації клітин (фактори росту, рецептори ERBB, сигнальні білки та адаптери, кінази BRAF, KRAS, NRAS, NRAS, AKT, MEK, PI3K, фосфатаза PTEN, шаперон HSP90 та ін.) [1].

Однак висока специфічність нових протипухлинних засобів до певних регуляторних молекул хоча й забезпечує більшу ефективність протипухлинної хіміотерапії, це ніяк не виключає наявність у них суттєвих небажаних побічних ефектів [2–6], дослідження

яких на системному рівні майже не ведеться. Стандартні підходи до вивчення специфічної фармакологічної дії та токсичності протипухлинних засобів нового покоління фактично залишають поза увагою дослідників метаболічні зміни в організмі за межами пухлини.

У попередніх експериментах нами було проведено вивчення впливу потенційного протипухлинного препарату етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[*b*]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду (ЕХТК) на складові хроматину, процеси фрагментації ДНК, стан антиоксидантної системи в клітинах карциноми Герена та незмінених тканинах матки й виявлено специфічність його впливу на досліджувані показники [7].

Ці обставини зумовлюють актуальність подальшого з'ясування, чи є ця специфічність ЕХТК характерною лише для тканини матки, чи вона поширюється й на інші тканини організму.

Мета дослідження – вивчити вплив етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[*b*]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду на ДНК, РНК, білки хроматину, процеси фрагментації ДНК і показники стану антиоксидантної системи в клітинах саркоми 45 і незмінених тканинах шкіри щурів.

Матеріали та методи. Дослідження впливу ЕХТК проводили на білих

щурах – самицях лінії Вістар масою 150–250 г, вирощених у віварії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ». Тварин утримували на стандартному харчовому раціоні за умов вільного доступу до води. План досліджень був розглянутий і схвалений Комітетом з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», усі процедури, пов'язані з гуманним поводженням з тваринами та їхнім використанням в експериментах, були дотримані. Тварин розподіляли на групи за методом рандомізації з попереднім карантинном протягом 7 діб. Етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[*b*]тіофен-3-карбоксилат гідрохлорид було синтезовано у відділі медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ» та попередньо охарактеризовано як перспективну сполуку з протипухлинною активністю [7–9].

Вплив даного похідного хіназоліну на складові хроматину та стан антиоксидантної системи вивчали за умов експериментальної моделі саркоми 45, яку одержували шляхом трансплантації тканин пухлини тваринам за стандартними методами [10]. Тварини були розподілені на 3 групи по 6 тварин у кожній: 1 – інтактні щури; 2 – контроль (саркома 45); 3 – саркома 45 + ЕХТК (24,37 мг/кг).

Тваринам 3 групи перорально вводили ЕХТК у вигляді суспензії в крохмальному гелі, а щурам 1 і 2 груп – відповідний об'єм крохмального гелю. Введення проводили кожні 48 год, починаючи з наступної доби після трансплантації саркоми 45, протягом двох тижнів. На 15 добу експерименту тварин зважували, потім під легким ефірним наркозом знеживлювали методом цервікальної дислокації, вилучали для подальших досліджень:

- у тварин групи 1 – шкіру (група зразків 1);
- у тварин групи 2 – пухлини (група зразків 3);
- у тварин групи 3 – шкіру без неопластичних змін (група зразків 2) і пухлини (група зразків 4).

Заморожені в рідкому азоті тканини гомогенізували та виділяли геномну

ДНК, РНК і білки [11]. Для виділення нуклеїнових кислот гомогенізацію зразка (50 мкг) проводили в 1 мл TRI-реагенту («Sigma», США), після чого додавали 200 мкл хлороформу, струшували, залишали стояти за кімнатної температури протягом 15 хв. Далі центрифугували – 12 000 g, 2 °C, 15 хв, після чого розчин розділився на три фази: червону (білки), білу (містить ДНК) і безбарвну (містить РНК). Фракції акуратно розшарували окремо по пробіркам для подальшого очищення та визначення вмісту нуклеїнових кислот і білків. Для виділення РНК у мікропробірку з відібраною безбарвною фазою додавали 0,5 мл ізопропанолу, відстоювали 5–10 хв за кімнатної температури та центрифугували – 12 000 g, 2 °C, 10 хв, зливали супернатант. До осаду додавали 75 % етанол до об'єму 2 мл, центрифугували за 12 000 g, 2 °C, 5 хв, зливали супернатант. Процедуру повторювали двічі. Одержаний зразок РНК висушували та розводили в 100 мкл DEPC-води. Для виділення ДНК в епендорф з відібраною фракцією додавали 0,3 мл 100 % етанолу, відстоювали 2–3 хв за кімнатної температури, центрифугували – 2000 g, 2 °C, 5 хв, зливали супернатант. До осаду додавали розчин 0,1 моль/л цитрату натрію в 10 % етанолі (2 мл), відстоювали 30 хв і центрифугували – 2000 g, 2 °C, 5 хв, зливали супернатант. Осад промивали 2 рази в 70 % етанолі, як зазначено вище, та висушували. Одержаний зразок ДНК розводили в 100 мкл DEPC-води. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК і РНК проводили за загальноприйнятим методом [12]. Вимірювали поглинання світла за довжини хвилі 260 нм. Розраховували концентрацію ДНК, використовуючи коефіцієнт перерахунку 6,5 за формулою:

$$C_{\text{ДНК}} [\text{мкг/мл}] = A_{260} \cdot 6,5.$$

Аналогічно проводили визначення вмісту РНК і розраховували її концентрацію, використовуючи коефіцієнт перерахунку 5,2 за формулою:

$$C_{\text{РНК}} [\text{мкг/мл}] = A_{260} \cdot 5,2.$$

Вміст гістонів визначали за модифікованим методом Смирнова Н. В. [13].

Для визначення ступеня фрагментації ДНК її розчиняли у ТВЕ буфері (10 ммоль/л Tris-HCl і 1 ммоль/л EDTA, рН 8) і розділяли у 2 % агарозному гелі 80В; 83 мА, 6 W, 2 год. Після завершення електрофорезу гелі забарвлювали розчином бромистого етидію (5 мкг/мл) і фотографували в УФ-світлі за допомогою системи GelDoc («BioRad», США) [14].

У гомогенатах тканин також визначали вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп за методом Еллмана [15]. Для визначення загального вмісту SH-груп готували інкубаційну суміш, що містила 0,25 мл гомогенату, 0,75 мл 0,2 моль/л розчину Tris (рН 8,2), 0,05 мл реактива Еллмана і 3,95 мл етанолу (96 %). Інкубували 15 хв, постійно струшуючи, центрифугували – 15 хв, 3000 g. Визначали екстинкцію за 412 нм. Для визначення небілкових SH-груп спочатку проводили депротейнізацію гомогенату: 2,5 мл гомогенату змішували з 2,0 мл дистильованої води та 0,5 мл 50 % розчину ТХО. Інкубували за температури -40°C протягом 15 хв, постійно струшуючи, центрифугували – 15 хв, 3000 g, -40°C . В одержаному супернатанті проводили визначення небілкових SH-груп. Інкубаційна суміш містила 1 мл супернатанту, 2 мл 0,4 моль/л розчину Tris (рН 8,9), 0,05 мл реактива Еллмана. Інкубували 5 хв, постійно струшуючи. Визначали екстинкцію при 412 нм.

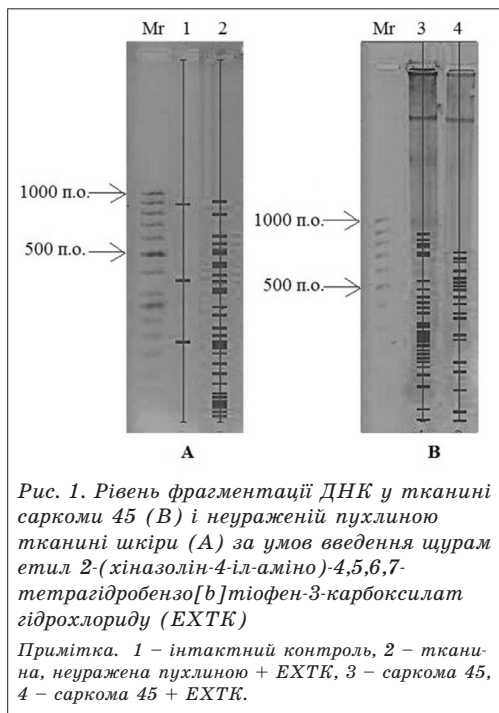
Отримані дані представляли як середнє значення \pm похибка середнього ($M \pm m$). Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною в разі $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Дослідження фрагментації ДНК було обране нами через те, що даний показник є одним з найінформативніших маркерів протікання процесів апоптозу в організмі [16], а зміни в структурі та складі нуклеїнових кислот і білків хроматину настільки важливі для функціонування клітини надалі, що підлягають жорсткому контролю спеціальною ендонуклеазною системою [17].

Результати вивчення впливу саркоми 45 та її лікування ЕХТК на процеси фрагментації ДНК наведені на рисунку 1 і в таблиці 1. Як видно з електрофореграм, розвиток саркоми 45 призводить до значного посилення процесів фрагментації ДНК порівняно з інтактним контролем. Якщо в інтактній тканині шкіри на електрофореграмі відмічено лише 3 фрагменти ДНК довжиною 900, 350 і 100 пар основ, то за умов розвитку саркоми 45 – 22. Із них фрагментів з довжинами молекул від 1000 до 500 пар основ було 5, фрагментів з довжинами молекул від 500 до 200 пар основ – 5, фрагментів з довжинами молекул від 200 до 20 пар – 12. Причому за вмістом переважали фрагменти ДНК з найменшими розмірами (від 200 до 20 пар основ). Процент фрагментації ДНК зріс майже в 5 разів від 11,24 % у нормі до 55,93 % – за саркоми 45 (табл. 1). Ці результати цілком узгоджуються з нашими попередніми даними щодо впливу даного похідного хіназоліну на клітини карциноми Герена [7], а також з результатами інших авторів, які відзначали значне посилення рівня фрагментації ДНК за умов розвитку онкологічного процесу [18] і наявність кореляції між ступенем пошкодження ДНК та інтенсивністю росту карциноми Герена в щурів [19].

У клітинах тканин, не уражених неопластичним процесом, лікування ЕХТК також призводило до стимуляції процесів фрагментації ДНК порівняно з інтактним контролем. Так, загальна кількість утворених фрагментів складала 23, з них з довжинами молекул від 1000 до 500 пар основ – 5, фрагментів з довжинами молекул від 500 до 200 пар основ – 6, фрагментів з довжинами молекул від 200 до 20 пар – 12. У цьому разі за вмістом також переважали фрагменти ДНК з найменшими розмірами (від 200 до 20 пар основ). Фрагментація ДНК складала 50 %.

У клітинах саркоми 45 лікування ЕХТК призводило до пригнічення процесів фрагментації ДНК порівняно з нелікованою саркомою 45. Так, загальна кількість утворених фрагментів складала – 18, з довжинами молекул від 1000 до 500 пар основ – 6, фрагментів



з довжинами молекул від 500 до 200 пар основ – 6, фрагментів з довжинами молекул від 200 до 20 пар – 6. У цьому випадку за вмістом переважали фрагменти ДНК з середніми розмірами (від 500 до 200 пар основ). Фрагментація ДНК становила 52 %.

Цікаво порівняти вплив ЕХТК на саркому 45 і карциному Герена. Якщо ефекти ЕХТК на неуражені тканини за умов відтворення обох моделей пухлин були фактично аналогічними як стосовно процента фрагментації, так і стосовно кількості та масового розподілу фрагментів ДНК, то нормалізуючий вплив даного похідного хіназоліну на досліджуваний показник був більш вираженим на моделі саркоми 45, ніж карциноми Герена [7].

Відзначений нами вплив ЕХТК на ДНК як на тлі онкологічного процесу, так і в неуражених неопластичним процесом тканинах може бути зумовленим специфічною цитотоксичною дією на клітини, що супроводжується пригніченням їхньої мітотичної активності, як це відзначено й для інших похідних хіназоліну [20] чи протипухлинних сполук з орто-конденсованими системами в структурі молекули [21–23]. Крім безпосереднього впливу на молекули нуклеїнових кислот чи білків, ЕХТК може здійснювати й ефект через активацію апоптозу за церамід-опосередкованими шляхами [22], причому внесок прямого або непрямого шляхів реалізації цитотоксичних ефектів у різних препаратів, що застосовуються для хіміотерапії різних пухлин, сильно варіює залежно від їхньої хімічної природи та умов експерименту [23].

Результати дослідження змін вмісту РНК, ДНК, співвідношення РНК/ДНК, РНК/ загальний вміст нуклеїнових кислот і гістонів у саркомі 45 за умов введення щурам тест-зразка ЕХТК наведені в таблиці 2.

З одержаних результатів видно, що як і у випадку впливу ЕХТК на карциному Герена [7] не відзначалося вірогідних змін вмісту ДНК за наявності чітких вірогідних змін решти досліджуваних показників.

За умов нелікованої саркоми 45 вірогідно зростає вміст РНК і гістонів, так само як і співвідношення РНК/ДНК і РНК/НК.

У клітинах тканин, не уражених неопластичним процесом, лікування ЕХТК не призводило до вірогідних відмінностей від рівня інтактного контролю за жодним з показників.

Таблиця 1

Фрагментація ДНК в експериментальних тварин, %

Показник	Експериментальна група			
	тканина шкіри (інтакт)	тканина шкіри (без інвазивного ураження) + ЕХТК	саркома 45	саркома 45 + ЕХТК
Фрагментація ДНК, %	11,24	50,20	55,93	51,58

Примітка. ЕХТК – етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[б]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду.

Вміст нуклеїнових кислот, їхні співвідношення та вміст гістонів у клітинах саркоми 45 і тканинах шкіри без неопластичних змін за умов введення щурам тест-вразка етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[*b*]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду (ЕХТК)

Показник	Експериментальна група			
	тканина шкіри (інтакт)	тканина шкіри (без інвазивного ураження) + ЕХТК	саркома 45	саркома 45 + ЕХТК
Вміст РНК, мкг/мг	12,28 ± 4,96	15,25 ± 1,77 ^{#, &}	96,35 ± 21,09*	92,94 ± 25,33*
Вміст ДНК, мкг/мг	100,45 ± 1,82	97,91 ± 3,70	102,60 ± 0,76	102,0 ± 0,46
РНК/ДНК	0,12 ± 0,05	0,16 ± 0,02 ^{#, &}	0,94 ± 0,21*	0,91 ± 0,25*
РНК/загальний вміст нуклеїнових кислот	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,01 ^{#, &}	0,47 ± 0,06*	0,46 ± 0,08*
Гістони, мг/мг тканини	0,38 ± 0,02	0,41 ± 0,03 ^{#, &}	0,57 ± 0,02*	0,50 ± 0,04*

Примітка. **p* < 0,05 порівняно до інтактного контролю, #*p* < 0,05 порівняно до показників групи з пухлинами без введення препаратів, &*p* < 0,05 порівняно до показників групи з пухлинами та введенням ЕХТК.

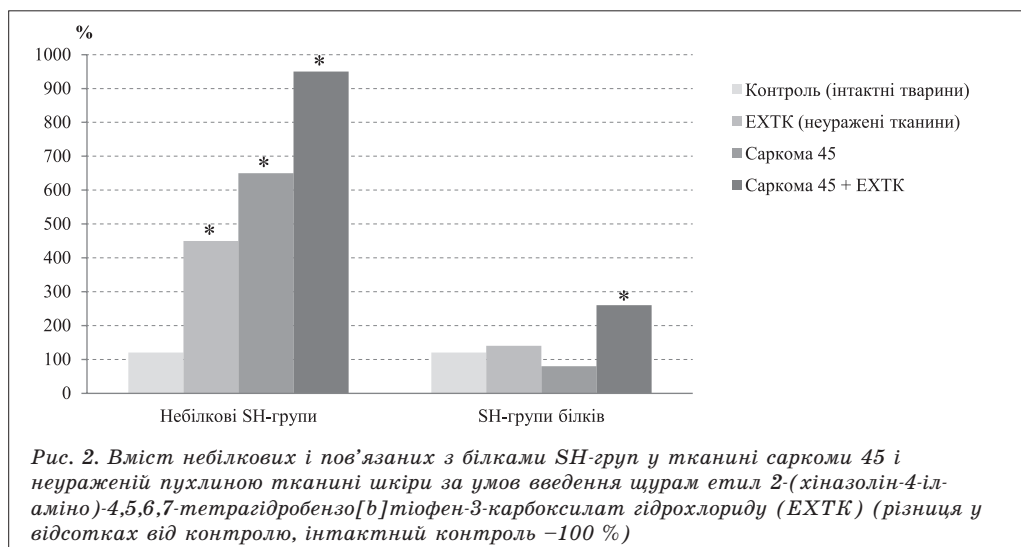
У клітинах пухлини Герена за нашими даними [7] лікування ЕХТК призвело до незначної тенденції до нормалізації порушень обміну нуклеїнових кислот порівняно з групою нелікованої карциноми Герена.

Порівняння впливу ЕХТК на саркому 45 і карциному Герена показало, що як і у випадку впливу на фрагментацію ДНК, якщо ефекти ЕХТК на неуразнені тканини за умов відтворення обох моделей пухлин були фактично аналогічними за всіма досліджуваними показниками, то нормалізуючий вплив даного похідного хіназоліну на них був більш вираженим на моделі саркоми 45, ніж у карциномі Герена [7].

Наші дані цілком узгоджуються з результатами інших авторів щодо низької варіабельності вмісту ДНК і високої варіабельності вмісту РНК [24], а також рівнів співвідношень РНК/ДНК і РНК/НК у нормі та за умов розвитку пухлинного процесу [25, 26]. Такі відмінності можуть бути наслідком вмикання механізмів гальмування мітотичного циклу в клітинах пухлини під дією ЕХТК [27–28].

На рисунку 2 наведено результати дослідження вмісту відновленого глутатіону та пов'язаних з білками SH-груп у тканині саркоми 45 і неуразненій пухлинною тканині за введення щурам ЕХТК.

Розвиток саркоми 45 супроводжується вірогідними змінами вмісту небілкових SH-груп, що не може не позначитись на стані систем антиоксидантного захисту клітин організму [29]. Одержані нами результати узгоджуються з даними інших авторів, які визначили *in vitro*, що зміна активності ключового ферменту синтезу глутатіону – γ -глутамілцистеїнсинтетази регулює активність ефекторних каспаз, що неминуче призводить до зміни кількості клітин, що вступили в апоптоз [30]. Лікування ЕХТК також підвищує цей показник відносно норми. Щодо можливого механізму такого ефекту ЕХТК, то тут можна припустити одночасну його дію на кілька ланок процесу апоптозу. За даними низки авторів, реалізація TNF R1- і FAS-опосередкованого шляху апоптозу включає активацію кіназ [30]. Крім цього, активовані рецептори зв'язуються з білками, що мають домени SH₂, які розпізнають фосфо-тирозин-вмісні послідовності активованого рецептора. Можна припустити, що GSSG може спричиняти глутатіонілювання залишків цистеїну в білках, що забезпечують сигнальну трансдукцію. Крім того була показана здатність GSSG здійснювати рецептор-опосередкований вплив на внутрішньоклітинні процеси [31, 32]. Системи глутатіону впливають на активацію ефекторних



каспаза-3. У зв'язку з цим можна припустити, що співвідношення відновленого глутатіону до окисненого глутатіону регулює рецепторний шлях реалізації апоптозу не тільки через AP-1, NFκ-B, Bcl-2, p53 [33, 34, 35], а й безпосередньо, пригнічуючи перетворення прокапази-8 в активну форму, субстратом якої є каспаза-3.

У разі впливу ЕХТК на клітини саркоми 45, очевидно, відбувається сумація ефектів. Щодо впливу на вміст пов'язаних з білками SH-груп у тканині саркоми 45 і неураженій пухлиною тканині, то в даному разі вірогідні відмінності від норми даного показника відзначені лише щодо впливу ЕХТК на клітини пухлини.

Цікаво відзначити, що порівняння впливу ЕХТК на саркому 45 і карциному Герена [7] показало, що як і у випадку всіх вищезгаданих досліджуваних показників, нормалізуючий вплив даного похідного хіназоліну на вміст відновленого глутатіону та пов'язаних з білками SH-груп був більш вираженим на моделі саркоми 45, ніж у карциномі Герена [7].

Висновки

Вивчення впливу етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[b]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду на ДНК, РНК, білки хроматину, процеси фрагментації ДНК, вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп у саркомі 45 і незмінених тканинах шкіри показало, що дана сполука вірогідно змінювала більшість досліджуваних показників як порівняно з інтактними тваринами, так і з саркомою 45 без лікування. Специфічність впливу етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[b]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду на клітини пухлин була найвираженішою щодо змін вмісту фрагментів ДНК, РНК, білків хроматину, а також небілкових і пов'язаних з білками SH-груп. Порівняння впливу етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[b]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду на саркому 45 і карциному Герена показало, що нормалізуючий вплив даного похідного хіназоліну на всі досліджені показники був більш вираженим на моделі саркоми 45, ніж у карциномі Герена.

1. Targeting erbB receptors. Z. H. Zhang, J. Liu et al. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2010. V. 21. P. 961–966.
2. Subgroup effects in a randomised trial of different types and doses of exercise during breast cancer chemotherapy. K. S. Courneya, D. C. McKenzie, J. R. Mackey et al. *Br J Cancer.* 2014. V. 111. P. 1718–1725. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.466>.
3. Nanoscale drug delivery strategies for therapy of ovarian cancer: conventional vs targeted. S. Gupta, Y. Pathak, M. K. Gupta, S. P. Vyas. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019. V. 47. P. 4066–4088. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1677680>.
4. *Smithson C. R., Schneider S. M.* Ibrutinib: a new targeted therapy for hematologic cancers. *Clin J Oncol Nurs.* 2015. V. 19. P. E47–51. <https://doi.org/10.1188/15.CJON.E47-E51>.

5. Ali I. Nano drugs: novel agents for cancer chemo-therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011. V. 11. P. 130.
6. Norouzi M., Amerian M., Atyabi F. Clinical applications of nanomedicine in cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2019. P. S1359–6446(19)30377-0. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.017>. [Epub ahead of print] Review.
7. Ефект етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[*b*]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду на ДНК, РНК, білки й показники стану антиоксидантної системи в карциномі Герена та незмінених тканинах матки щурів. Л. Б. Бондаренко, Т. А. Карацуба, О. О. Хавич, Г. М. Шахметова та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2019. Т. 13 (6). С. 383–392.
8. Протипухлинна активність похідних хіназоліну на недрібноклітинному раку легенів людини (підкапсульний тест). Н. О. Мешкова, О. О. Хавич, Г. М. Олійник та ін. Матеріали V Національного з'їзду фармакологів України. 18–20 жовтня 2017. Запоріжжя, 2017. С. 94–95.
9. Мешкова Н. О. Протипухлинна активність та механізми дії похідних хіназоліну: дис. канд. біол. наук. 14.03.05-фармакологія, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Київ, 2017. 150 с.
10. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США; под ред. З. П. Софьиной и др. Москва : Медицина, 1980. 296 с.
11. *Current Protocols in Toxicology*; ed. M. Maines. New York : John Wiley & Sons, Inc., 2005. 2758 p.
12. Великов В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство: учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано- и биомед. технол., обуч-ся по напр. «Биология (020400)», «Биология-биол. (050100)», «Биотехнические системы и технологии (200100)», «Медицинская физика (011200)» и по спец. «Биоинженерия и биоинформатика (020501)». Саратов : Издательство «Саратовский источник», 2013. 84 с.: ил.
13. Смирнов Н. В. Фракционирование гистоновых белков печени крысы. Современные методы в биологии; ред. В. Н. Орехович. Москва : Медицина, 1977. С. 349–353.
14. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. P. Lee, J. Costumbrado, C. Hsu, Y. Kim. *Journal of Visualized Experiments*. 2012. V. 62. P. 57–59.
15. Sedlak J., Lindsay, R. H. Estimation of total, protein-bound, and non protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*. 1968. V. 25. P. 192–205.
16. Wang X., Yongke Lu Y., Cederbaum A. I. Induction of Cytochrome P450 2E1 Increases Hepatotoxicity Caused by Fas Agonistic Jo2 Antibody in Mice. *Hepatology*. 2005. V. 42. P. 400–411.
17. DMBA-induced cytotoxicity in lymphoid and nonlymphoid organs of B6C3F1 mice: relation of cell death to target cell intracellular calcium and DNA damage. S. W. Burchiel, D. A. Davis, S. D. et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992. V. 113. P. 126–132
18. Erol A. Systemic DNA damage response and metabolic syndrome as a premalignant state. *Curr. Mol. Med.* 2010. V. 3. P. 321–334.
19. Комбінований вплив екзогенних оксидів азоту та малих доз іонізуючої радіації на розвиток генетичної нестабільності та утворення вільнорадикальних сполук при пухлинному рості. О. А. Главін, Б. І. Герашенко, Н. М. Рябченко та ін. *Сучасні проблеми токсикології*. 2011. Т. 5. С. 108–109.
20. Лукашова О. П. Действие ионизирующей радиации и препарата «Этопозид» на процессы апоптоза и ультраструктуры клеток карциномы Герена. *Український радіологічний журнал*. 2013. Т. 21. С. 56–63.
21. Патент США: Індукуючі апоптоз засоби для лікування злоякісних пухлин та імунологічних і аутоімунних захворювань. Автори патента: Сауэрс Э. Дж. (US), Ван С. (US), Салливан Дж. (US), Канзер А. (US), Уэндт М. Д. (US), Джадд Э. С. (US), Тао Чжи-фу (US). C07D471/04, C07D463/00, A61P35/00, A61K31/437. URL: <http://www.findpatent.ru/patent/266/2662812.html>.
22. Ceramide-induced cell death in malignant cells. A. Carpinteiro, C. Dumitru, M. Schenck, E. Gulbins. *Cancer Letters*. 2008. V. 264. P. 1–10.
23. Вплив поєднаної дії іонізуючого випромінювання та хіміопрепаратів на вміст проапоптозного ліпиду цераміду в карциномі Герена. Т. Сегеда, Н. Мітряєва, Т. Бакай, Л. Гребнік. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2012. Вип. 60. С. 111–116.
24. Vulow J. F. RNA-DNA ratios as indicators of growth rates in fish: A review. In: Summerfelt RC, Hall GE, editors. *The age and growth of fish*. The Iowa State University Press; Ames, Iowa, 1987. P. 45–64.
25. Robinson S. M., Ware D. Ontogenetic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, measured with RNA/DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1988. V. 45. P. 1422–1429.
26. Новичков Е. В., Вотинцев А. А. Значение гистоспектрофотометрических параметров опухоли в прогнозе метастазирования серозной овариальной карциномы. *Пермский медицинский журнал*. 2006. Т. 23. С. 112–137.
27. Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени Рс-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea Mays* L.). Н. А. Наволокин, Н. В. Полуконова, Г. Н. Маслякова и др. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2013. Т. 9. С. 74–81.

28. *Traganos F., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R.* The ratio of RNA to total nucleic acid content as a quantitative measure of unbalanced cell growth. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 1982. V. 2. P. 212–218.
29. *Hutcheson R., Rocic P.* The Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, Environment, and Cardiovascular Disease: The Great Exploration. *Experimental Diabetes Research*. 2012. V. 2012. P. 1–13.
30. Система глутатиона участвует в регуляции апоптоза опухолевых клеток. Н. В. Рязанцева, О. Л. Носарева, Е. А. Степовая и др. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014. Т. 13. С. 73–78.
31. *Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R.* Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death Differ*. 2005. V. 12. P. 1555–1563.
32. Transactivation of a receptor of an epidermal factor of growth by the oxidized glutathione and its pharmacological analog Glutoksy A431 in cages. Dokl. E. B. Burova, K. P. Vasilenko, V. G. Antonov, N. N. Nikol'sky. *Russian Academy of Sciences*. 2005. V. 404. P. 122–124 (in Russian).
33. *Oktjabr'sky O. N., Smirnova G. V.* Redoks-regulation cellular functions. *Biokhimiya – Biochemistry*. 2007. V. 72. P. 158–174 (in Russian).
34. *Zenkov N. K., Men'shnikova E. B., Tkachev V. O.* Some principles and mechanisms of redoks-regulation. *Kislorod i antioksidanty – Oxygen and antioxidants*. 2009. V. 1. P. 3–64 (in Russian).
35. *Raza H., John A., Howarth F. C.* Alterations in glutathione redox metabolism, oxidative stress, and mitochondrial function in the left ventricle of elderly zucker diabetic Fatty rat heart. *Int. J. Mol. Sci*. 2012. V. 13. P. 16241–16254.

Л. Б. Бондаренко, Т. А. Карацуба, О. О. Хавич, Г. М. Шаяхметова, Н. І. Шарикіна, В. М. Коваленко, О. І. Харченко, Н. М. Сергійчук, М. М. Калачінська
Ефект етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[б]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду на ДНК, РНК, білки хроматину та вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп у саркомі 45 і незмінених тканинах шкіри щурів

Врахування індивідуальних особливостей окремих організмів дає можливість одержувати якісно кращі рівні виживання навіть тяжких патологій. На жаль, традиційні методи хіміотерапії пухлин не дозволяли дотепер досягати хоч якоїсь специфічності цитотоксичної дії застосовуваних препаратів. У попередніх експериментах нами було проведено вивчення впливу потенційного протипухлинного препарату етил 2-(хіназолін-4-іл-аміно)-4,5,6,7-тетрагідробензо[б]тіофен-3-карбоксилат гідрохлориду (ЕХТК) на складові хроматину, процеси фрагментації ДНК, стан антиоксидантної системи в клітинах карциноми Герена та незмінених тканинах матки й виявлено специфічність його впливу на досліджувані показники. Це зумовлює актуальність подальшого з'ясування, чи є ця специфічність ЕХТК характерною лише для тканини матки, чи вона поширюється й на інші тканини організму.

Мета дослідження – вивчити вплив ЕХТК на ДНК, РНК, білки хроматину, процеси фрагментації ДНК і показники стану антиоксидантної системи в клітинах саркоми 45 і незмінених тканинах шкіри щурів.

Тварини були розподілені на 3 групи по 6 тварин у кожній: 1 – інтактні щури; 2 – негативний контроль (саркома 45); 3 – саркома 45 + ЕХТК (24,37 мг/кг).

Вивчення впливу ЕХТК на ДНК, РНК, білки хроматину, процеси фрагментації ДНК, вміст небілкових і пов'язаних з білками SH-груп у саркомі 45 і незмінених тканинах шкіри показало, що дана сполука вірогідно змінювала більшість досліджуваних показників як порівняно з інтактними тваринами, так і з саркомою 45 без лікування. Специфічність впливу ЕХТК на клітини пухлин була найвираженішою щодо змін вмісту фрагментів ДНК, РНК, білків хроматину, а також небілкових і пов'язаних з білками SH-груп. Порівняння впливу ЕХТК на саркому 45 і карциному Герена показало, що нормалізуючий вплив даного похідного хіназоліну на всі досліджені показники був більш вираженим на моделі саркоми 45, ніж у карциномі Герена.

Ключові слова: похідне хіназоліну, саркома 45, ДНК, РНК, фрагментація, антиоксидантна система

Л. Б. Бондаренко, Т. А. Карацуба, О. А. Хавич, А. М. Шаяхметова, Н. І. Шарькіна, В. Н. Коваленко, О. І. Харченко, Н. Н. Сергійчук, М. Н. Калачинская

Эффект этил 2-(хиназолин-4-ил-амино)-4,5,6,7-тетрагидробензо[б]тиофен-3-карбоксилат гидрохлорида на ДНК, РНК, белки хроматина и содержание небелковых и связанных с белками SH-груп в саркоме 45 и неизмененных тканях кожи крыс

Учет индивидуальных особенностей отдельных организмов дает возможность получать качественно лучшие уровни излечения даже тяжелых патологий. К сожалению, традиционные методы химиотерапии опухолей не позволяли до последнего времени достигать хоть какой-то специфичности цитотоксического действия применяемых препаратов. В предыдущих экспериментах нами

было изучено влияние потенциального противоопухолевого препарата этил 2-(хиназолин-4-ил-амино)-4,5,6,7-тетрагидробензо[b]тиофен-3-карбоксилат гидрохлорида (ЕХТК) на составляющие хроматина, процессы фрагментации ДНК, состояние антиоксидантной системы в клетках карциномы Герена и неизмененных тканях матки и выявлена специфичность его влияния на исследуемые показатели. Это обусловило актуальность дальнейшего выяснения, является ли эта специфичность ЕХТК характерной только для ткани матки, или она распространяется и на другие ткани организма.

Цель исследования – изучить влияние ЕХТК на ДНК, РНК, белки хроматина, процессы фрагментации ДНК и показатели состояния антиоксидантной системы в клетках саркомы 45 и неизмененных тканях кожи крыс. Животные были разделены на 3 группы по 6 животных в каждой: 1 – интактные крысы; 2 – отрицательный контроль (саркома 45); 3 – саркома 45 + ЕХТК (24,37 мг / кг).

Изучение влияния ЕХТК на ДНК, РНК, белки хроматина, процессы фрагментации ДНК, содержание небелковых и связанных с белками SH-групп в саркоме 45 и неизмененных тканях кожи показало, что данное соединение приводило к достоверному изменению большинства исследуемых показателей как по сравнению с интактными животными, так и с саркомой 45 без лечения. Специфичность влияния ЕХТК на клетки опухоли была наиболее выражена относительно изменений содержания фрагментов ДНК, РНК, белков хроматина, а также небелковых и связанных с белками SH-групп. Сравнение влияния ЕХТК на саркому 45 и карциному Герена показало, что нормализующее влияние данного производного хиназолина на все исследованные показатели было более выраженным на модели саркомы 45, чем в карциноме Герена.

Ключевые слова: производное хиназолина, саркома 45, ДНК, РНК, фрагментация, антиоксидантная система

L. B. Bondarenko, T. A. Karatsuba, O. O. Khavich, G. M. Shayakhmetova, N. I. Sharykina, V. M. Kovalenko, O. I. Kharchenko, N. M. Serhiichuk, M. M. Kalachinska

The effect of ethyl 2-(quinazolin-4-yl-amino)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophene-3-carboxylate hydrochloride on DNA, RNA, chromatin proteins and contents of non protein and protein-bounded SH-groups in rats' sarcoma 45 and unchanged skin tissues

Taking into account the individual characteristics of organisms gives possibility to obtain qualitatively better levels of treatment even at severe pathologies. Unfortunately, until recent years traditional methods of tumors chemotherapy did not allow to achieve any specificity of used drugs cytotoxic effect. In previous experiments, we studied the influence of the antitumor compound ethyl 2-(quinazolin-4-yl-amino)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophene-3-carboxylate hydrochloride (EQTC) on chromatin constituents, DNA fragmentation processes, the state of the antioxidant system in Guerin's carcinoma cells and unchanged uterine tissues, and the specificity of its effect on the studied parameters was revealed. This led to the relevance of further clarification whether this specificity of EQTC was characteristic only for uterine tissue, or whether it extended to other tissues of the body.

Objective – to study the effect of EQTC on DNA, RNA, chromatin proteins, DNA fragmentation processes, and antioxidant system indices in rat sarcoma cells 45 and unchanged skin tissues.

Animals were divided into 3 groups of 6 animals each: 1 – intact rats; 2 – negative control (sarcoma 45); 3 – sarcoma 45 + EQTC (24,37 mg/kg).

Study of the effect of EQTC on DNA, RNA, chromatin proteins, DNA fragmentation processes, non-protein and protein-bound SH-groups in sarcoma 45 and unchanged skin tissues showed that this compound significantly changed the majority of the studied parameters both in comparison with intact animals and with sarcoma 45 without treatment. The specificity of the effect of EQTC on tumor cells was most pronounced with respect to changes in the contents of DNA fragments, RNA, chromatin proteins, as well as non-protein and protein bound SH groups. Comparison of the effect of EQTC on sarcoma 45 and Guerin's carcinoma showed that the normalizing effect of this quinazoline derivative on all studied parameters was more pronounced at the sarcoma 45 model than in Guerin's carcinoma.

Key words: quinazoline derivative, sarcoma 45, DNA, RNA, fragmentation, antioxidant system

Надійшла: 13 лютого 2020 р.

Прийнята до друку: 22 квітня 2020 р.

Контактна особа: Бондаренко Л. Б., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 42 56.