

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АЛКИЛИРУЮЩЕГО КАНЦЕРОЛИТИКА НА НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДНК ОПУХОЛЕНОСЯЩИХ КРЫС

В. М. АСЛАНЯН, А. А. АХРЕМ, П. П. ЯСЕМ, Ю. С. БАБАЯН, Д. Ю. ЛАНДО,
 С. Г. АРУТЮНЯН, Дж. В. ГАРИБЯН, Г. М. СТЕПАНЯН

Исследовалось влияние противоопухолевого алкилирующего препарата из группы диэтиленимидов алкоксибензил пиримидин амидофосфорных кислот на уровень метилирования и профиль кривых плавления ДНК из тканей здоровых, опухоленосящих животных и из опухоли. Обнаружены различия в степени метилирования и форме кривых плавления ДНК опухоли и тканей здоровых и опухоленосящих животных. Показано, что канцеролитик, не нарушая спиральной структуры ДНК здоровых животных, оказывает дестабилизирующее влияние на ДНК опухоленосящих животных и опухоли. Обнаружено понижение уровня метилирования опухолевой ДНК и ДНК из тканей опухоленосящих животных в процессе воздействия канцеролитика.

Сравнительное изучение нормальных и опухолевых клеток имеет исключительно важное значение для понимания природы злокачественного роста и механизма его подавления противоопухолевыми соединениями. Большой интерес представляют различия в структуре ДНК опухолевых и нормальных клеток, а также ее изменения под действием различных канцеролитиков.

В связи с этим в настоящей работе рассматривается действие *in vivo* активного канцеролитика, синтезированного в ИТОХ АН АрмССР из группы диэтиленимидов алкоксибензил пиримидин амидофосфорных кислот [3], на ДНК из семенников, селезенки и печени здоровых крыс, из тканей опухоленосящих крыс и опухолевой ткани. Соединения этого типа могут ковалентно сшивать нити ДНК, причем количество повреждений коррелирует со степенью метилирования [5].

Материал и методика. Для изучения влияния активного канцеролитика на содержание 5-метилцитозина (5МЦ) в ДНК печени, селезенки, семенников и опухолевой ткани в процессе опухолевого роста использовались здоровые и с трансплантированной саркомой 45 белые беспородные крысы массой 100—120 г. Тридцати здоровым крысам ежедневно внутривенно вводили активный канцеролитик в оптимальной терапевтической дозе 60 мг/кг, в виде суспензии, приготовленной *ex tempore* на 0,5-процентном растворе карбоксиметилцеллюлозы. Через сутки после четырех инъекций 15 животных забивали декапитацией. Вторую группу животных (15 крыс) забивали через сутки после восьми инъекций. Одновременно в те же сроки забивали контрольных животных, не получивших препарат. Извлеченные после забоя животных органы и ткани замораживали и выделяли ДНК [8]. Белок определяли по методу Лоури [6], а РНК—спектрофотометрически [4]. Количество белка и РНК препаратов не

превышало 0,5%. Для определения нуклеотидного состава ДНК, включая 5 МЦ, препараты высушивали при 105° и гидролизовали до оснований. Основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге. Разделенные основания определяли спектрофотометрически [12]. На 5-е сутки после трансплантации саркомы 45 животных разделяли на подопытную и контрольную группы. Подопытным крысам ежедневно внутрибрюшинно вводили активный канцеролитик в дозе 60 мг/кг и забивали декапитацией, первую группу после 4-х, а вторую группу после 8-ми инъекций. Контрольные животные за этот период лечения не получали. Из извлеченных после забоя животных органов и тканей выделяли ДНК описанным методом.

Плавление ДНК проводили в буфере 0,1 SSC (1SSC=0,15 М NaCl+0,015 М цитрат натрия, pH 7,3). Ионная сила $[Na^+] = 0,0195$. Кривые плавления получены на спектрофотометре UNICAM SP-8000 с плотно закрывающимися 1-сантиметровыми кварцевыми кюветами при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК со скоростью 0,25°/мин. Точность определения температуры: 0,05°. Гиперхромность для всех препаратов ДНК составляла 36—37%, что характерно для нативных ДНК.

Кривые плавления каждого образца снимались 5—7 раз. Из каждой кривой вычислялись нужные характеристики ДНК, которые потом усреднялись. Поскольку на кривых плавления структурные особенности ДНК проявляются слабо, был осуществлен переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП). Во избежание случайных ошибок исходная кривая плавления нормировалась и несколько раз сглаживалась многократном третьем порядке, проведенным через пять точек наименьших квадратов. При этом нас интересовал общий характер ДКП (начало плавления, место нахождения плеч и пиков).

Результаты и обсуждение. Сравнительное изучение ДНК из тканей здоровых, опухолепоясших животных и из опухолевой ткани показывает, что по нуклеотидному составу они не отличаются и соответствуют правилам Чаргаффа. Различие между ДНК здоровых и опухолепоясших животных обнаруживается по содержанию 5 МЦ. В ДНК из тканей всех исследованных органов опухолепоясших животных и самой опухоли уровень метилирования на 5-е и 8-е сутки после перевивки саркомы 45 значительно повышен (таблица). Однако через 15 суток после перевивки содержание 5 МЦ в ДНК из тканей опухолепоясших животных снижается до исходного уровня. В ДНК опухоли оно также существенно ниже, чем на 5-е и 8-е сутки, но все же выше исходного уровня.

Кривые плавления ДНК из тканей здоровых животных и опухолевой ткани заметно различаются. Особенно характерным является появление плеча в низкотемпературной части кривой плавления опухолевой ДНК (рис. 3). Различия в кривых плавления ДНК из тканей опухолепоясших животных и здоровых менее значительны.

При введении канцеролитика здоровым животным наблюдается увеличение степени метилирования ДНК в органах по сравнению с ДНК из тканей животных, не подвергавшихся химиотерапевтическому воздействию. На кривые плавления ДНК из тканей здоровых животных канцеролитик существенного влияния не оказывает (рис. 1).

В отличие от ДНК из тканей здоровых животных у опухолепоясших животных происходит понижение уровня метилирования при введении канцеролитика (таблица), что, по всей вероятности, объясняется разной CH_3 -акцепторной способностью ДНК из разных органов при метилиро-

Временная зависимость процентного содержания 5 МЦ в ДНК различных органов и опухолей животных, получивших и не получивших алкилирующий противоопухолевый препарат

Время после перививки опухоли (С-45)	Здоровые животные, получившие препарат	Опухоленосящие животные, не получившие препарат	Опухоленосящие животные, получившие препарат
Печень			
5	—	1,39	—
8	1,22	1,71	1,27
15	1,29	1,07	0,83
Селезенка			
5	—	1,60	—
8	1,27	1,71	1,02
15	1,46	1,25	1,11
Семенники			
5	—	1,23	—
8	1,18	1,66	1,53
15	1,33	1,01	0,88
Опухоль			
5	—	1,68	—
8	—	1,93	1,10
15	—	1,35	0,98

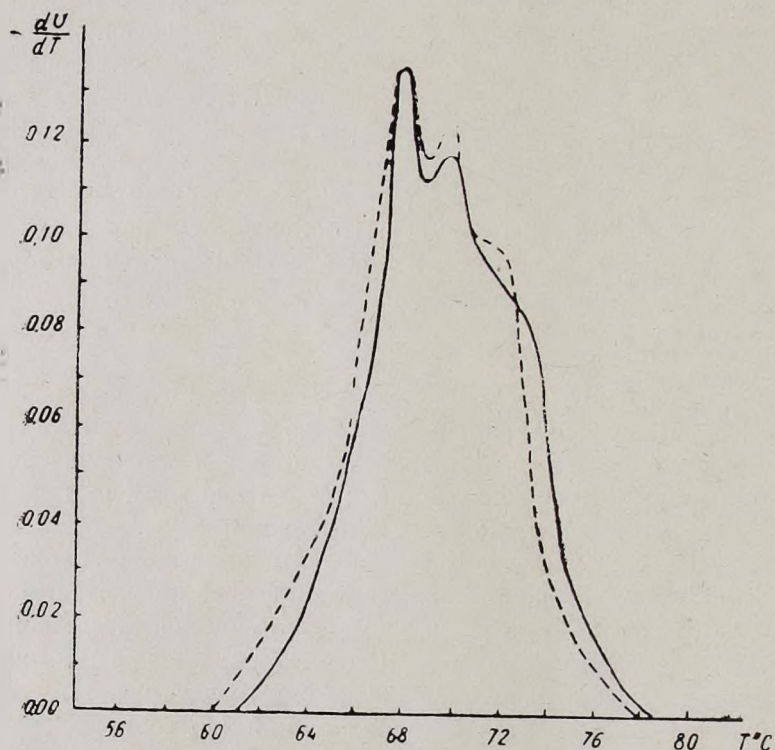


Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления ДНК из органов здоровых животных (—) и здоровых животных, получивших канцеролитик (---). v —степень спиральности.

вании [9]. Причем в ДНК из печени, селезенки и опухоли на 8-е сутки уровень метилирования почти приближается к норме. Выше нормы он в семенниках, хотя и здесь значительно понижен (таблица). Таким образом, после нескольких инъекций активного канцеролитика наступает обратимое изменение метилирования генома (содержание 5 МЦ в изученных органах приближается к норме), что, по-видимому, происходит путем энзиматического деметилирования (активацией деметилаз под действием алкилирующего препарата).

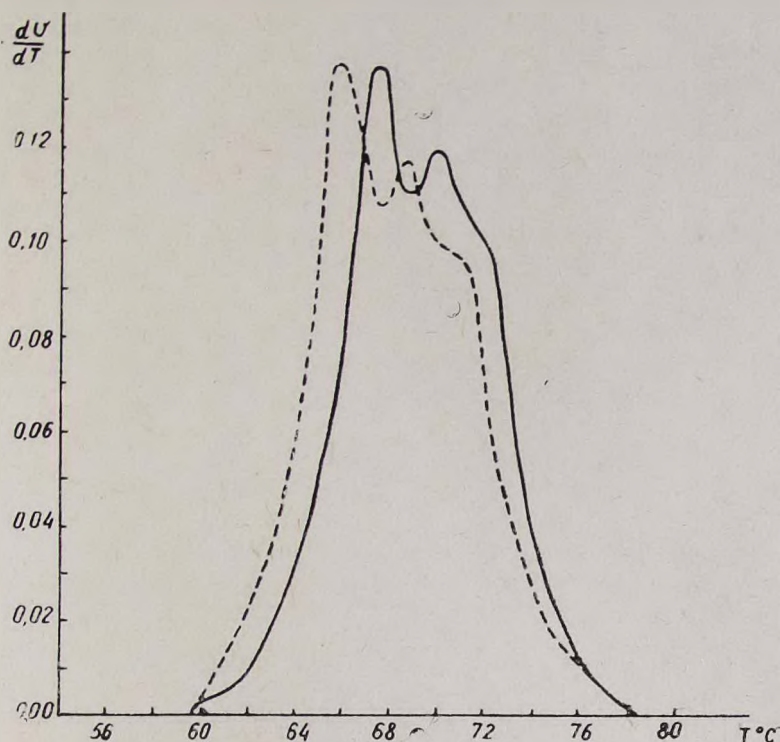


Рис. 2. Дифференциальные кривые плавления ДНК из органов больных животных, получивших (—) и не получивших (----) канцеролитик. U —степень спиральности.

Сильное влияние оказывает канцеролитик на кривую плавления опухолевой ДНК. Во-первых, исчезает характерное для нее низкотемпературное плечо, и кривая плавления принимает форму, свойственную ДНК из интактных тканей; во-вторых, происходит смещение всей кривой в область низких температур (рис. 3). Аналогичная картина отмечается в ДНК из тканей опухоленосящих животных (рис. 2). Еще раз отметим, что подобного смещения кривых плавления ДНК у здоровых животных не наблюдается (рис. 1).

Таким образом, полученные данные показывают, что канцеролитик, не влияя на термостабильность ДНК здоровых животных, оказывает дестабилизирующее воздействие на ДНК из тканей опухоленосящих животных и опухоли.

На основании представленных данных можно предложить следующий механизм действия канцеролитика на ДНК опухолевых тканей.

В опухолевой ДНК имеются характерные для нее протяженные дестабилизированные участки (дефекты), при плавлении которых на кривой возникает низкотемпературное плечо (рис. 3). Эти участки имеют

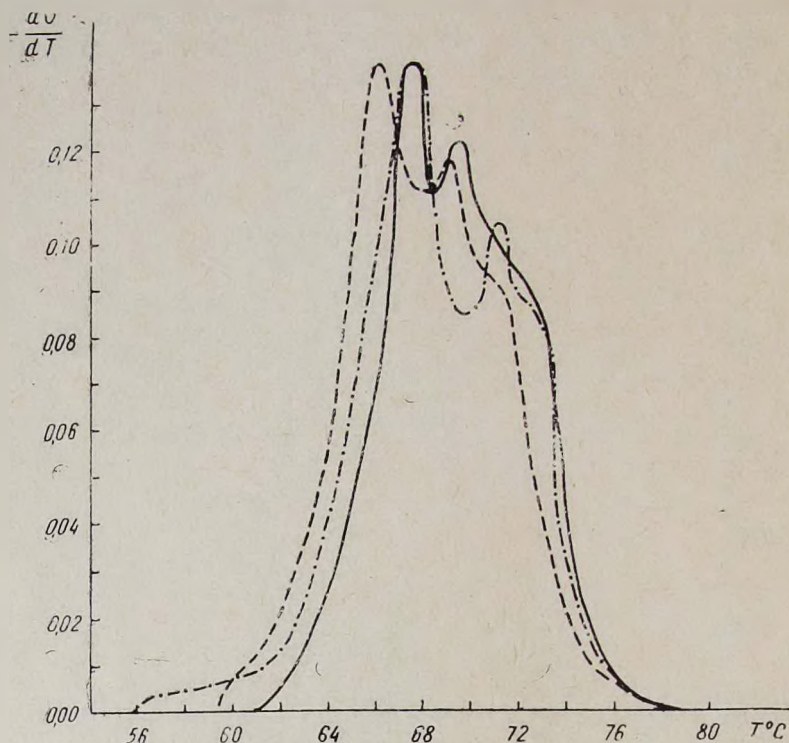


Рис. 3. Дифференциальные кривые плавления ДНК из тканей здоровых животных (---) и из опухоли животных, получивших (— · —) и не получивших (— · —) канцеролитик. v — степень спиральности.

длину как минимум в несколько десятков пар оснований. Такой вывод можно сделать на основании ранее полученных данных [1, 2], согласно которым более короткие участки с измененной структурой не могут обусловить появление плеча на дифференциальной кривой плавления. Известно также, что алкилирующие препараты разрывают, а затем сшивают цепи макромолекул ДНК [7, 10]. Данные настоящей работы показывают, что рассматриваемый канцеролитик, видимо, разрывает цепи на дефектных участках опухолевой ДНК (по-видимому, 5 МЦ обогащенных), о чем свидетельствует исчезновение на кривой плавления плеча, характерного для опухолевой ДНК, и изменение количества 5 МЦ (таблица, рис. 3). После выпадения дефектных участков происходит сшивка, на месте которой, однако, структура ДНК нарушена, на что указывает смещение кривой плавления опухолевой ДНК в область низких температур и снижение температуры плавления на $0,5-1,0^\circ$, т. е.

при воздействии канцеролитика один вид дефектов (онкологических) заменяется другим (нарушение структуры ДНК на месте сшивки).

Отметим, что дефектные участки на месте сшивки в отличие от участков, характерных для опухолевых ДНК, имеют небольшую длину. Это следует из указанных выше работ [1, 2], в которых показано, что короткие участки (меньше нескольких десятков пар оснований) не проявляются на кривых плавления в виде отдельного пика или плеча, а вызывают равномерное смещение всей кривой. Как видно из рис. 3, именно этот эффект равномерного смещения кривой плавления опухолевой ДНК имеет место в присутствии канцеролитика.

Таким образом, можно предположить, что снижение уровня метилирования и частичное восстановление структурных характеристик (судя по ДКП) опухолевых ДНК под влиянием алкилирующего препарата могут быть обусловлены канцеролитической активностью препарата.

Ереванский государственный университет,
кафедра молекулярной физики и биофизики,
ИТОХ АН АрмССР, ИБОХ АН БССР

Поступило 5.X 1979 г.

**ԱԼԿԻԼԱՅՆՈՂ ԿԱՆՑԵՐՈԼԻՏԻԿ ՄԻԱՑՈՒԹՅԱՆ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՌԻՍԻՆԴԵՐՄԱՍԻՐՈՒՄԸ ՌԻՌՈՒՑՔԱԿԻՐ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԴՆԹ-Ի ՈՐՈՇ
ԲՆՈՒԹԱԳԻՉՆԵՐԻ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՎՐԱ**

Վ. Մ. ՍՍԼԱՆՅԱՆ, Ա. Ա. ԱՆՐԵՄ, Պ. Պ. ՏԱՍԵՄ, ՅՈՒ. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ,
Ի. ՅՈՒ. ԼԱՆԿՈ, Ս. Գ. ՀԵՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Զ. Վ. ՂԱՐԻՑՅԱՆ, Հ. Մ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

Ընտրամասիրվել է օրգանիզմ ներարկված ալկոքսիբենզիլպիրիմիդիլ ամի-
դոֆոսֆորական թթուների դիէթիլենիմիդների խմբին պատկանող հակառուց-
քային պրեպարատի ազդեցությունը առողջ և ուռուցքակիր (սարկոմա 45)
առնետների հյուսվածքներից անջատված ԴՆԹ-ի մեթիլացման մակարդակի
և հաժման կորերի պրոֆիլի վրա: Տարբերություններ են նկատվել այդ
ԴՆԹ-ների մեթիլացման մակարդակի և հաժման կորերում: Ցույց է տրվում,
որ կանցերոլիտիկը չխախտելով առողջ կենդանու ԴՆԹ-ի զսպանակային կա-
ռուցվածքը, դեպտաբիլիզացնող ազդեցություն է թողնում ուռուցքակիր կեն-
դանու ուռուցքից և օրգաններից անջատված ԴՆԹ-ների վրա: Ընդ որում,
ուռուցքային ԴՆԹ-ի հաժման կորի վրա անհետանում են նրա բնութագրի-
չորահատկությունները և կորի տեսքով այն մոտենում է առողջ կենդանու
ԴՆԹ-ի հաժման կորին: Կանցերոլիտիկ միացության ազդեցության հետե-
վանքով նկատվել է ուռուցքակիր կենդանիների օրգաններից և ուռուցքից
անջատված ԴՆԹ-ների մեթիլացման աստիճանի նվազում:

INVESTIGATION OF ALKYLIZING CANCEROLYTIC INFLUENCE ON SOME CHARACTERISTICS OF DNA FROM TUMOR-CARRYING RATS

V. M. ASLANIAN, A. A. ACHREM, P. P. YASEM, U. S. BABAIAN,
D. U. LANDO, S. G. HARUTYUNIAN, G. V. GHARIBIAN, G. M. STEPANIAN

The influence of inserted into organism alkylizing antitumoral preparation from the group of diethylenimide alkoxibenzyl pyrimidin of amidophosphoric acid on the methylation level and on the profile of melting curves of DNA from tissues of healthy, tumor-carrying (with sarcoma 45) animals and from tumor is investigated. The differences in the degree of methylation and melting curve form of tumoral DNA and DNA of healthy and tumor-carrying animals are found out. It's shown, that the cancerolytic not disturbing the coiled structure of DNA from healthy animals has a destabilizing influence on DNA of tumor-carrying animals and tumoral DNA. Lowering the methylation level of tumoral DNA and DNA from tissues of tumor-carrying animals in the process of cancerolytic influence is found out.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ахрем А. А., Ландо Д. Ю., Крот В. И., Андрианов В. Т. Мол. биол., 11, 555, 1977.
2. Ахрем А. А., Ландо Д. Ю., Андрианов В. Т. Мол. биол., 11, 1065, 1977.
3. Крамер М. С., Саакян А. Г., Степанян Г. М., Ароян А. А. Арм. хим. журн., 39, 9, 752—755, 1977.
4. Спирин А. С. Биохимия, 23, 656, 1958.
5. Brambilla G., Cavana M., Parodi S., Sciaba L., Pino A., Robiano L. Int. J. Cancer., 22, 2, 174—180, 1978.
6. Lowery O. H., Rosenbrough H. J. et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
7. Lown J., William J., McLaughlin Larry W., Chang Van Min. Bioorg. Chem., 7, 1, 97—110, 1978.
8. Marmur J. J. Mol. Biol., 3, 208, 1961.
9. Morgan W. W., Cameron J. L. Cancer. Res., 33, 441, 1973.
10. Nakamura T., Sasada M., Tatsumi K. Acta Haematol. Jap., 40, 6, 1131—1144, 1977.
11. Phulmann H. W., Gercharch H. Z. Rirbsfarseh und Klin. Onkol., 33, 177, 1978.
12. Vanyushin B. F., Masin A. L. et al. BBA, 299, 397, 1973.