

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ДНК ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ

Л.Э. НЕРСЕСЯН, Д.В. ГАРИБЯН, И.С. ДАНИЕЛЯН, А.С. АГАРОНЯН,
Г.М. СТЕПАНЯН, Б.Т. ГАРИБДЖАНИЯН

Институт тонкой органической химии РА, 375014, Ереван

Путем изучения реакции метилирования ДНК и фибринолитической активности крови нами установлено, что комплексное использование доксорубина, диазепама и соединения 346 предотвращает (или уменьшает) стрессовые повреждения ДНК опухолевых клеток, сокращает дозу использования антибиотика (доксорубина) и снижает его токсичность.

ԴՆԹ-ի մեթիլացման ռեակցիայի և արյան ֆիբրինոլիտիկ ակտիվության ուսումնասիրմամբ հաստատվել է, որ դոքսորուբինի, դիազեպամի և 346 միացության համալիր օգտագործումը կանխարգելում է (կամ նվազեցնում) չարորակ ուռուցքների բջիջների ԴՆԹ-ի սթրեսային ներգործությունը, կրճատում է հակաբիոտիկի (դոքսորուբին) կիրառման դոզան և քչացնում նրա տոքսիկությունը:

By the study of DNA methylation reaction and blood fibrinolytic activity it has been established that the complex usage of doxorubicin, diazepam and compound 346 prevent (or decrease) stress damage of DNA in cancer cells, reduce using dosage of antibiotic (doxorubicin) and decrease its toxicity.

Диазепам - соединение 346 - 5-метилцитозин - доксорубин - фибринолитическая активность

В последнее десятилетие, в связи с прогрессирующим нарастанием заболеваемости злокачественными опухолями, коррелирующим с ростом остроконфликтных стрессорных ситуаций, окружающих человека, возрос интерес к проблеме влияния стресса на опухолевый процесс. Рассматривается также возможность повышения эффективности лечения злокачественных опухолей комплексным применением химиопрепаратов [14, 13, 15] и антистрессорных фармакологических средств [7, 11, 12]. И сама опухоль может вызвать сильный стресс у пациентов [10]. При этом выраженность стрессорной реакции зависит от дозы и режима применения цитостатиков [2]. Известно влияние стрессорных реакций на синтез ДНК, РНК и белка для аппаратов транскрипции и трансляции [5]. При этом особый интерес представляют исследования, направленные на изучение структуры ДНК, составляющей молекулярную основу генома. В связи со сказанным, задачей настоящего исследования была попытка при помощи фармакологической коррекции ограничить стрессорные реакции и предотвратить стрессорные повреждения в ДНК опухолевых клеток, изучая при этом реакцию метилирования ДНК при сочетанном воздействии химиопрепарата (противоопухолевого антибиотика) и антистрессорных фармакологических средств, а также связь между уровнем метилирования и подавлением роста опухоли указанными препаратами.

Материал и методика. Опыты проведены на крысах-самцах линии "Вистар" массой 100-120г, интактных (без опухоли) и с перевиваемой саркомой 45. Животным перевивали С-45 в асептических условиях методом Чернова [9] путем подкожного введения взвеси измельченной опухолевой ткани в 0,85%-ном растворе NaCl, содержащем 5×10^4 клеток. Скорость роста опухолей регистрировали путем ежедневного измерения их объема, а также взвешивания удаленных опухолей у забитых животных. Препараты вводили внутривентриально, начиная с пятого дня перевивки опухоли, разделив животных на 6 подопытных и одну контрольную группы по 8 крыс в каждой группе. Антистрессорные препараты диазепам и соединение 346* вводили за сутки до введения цитостатика, непосредственно перед введением и в последующие двое суток – всего 4 инъекции. Диазепам - в дозе 4 мг/кг, соединение 346 - в дозе 5 мг/кг. Противоопухолевый антибиотик доксорубицин вводили в дозе 2,5 мг/кг. При совместном применении антибиотика и антистрессорных препаратов доксорубицин вводили через день (4 инъекции, половина общей дозы препарата). На 14-й день опыта всех животных декапитировали. О степени торможения опухолевого роста судили по проценту торможения роста опухоли. Определяли также общетоксическое действие (Кр) препаратов на организм животных. Из извлеченных после декапитации животных тканей (печень, опухоль) выделяли ДНК. В работе использовали метод экстракции ДНК, разработанный Ванюшиным [16] на основе фенольно-хлороформенного метода экстрагирования ДНК в присутствии 1,5% SDS. Гидролиз до азотистых оснований производили в запаянных стеклянных ампулах в 85%-ной муравьиной кислоте при 176° в течение одного часа (0,1мл кислоты на 1мг ДНК). Разделение азотистых оснований производили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на ДЭАЭ-целлюлозе в растворителе н-бутанол: H_2O : NH_3 (60:10:0,1).

* Соединение 346 синтезировано в ИТОХ в лаборатории синтеза психотропных соединений.

Спектрометрию элюатов всех оснований (гуанин, цитозин, 5-метилцитозин, тимин, аденин) производили против элюатов из соответствующих участков хроматограмм [1]. Кроме того, мишенью патологического влияния стресса, в первую очередь, являются кровеносные сосуды, а активация гемостаза может обуславливать стимуляцию опухолевого процесса. Исходя из этого, у всех подопытных животных определяли также фибринолитическую активность крови по методу Тульчинской [8] и концентрацию фибриногена в крови по методу Рутберга [6]. Методы основаны на определении степени лизиса фибрина до и через 24 ч после инкубации в термостате гравиметрическим методом.

Результаты и обсуждение. Из приведенных данных (табл. 1) следует, что четкое различие между образцами ДНК из печени здоровых и опухоленосящих крыс до и после внутривентриального введения изучаемых фармакологических средств обнаруживается только по содержанию 5-метилцитозина (5-МЦ). ДНК из печени опухоленосящих животных, получивших антистрессорные препараты диазепам, соединение 346 и химиопрепарат доксорубицин, метилирована больше, чем ДНК из печени здоровых крыс без фармакологического воздействия. По-видимому, индуцируемое лечебными средствами гиперметилирование в ДНК печени опухоленосящих животных является прямым ответом клеток печени на препараты, особенно в случае антибиотика, поскольку последний относительно токсично. Наблюдаемые нами изменения в уровне метилирования ДНК клеток печени могут быть обусловлены повреждающим действием изучаемых препаратов на структуру ДНК, а затем связанной с ней индукцией репаративного синтеза ДНК, который также сопровождается метилированием. Разница в действии изученных соединений на метилирование ДНК печени здоровых животных, опухоленосителей и опухолевой ткани позволяет также говорить о некоторой избирательности действия этих веществ. Полученные нами результаты показали также (табл. 1), что внутривентриальное введение только

Таблица 1. Нуклеотидный состав ДНК

| Источник ДНК | Содержание оснований в ДНК, мол. % | | | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|------|------|-----------|------|----------|
| | Г | Ц | А | МЦ+ | Т | (Г+Ц+МЦ) |
| Печень(норма) | 21,4 | 20,9 | 28,4 | 1,05±0,02 | 28,4 | 44,3 |
| Опухоленосящие животные | | | | | | |
| Печень | 21,8 | 20,7 | 28,0 | 1,67±0,02 | 28,0 | 44,1 |
| Печень + диазепам | 21,1 | 20,8 | 28,5 | 1,35±0,02 | 28,5 | 43,2 |
| Печень + соединение 346 | 21,3 | 20,8 | 28,3 | 1,31±0,02 | 28,3 | 43,4 |
| Печень + диазепам + доксорубин | 21,8 | 20,4 | 28,2 | 1,49±0,01 | 28,2 | 43,6 |
| Печень + соед.346 + доксорубин | 21,3 | 20,9 | 28,3 | 1,46±0,01 | 28,3 | 43,6 |
| Печень + доксорубин | 21,7 | 20,9 | 28,0 | 1,80±0,02 | 28,0 | 44,4 |
| Опухоль (С-45) | 21,5 | 20,4 | 28,4 | 1,54±0,02 | 28,2 | 43,4 |
| Опухоль + диазепам | 21,9 | 20,8 | 28,0 | 1,55±0,02 | 28,0 | 44,2 |
| Опухоль + соед. 346 | 21,4 | 20,3 | 28,4 | 1,50±0,02 | 28,4 | 43,2 |
| Опухоль+диазепам+ доксорубин | 21,9 | 20,4 | 28,2 | 1,36±0,02 | 28,2 | 43,6 |
| Опухоль+соед.346 + доксорубин | 21,4 | 20,2 | 28,6 | 1,23±0,02 | 28,6 | 42,8 |
| Опухоль+доксорубин | 21,9 | 20,6 | 28,5 | 0,54±0,02 | 28,5 | 43,0 |

Примечание: В каждой группе - 8 животных. Число определений - 11. Проведенные изменения статистически достоверны ($p < 0,005$) по сравнению с контролем (печень, опухоль) Г-гуанин, Ц-цитозин, А-аденин, Т-тимин; 5-МЦ-метилцитозин.

диазепама или соединения 346 не вызывает изменения уровня метилирования ДНК в опухолевой ткани. Доксорубин резко подавляет содержание 5-МЦ в ДНК опухоли. Сочетанное применение этих антистрессорных препаратов с доксорубином (используя пониженные дозы противоопухолевого антибиотика—4 инъекции, введение через день) ингибируют метилирование ДНК в опухолевой ткани (С-45) в 2,5 раза, но меньше, более щадяще, чем только доксорубин. Подавление уровня метилирования при комплексном лечении животных можно объяснить следующим образом: во-первых, энзиматическим деметилированием остатков 5-МЦ (активацией деметилаз или инактивацией метилаз под действием изучаемых соединений); во-вторых, противоопухолевые антибиотики вызывают глубокое торможение синтеза ДНК за счет внедрения (интеркаляция) между основаниями двойной спирали ДНК, блокируя ДНК-матрицу и препятствуя нормальному функционированию ферментов, в частности ДНК-метилов [3], вследствие чего нарушаются многие процессы в клетке, что может привести к ее гибели. Кроме того, на наш взгляд, здесь накладывается эффект от применения антистрессорных средств, поскольку, применяя их накануне введения цитостатика, мы снижали активацию стрессреализующих механизмов в ответ на токсическое действие химиопрепарата, так как стрессорные реакции, которые могут при этом возникнуть, подавляют неспецифическую противоопухолевую резистентность организма [4]. Следовательно, исходя из наших данных, можно

предположить, что метилирование ДНК обеспечивает один из механизмов устойчивого изменения локальной структуры гена и, таким образом, участвует в регуляции генной активности в животных клетках, т. е. метилирование цитозиновых остатков в ДНК является механизмом генетического контроля в клетке и степень метилирования ДНК может быть показателем воздействия изучаемых соединений (препаратов) на структуру ДНК опухолевых клеток.

Таким образом, нами была предпринята попытка с помощью антистрессорных воздействий повлиять на эффективность лечения цитостатиком. Кроме того, в настоящей работе также показаны (табл. 2) результаты, характеризующие свертывающую систему крови до и после лечения у всех групп подопытных животных. Как видно из таблицы 2, у контрольных крыс с опухолью (С-45) достоверно понижается фибринолитическая активность крови в 2,2 раза по сравнению с интактными животными. При введении антистрессорных препаратов диазепам и антибиотика отдельно не наблюдается никаких изменений фибринолитической активности в крови, хотя соединение 346 отдельно у здоровых животных несколько повышает фибринолитическую активность по сравнению с опухоленосщими животными. При сочетанном действии диазепама, соединения 346 с антибиотиком повышается фибринолитическая активность в крови 2-2,3 раза соответственно, при этом у этих животных концентрация фибриногена почти в 2 раза понижается. Следует отметить, что соединение 346 как при раздельном, так и при сочетанном применении с антибиотиком более эффективно. Результаты биохимических исследований коррелируют с противоопухолевой активностью исследуемых соединений. Доксорубин вызывает торможение роста опухоли на 51%, при этом оказывая сильное общетоксическое действие на организм животных ($K_p = -20,4\%$). Соединение 346 и диазепам, раздельно не проявляя достоверную противоопухолевую активность, почти не вызывают общетоксическое действие. При сочетанном применении диазепама и соединения 346 с доксорубином, используя половину суммарных доз исследуемых соединений (4 инъекции), можно сохранить терапевтическую эффективность антибиотика ($T\% = 47-48$), при этом значительно снижая его общетоксическое действие ($K_p = -5,6-6,2\%$).

Таблица 2. Фибринолитическая активность и концентрация фибриногена в крови

| Условия опыта | Интактные животные (контроль) | Опухоль (С-45) | Опухоль+ доксорубин | Опухоль+ диазепам | Опухоль+ соед. 346 | Опухоль+ диазепам+ доксорубин | Опухоль+ соед. 346+ доксорубин |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Концентрация фибриногена, мг% | 188±11,0 | 202±9,0 | 162±13 | 151±21 | 195±11 | 114±21,6 p<0,05 | 108±12,0 p<0,02 |
| Фибринолитическая активность, % | 18±1,0 | 8±1,2 p<0,02 | 10±2,0 | 13±3,2 | 15±2,0 p<0,05 | 16±2,3 p<0,05 | 18±3,0 p<0,05 |

Таким образом, с помощью диазепама и соединения 346 удалось увеличить противоопухолевую эффективность доксорубина (половина дозы,

4 инъекции) за счет уменьшения его токсического эффекта в результате деметилирования ДНК и частичного восстановления некоторых структурных характеристик ДНК опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев В.К., Гарибян Д.В., Захарян Р.А. и др. ДАН СССР, 205, 3, 721-723, 1972.
2. Гарибджанян Б.Т., Суджян А.В. В кн.: Рак и метаболизм. Ереван, "Гитутюн", 154 с, 1998.
3. Дедерер Л.Ю., Рогова О.М. Химиотерапия опухолей в СССР, 30, 73-77, 1987.
4. Кн.: Нервная система и противоопухолевая защита (Под ред. К.П.Балицкого). Киев., Наук. Думка, 256с, 1983.
5. Комиссаренко В.П., Тронько Н.Д., Минченко А.Г. Физиол.ж., 28, 6, 721-733, 1982.
6. Рутберг Р.А. Лабор. дело. 6-7, 1996.
7. Старкова Н.Т. Вест. АМН СССР. 207, 1980.
8. Тульчинская М.Сб. Лабораторные методы клинических исследований. Варшава. 744 с, 1965.
9. Чернов В.А. Кн.: Методы эксперим. химиотерапии. М., Медицина, 357-403, 1971.
10. Шапом В.С., Шелепов В.П. Арх. патологии. 45, 8, 3-12, 1983.
11. Baltrusch H.J. Acad. Press, London, 1307-1318, 1979.
12. Cooper C.L. J. Human Stress, 4-11, 1984.
13. Fox B.H. Psychosoc. Oncol. 1, 1, 17-33, 1983.
14. Funch D.P., Marshall J.J. Psychosom. Res. 27, 1, 77-83, 1983.
15. Simonton O.C., Simonton S.M. Med. J. Aust. 1, 679-683, 1981.
16. Vanyushin B.F., Masin A.H., Vasiliev V.K. et al. Biochim. et Biophys. acta. 299, 397, 1983.

Поступила 10.X.2002