

УДК 547.963.32

БИОХИМИЯ

Дж. В. Гарибян, Г. М. Степанян, И. С. Даниелян,
Ю. С. Бабаян, Б. Т. Гарибджанян, В. М. Асланян

Влияние дексаметазона на ДНК опухолевой ткани

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. А. Галояном 3/III 1982)

К основным признакам, отличающим злокачественно трансформированные клетки от нормальных, относят их дедифференцировку или измененную способность к дифференцировке (^{1,2}). А ведущими регуляторами роста и деления клеток в организме служат, как известно, гормоны, причем они способны стимулировать (или подавлять—в зависимости от концентрации) рост и размножение клеток, усиливать противоопухолевый эффект цитостатиков, а также индуцировать процессы опухолеобразования у животных (^{3,4}). Изменение уровня метилирования ДНК в онтогенезе, выраженные тканевые различия в содержании 5-метилцитозина в ДНК, резкое возрастание минорного основания при опухолеродной трансформации, а также гормональная пост-репликативная индукция (^{1,5-7}) у животных указывают на участие метилирования в клеточной дифференцировке.

Исходя из вышеизложенного мы задались целью выяснить: имеются ли отличия в нуклеотидном составе ДНК двух экспериментальных опухолей, характеризующихся разными морфологическими и биологическими свойствами (карциносаркома Уокера 256, саркома 45) и влияет ли глюкокортикоид дексаметазона на рост, а также на первичную и вторичную структуру ДНК изучаемых штаммов опухолей.

В работе использовали белых беспородных крыс-самцов с начальной массой 90—100 г, которым перевивали вышеуказанные экспериментальные опухоли в асептических условиях стандартными методами путем подкожного введения крысам 5×10^6 клеток. Скорость роста опухолей регистрировали путем ежедневного измерения их объема, а также взвешивания удаленных опухолей у забитых животных. Суспензию дексаметазона, приготовленную на 0,9% NaCl, содержащем твин-80—0,4%, карбоксиметилцеллюлозу—0,5%, бензилалкоголь—0,5%, вводили крысам внутрибрюшинно, начиная с 5-х суток после перевивки опухолей из расчета 25 мкг на 100 г веса животного (всего 8 инъекций). Животных забивали на пятнадцатые сутки после перевивки опухолей. Препараты ДНК выделяли по модифицированному методу Мармура (⁸). Основания разделяли с помощью двукратной восходящей хроматографии на бумаге в системе (бутанол—вода—аммиак 60 : 10 : 0,1) и определяли их количества спектрофотометрически (⁹).

Плавление ДНК проводили по известной методике (¹⁰). Кривые плавления получены на спектрофотометре Unicam-SP-8000 (Англия). Кроме того, был осуществлен также переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП). Для расчетов использовали ЭВМ ЕС-1022 и ЕС-1030.

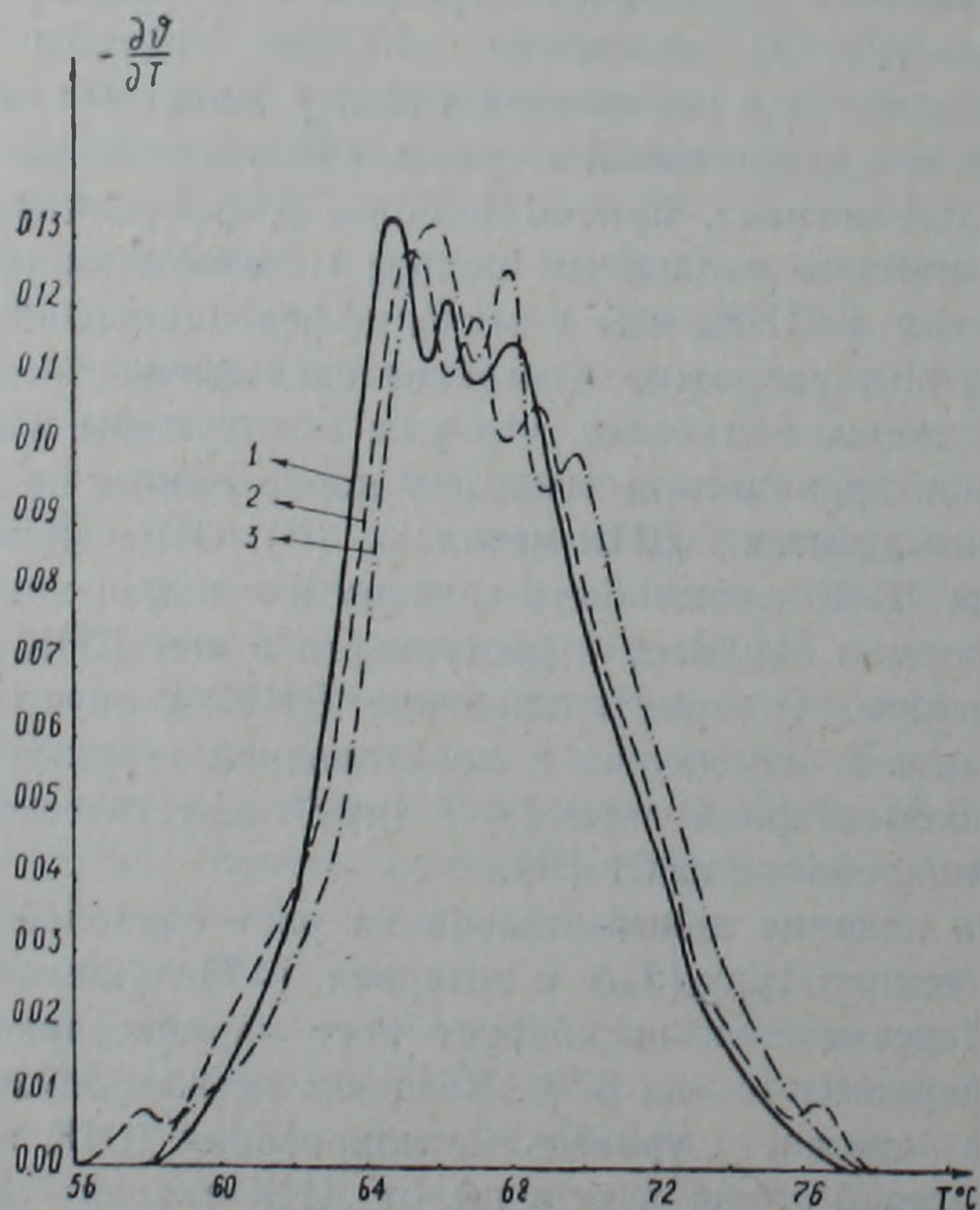
В таблице приведены данные по содержанию известных оснований и 5-метилцитозина в ДНК исследованных опухолей. Эти значения являются средними величинами из 5—9 определений для каждого препарата ДНК. Из таблицы видно, что нуклеотидный состав препаратов ДНК соответствует правилам Чаргаффа. Изученные ДНК принадлежат к АТ-типу, количество (Г+Ц+МЦ) в них составляет 44,1—46,0%.

Содержание ГЦ-пар оснований в препаратах ДНК, выделенных из изученных штаммов опухолей, практически одинаково. Четкое различие между образцами ДНК, полученными из исследованных штаммов опухолей, обнаруживается по содержанию 5-метилцитозина. При рассмотрении изменений в уровне метилирования двух штаммов опухолей привлекает внимание тот факт, что опухоль, отличающаяся более высокой степенью дифференцировки (саркома 45), характеризуется большим содержанием 5-метилцитозина. Выявленные нами изменения степени метилирования двух разных экспериментальных штаммов опухолей могут лежать в основе индуцированного искажения клеточной дифференцировки и быть одной из причин трансформации клеток при разных формах опухолей, так как имеются данные, указывающие на связь метилирования с дифференцировкой и функциональной активностью клеток (¹¹). К сожалению, истинные причины возрастания уровня метилирования в опухолевой ткани у животных еще не известны. Не исключено, что, с одной стороны, оно обусловлено повышением активности ДНК-метиلاз, причем в более дифференцированных опухолях с относительно медленным ростом метилазы включают больше метильных групп в ДНК, чем в малодифференцированных опухолях. С другой стороны, возможно изменение специфичности ДНК-метилаз в опухолевой ткани, тем более, что уже обнаружены в ядре лимфоцитов крови при хроническом лейкозе у коров разные по активности и специфическому действию ДНК-метилазы (¹¹). Отмеченное увеличение метилирования ДНК может быть связано и с изменением хроматина при разных формах опухолей и доступности в нем ДНК для соответствующих метилаз. Гиперметилирование ДНК в опухолевой ткани может приводить к изменению и во вторичной структуре, к образованию некомплементарной пары Г—Т (при гипотетическом ферментативном дезаминировании m^5C) (¹²).

Изучалось влияние дексаметазона на рост опухолей, уровень метилирования, температуру (T_m) и интервал (ΔT) плавления исследуемых ДНК. Дексаметазон ингибирует рост карциносаркомы Уокера 256 на 82%, саркомы 45—на 57%. Введение крысам-опухоленосителям дексаметазона снижает уровень метилирования ДНК как в печени, так и в опухолевой ткани в отличие от ДНК тканей здоровых животных, у которых наблюдается увеличение содержания 5-метилцитозина при гормональной индукции (таблица), что, по-видимому, можно объяснить тем, что в составе хроматина животной клетки ДНК

потенциально не дометилированы и они могут быть дометилированы *in vivo* под влиянием гормонов (¹³). Карциносаркома Уокера 256 и саркома 45, имеющие разную степень дифференцировки, реагируют на дексаметазон по-разному. При карциносаркоме Уокера 256 уровень метилирования ДНК снижен в печени меньше ($1,75 \pm 0,015$), чем при саркоме 45 ($1,52 \pm 0,018$), а в самой опухолевой ткани имеется даже повышение степени метилирования под влиянием дексаметазона, что, по-видимому, говорит о чувствительности этого штамма (карциносаркома Уокера 256) к гормонам, так как первоначально опухоль произошла от спонтанно возникшей опухоли молочной железы крысы. Поскольку гормоны проникают в клетку, их влияние на процесс метилирования может быть обусловлен наряду с опосредованным действием также и прямым воздействием на метилазу, ДНК или хроматин, причем, как видно, в гормонозависимых опухолях существует обратная зависимость между уровнем метилирования и угнетением роста опухоли. При саркоме 45 дексаметазон резко ингибирует уровень метилирования ДНК печени и особенно в опухолевой ткани. Таким образом, не исключено, что у животных имеются множественные ДНК-метилазы, обладающие разной активностью и специфичностью действия при разных формах опухолей, и гормоны могут контролировать метилирование ДНК.

Температура (T_m) и интервал (ΔT) плавления исследуемых ДНК



Дифференциальные кривые плавления ДНК: печени (1) здоровых животных, опухоли саркомы 45 (2), карциносаркомы Уокера (3) после воздействия дексаметазона

Нуклеотидный состав ДНК из тканей здоровых и опухолоносящих животных до и после воздействия дексаметазона

Условия опыта	Источник ДНК	Число опреде- лений	Содержание оснований в ДНК, мол. %					
			Г	Ц	А	Т	МЦ	Г+Ц+МЦ
Норма	Печень	6	22,4	20,9	28,1	28,1	1,02±0,022	44,3
Норма: введен дексаметазон	Печень	8	22,5	20,3	27,8	27,5	2,19±0,021	44,9
Животные с КСУ—256	Печень	6	22,5	20,7	28,0	27,9	1,07±0,011	44,2
Животные с КСУ—256:	Опухоль	9	22,9	20,9	28,0	27,8	1,14±0,038	44,9
введен дексаметазон	Печень	6	21,6	20,8	28,2	28,0	1,75±0,015	44,1
	Опухоль	8	22,6	20,9	28,0	27,5	1,49±0,024	44,9
Животные с С—45	Печень	8	22,4	21,0	27,6	27,6	1,39±0,021	44,7
	Опухоль	9	22,9	21,7	28,3	28,8	1,45±0,060	46,0
Животные с С—45:	Печень	5	22,1	20,5	28,1	27,8	1,52±0,018	44,1
введен дексаметазон	Опухоль	7	22,7	21,4	28,3	28,3	1,21±0,024	45,3

Примечание. Различия между средними значениями 5МЦ в идентичных тканях контрольных и опухолоносящих крыс, получивших и не получивших дексаметазон, статистически достоверны ($p < 0,05$).

находятся в интервале $T_m = 66,8 - 67,3^\circ$ и $\Delta T = 6,1 - 6,2^\circ$ соответственно. Заметно отличается интервал плавления для ДНК из карциносаркомы Уокера 256 под действием дексаметазона ($\Delta T = 6,8$), что, по-видимому, указывает на наличие в данной ДНК повышенного количества дефектных участков, содержащих несколько десятков пар оснований.

ДКП исследуемых ДНК состоят из трех хорошо выраженных пиков. Вид ДКП практически одинаков для всех изученных ДНК (рисунков). Как следует из рисунка и таблицы, метилирование приводит к дестабилизации (ДНК сдвигается в сторону низких температур) причем тем сильнее, чем больше содержание m^5C . Одновременно под действием дексаметазона в саркоме 45 почти полностью исчезает характерное для опухолевой ДНК плечо в области $56 - 60^\circ$ (10), тогда как в случае карциносаркомы Уокера 256 это происходит только частично. Вполне возможно, что частичное исчезновение низкотемпературного плеча обусловлено разницей в метилировании этих ДНК. Следовательно, в ДНК опухоли возрастает количество минорного основания 5-метилцитозина и это аномальное метилирование обратимо под влиянием гормона, в частности дексаметазона. Кроме того, частично восстанавливаются характеристики кривой плавления этих ДНК. Установленный факт контроля метилирования ДНК гормонами представляет существенный интерес, так как эта ферментная модификация в итоге может приводить к ошибкам в репликации транскрипции и трансляции, т. е. гибели или злокачественной трансформации клеток.

Институт тонкой органической химии
Академии наук Армянской ССР
Ереванский государственный университет

Ջ. Վ. ՂԱՐԻՔՅԱՆ, Հ. Մ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ի. Ս. ԴԱՆԻԵԼՅԱՆ, ՅՈՒ. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ,
Բ. Տ. ՂԱՐԻՔՋԱՆՅԱՆ, Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ

Դեֆամետազոնի ազդեցությունը ուռուցքային հյուսվածքի ԴՆԹ-ի վրա

Ուսումնասիրվել է տարբեր մորֆոլոգիական և կենսաբանական հատկություն ունեցող երկու փորձնական ուռուցքների (Ուղեքի կարցինոսարկոմա և սարկոմա 45) ԴՆԹ-ների նուկլեոտիդային կազմը, ինչպես նաև դեֆամետազոնի ազդեցությունը նշված ուռուցքների աճի և նրանց ԴՆԹ-ների առաջնային ու երկրորդային կառույցի վրա:

Հաստատվել է, որ երկու ուռուցքային շտամներից անջատված ԴՆԹ-ների պրեպարատներում պարունակվող հիմքերի ԳՑ-զույգերը գործնականորեն միատեսակ են: Դիտվում է միայն 5-մեթիլցիտոզինի պարունակության տարբերություն:

Պարզվել է նաև, որ դեֆամետազոնը 250 մկգ/կգ դոզայով ճնշում է Ուղեքի կարցինոսարկոմայի աճը 82, իսկ սարկոմա 45-ինը՝ 57 տոկոսով: Ուղեքի կարցինոսարկոմայի ուռուցքի ԴՆԹ-ի մեթիլացման մակարդակը դեֆամետազոնի ազդեցության տակ ավելանում է, մինչդեռ սարկոմա 45-ի դեպքում զգալի ճնշվում է ինչպես լյարդի, այնպես էլ ուռուցքի ԴՆԹ-ի մեթիլացման մակարդակը: Դեֆամետազոնը տարբեր ձևով է ազդում նաև հետազոտվող ԴՆԹ-ների երկրորդային կառույցի վրա:

Հորմոնի ազդեցության տակ ԴՆԹ-ի մեթիլացման մակարդակի փոփոխության հաստատված փաստը էական հետաքրքրություն է ներկայացնում այն առումով, որ այդ ֆերմենտային մոդիֆիկացիան արդյունքում կարող է բերել տրանսկրիպցիայի ռեպրեկացիայի և տրանսլյացիայի սխալների՝ բեռ-ջիջների մահացման, կամ նրանց չարորակ տրանսֆորմացիայի:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ E. Scarano, M. Iaccarino, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1957, 1394 (1967). ² K. H. Ibsen, W. H. Elshman, Blochim. et biophys. acta, 560, 2, 243 (1979). ³ G. M. Badger, L. A. Elson, A. Haddow e. a., Proc. Roy. Soc. B. 130, 860, 255 (1942). ⁴ О. И. Енуфанова, в кн.: Гормоны и размножение клеток, Наука, М., 1965. ⁵ B. F. Vanyushin, A. L. Masin, V. K. Vasillev e. a., Blochim. et biophys. acta, 299, 397 (1973). ⁶ B. F. Vanyushin, L. E. Nemirovsky, V. V. Klimenko e. a., Gerontologia, 19, 138 (1973). ⁷ Г. А. Романов, Б. Ф. Ванюшин, Молекулярная биология, т. 14, 357 (1980). ⁸ J. Margur, J. Mol. Biol., 3, 208 (1961). ⁹ Б. Ф. Ванюшин, в кн.: Совр. методы биохимии, Медицина, М., 1964. ¹⁰ Д. В. Гарибян, Г. М. Степанян, И. С. Даниелян и др., Биохимия, т. 45, 11, 2028 (1980). ¹¹ Н. Н. Бурцева, Н. П. Демидкина, Ю. М. Азизов и др., Биохимия, т. 43, 2028 (1978). ¹² T. W. Sneider, V. R. Potter, J. Mol. Biol., 42, 271 (1969). ¹³ В. Г. Смирнов, Г. А. Романов, Б. Ф. Ванюшин, ДАН СССР, т. 232, 961 (1977). ¹⁴ Г. А. Романов, Б. Ф. Ванюшин, Н.уч. докл. высшей школы, биол. н., 11, 5 (1980).