

БИОХИМИЯ

УДК 547.963.32

Н. В. Худавердян, Д. В. Гарибян, И. С. Даниелян, А. Г. Карапетян,
Г. М. Степанян, Б. Т. Гарибджанян

Влияние противоопухолевого антибиотика рубомицина
на ДНК опухолевой ткани

(Представлено академиком НАН Армении А.А.Галояном 11/ХП 1995)

Рубомицин широко применяется в химиотерапии злокачественных новообразований (1,2). Однако являясь токсичным препаратом, он в то же время подавляет иммунный ответ и оказывает иммунодепрессивное действие на синтез антител (3,4). Понятно желание устранить или ослабить указанное действие рубомицина, что и являлось одной из задач настоящего исследования. Многие исследователи связывают биологическую активность рубомицина с нарушением синтеза ДНК, однако работ, посвященных механизму действия этого препарата, сравнительно немного и выполнены они в основном *in vitro*.

Учитывая, что недавно была показана способность двуспиральной РНК (дс РНК) снижать токсичность цитостатиков при их совместном введении (5,6), а также данные о безвредности и переносимости дс РНК в клинике, в данной работе мы изучили влияние как рубомицина, так и совместного введения половинной дозы рубомицина и дс РНК на рост, а также на первичную (метилирование) и вторичную структуру ДНК саркомы 45 (С-45). Повреждающее действие рубомицина на метилирование и вторичную структуру ДНК изучали в условиях *in vivo*. Метилирование ДНК — специфический механизм экспрессии генов и клеточной дифференцировки. Изменение уровня метилирования ДНК в онтогенезе, выраженные тканевые различия в содержании 5-метилцитозина (m^5c), резкое увеличение минорного основания при опухолеродной трансформации у животных (7,8) указывают на участие метилирования в клеточной дифференцировке.

В работе использовали белых беспородных крыс-самцов, весом 100-120 г, интактных (без опухоли) и с перевивной саркомой 45. Животным перевивали С-45 в асептических условиях стандартными методами (9) путем подкожного введения взвеси измельченной опухолевой ткани в 0,85%-ном растворе хлорида натрия, содержащем 5×10^6 клеток. Скорость роста опухолей регистрировали путем ежедневного измерения их объе-

ма, а также взвешивания удаленных опухолей у забитых животных. Препараты вводили внутрибрюшинно в изотоническом растворе хлорида натрия начиная с пятого дня перевивки опухоли. При отдельном применении рубомицина вводили 8 раз. Суммарная доза составляла при этом 20 мг/кг. При совместном применении рубомицина и дс РНК рубомицин вводили через день (4 инъекции), суммарная доза 10 мг/кг, чередуя с дс РНК (4 инъекции), суммарная доза 400 мг/кг.

О противоопухолевой активности изучаемых препаратов судили по степени торможения роста опухоли. Противоопухолевая активность рубомицина 63,5%, рубомицина в сочетании с РНК 55,5%.

Через сутки после последней инъекции животных из подопытных и контрольных групп забивали декапитацией. Извлеченные после забоя животных ткани (печень у контрольных животных, опухоль у животных с С-45) замораживали, выделяя ДНК с последующей хлороформной обработкой и гидролизовали до оснований⁽¹⁰⁾. Основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге. Разделенные основания определяли спектрофотометрически⁽¹⁰⁾.

Плавление ДНК проводили в водном растворе, содержащем 0,02 M NaCl, pH 7,3 по известной методике⁽¹¹⁾. Кривые плавления получали на спектрофотометре Unicam SP8-100 при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК со скоростью 0,3 град/мин. Точность определения температур 0,05°C, оптической плотности $\pm 5 \times 10^{-4}$ единиц оптической плотности. Кривые плавления каждого образца записывали 10 раз. Из каждой кривой вычисляли характеристики ДНК, которые затем усредняли.

В таблице приведены данные по содержанию известных оснований (Г,Ц,А,Т) и m^5c в ДНК здоровой печени и опухоли С-45 до и после внутрибрюшного введения рубомицина отдельно и при применении с дс РНК. Содержание основных пар оснований в изученных ДНК практически одинаково. Выделенные ДНК принадлежат к АТ-типу, количество (Г+Ц+ m^5c) в них составляет 43,7-45,5%. Нуклеотидный состав ДНК соответствует правилам Чаргаффа. Четко выделяется разница в уровне метилирования между образцами ДНК, полученными из печени здоровых животных, и опухоли. Кроме того, обнаруживается разница по содержанию m^5c в ДНК из опухоли после введения изучаемых препаратов. Наши данные о разном содержании m^5c в нормальных и опухолевых клетках согласуются с данными других авторов о разной акцепторной способности ДНК при метилировании *in vivo* в этих клетках и повышении ДНК-метиلاзной активности в опухолевых клетках⁽¹²⁾. После нескольких инъекций рубомицина и рубомицина с РНК наблюдается резкое подавление уровня метилирования в ДНК опухолевой ткани. Это можно объяснить следующим образом: метилирование является исключительным и важным этапом синтеза ДНК, а рубомицин вызывает глубокое торможение синтеза ДНК во многих органах опухоленосящих животных⁽¹³⁾. Кроме того, за счет внедрения (интеркаляции) между основаниями двойной спирали ДНК рубомицин блокирует

Нуклеотидный состав ДНК и некоторые параметры плавления ДНК

Источник ДНК	Содержание оснований в ДНК, мол%						ΔT , град.	T_m , град.
	Г	Ц	А	$m^5c \pm \sigma$	Т	Г+Ц+ m^5c		
Печень (норма)	22,4	21,9	28,1	$1,02 \pm 0,02$	28,1	45,3	$6,5 \pm 0,1$	$71,9 \pm 0,2$
Опухоль	22,3	21,7	28,3	$1,57 \pm 0,03$	28,8	45,5	$7,4 \pm 0,1$	$70,8 \pm 0,1$
Опухоль + рубомицин	22,0	21,6	28,5	$0,50 \pm 0,02$	28,5	44,1	$6,7 \pm 0,1'$	$74,3 \pm 0,2$
Опухоль + рубомицин + РНК	22,1	21,4	28,0	$0,25 \pm 0,01$	28,1	43,7	$13,4 \pm 0,2$	$69,2 \pm 0,2$

Примечание. В каждой группе 15 животных. Число определений — 8. Приведенные изменения статистически достоверны ($P < 0,005$) по сравнению с контролем (печень, опухоль).

Г — гуанин, Ц — цитозин, А — аденин, Т — тимин.

ДНК-матрицу, приводя к нарушению матричной активности, а также препятствует нормальному функционированию ферментов, в частности ДНК-метилаз. Под влиянием препарата структура хроматина тоже может измениться таким образом, что не все потенциально метилируемые участки ДНК становятся доступными для ДНК-метилаз. Снижение метилирования ДНК в опухолевых клетках под действием препаратов обусловлено и выстриганием остатков m^5 с ферментами репарации, так как метильные группы могут быть местами узнавания для соответствующих специфических эндонуклеаз.

Результаты опытов по воздействию рубомицина с РНК на уровень метилирования ДНК опухоли показали, что уровень метилирования подавлен почти в 2,5 раза больше, чем при введении только рубомицина, что коррелирует с противоопухолевым эффектом изучаемых препаратов. Комбинация рубомицина с РНК даже при использовании половинных доз антибиотика позволяет получить выраженное (почти такое же) противоопухолевое действие антибиотика, что указывает на значимый терапевтический эффект, поскольку препараты дс РНК стимулируют синтез интерферона, обладающего известной противоопухолевой активностью, и усиливают иммунный ответ организма (14). По всей вероятности, при использовании в комбинации с РНК антибиотика наблюдаются эффекты потенцирования противоопухолевого действия цитостатика без увеличения его токсичности. Не исключено, что ингибирование метилирования ДНК рубомицином с РНК в какой-то мере может быть ответственным за начало репарационных процессов в ДНК опухоли, поскольку деметилирование ДНК приводит, как правило, к экспрессии генной активности. Найденные корреляции не исключают возможности других механизмов защитного действия дс РНК.

Наблюдаемые изменения в уровне метилирования ДНК опухолевых клеток могут быть обусловлены повреждающим действием изучаемых препаратов (рубомицина и РНК) на вторичную структуру ДНК. Для характеристики состояния вторичной структуры ДНК С-45 под действием рубомицина были определены параметры плавления ДНК. В таблице приведены значения температуры (T_m) и интервала (ΔT) плавления исследуемых препаратов ДНК. Интеркаляционное связывание рубомицина с ДНК приводит к увеличению термостабильности ДНК (к увеличению T_m). Вполне возможно, что, проникая в клетку, внедряясь между парами оснований, рубомицин приводит к добавочной стабилизации ДНК, вследствие чего нарушаются многие процессы в клетке, связанные с репликацией ДНК (15). Как и следовало ожидать, под воздействием рубомицина увеличивается T_m ДНК С-45, при этом ΔT изменяется не сильно. Следовательно, под действием только рубомицина стабилизируется структура ДНК опухоли. Под действием рубомицина в сочетании с РНК параметры плавления ДНК резко отличаются от соответствующих параметров для ДНК опухоли под влиянием только рубомицина; уменьшается T_m и увеличивается ΔT (таблица).

Изменения в параметрах плавления указывают на наличие во вторичной структуре ДНК опухоли таких изменений, которые отсутствуют под действием одного рубомицина. Следовательно, не углубляясь в причину наблюдаемых различий между вторичной структурой ДНК опухоли под действием рубомицина и рубомицина в сочетании с РНК, можно сказать, что во втором случае в ДНК опухоли происходят более серьезные структурные изменения, причем рубомицин при совместном применении с РНК, по-видимому, избирательно связывается с определенными участками ДНК, уменьшая стабильность этих участков и облегчая некоторые биологические процессы в клетке, связанные с репликацией ДНК.

Таким образом, на основании представленных данных по плавлению, уровню метилирования и подавлению роста опухоли можно предположить, что одним из способов предупреждения развития нежелательных побочных явлений, развивающихся в процессе химиотерапии опухолей, может быть применение цитостатика с дс РНК.

Ереванский государственный университет
Институт тонкой органической химии НАН Армении

Ն. Վ. ԽՈՒԴԱՎԵՐԴՅԱՆ, Ջ. Վ. ՂԱՐԻՔՅԱՆ, Ի. Ս. ԴԱՆԻԵԼՅԱՆ, Լ. Գ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ,
Հ. Մ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Բ. Տ. ՂԱՐԻՔՉԱՆՅԱՆ

Հակաուռուցքային հակաբիոտիկ ուլտրամիցինի ազդեցությունը ուռուցքային հյուսվածքի ԴՆԹ-ի վրա

Ուռուցքային ԴՆԹ-ի վրա *in vivo* պայմաններում ուլտրամիցինի և երկու շղթա ունեցող դրոժսյին ՌՆԹ-ի ու ուլտրամիցինի ազդեցության ուսումնասիրության ժամանակ հստակ ձևով առանձնանում է ուռուցքի և առողջ կենդանիների լյարդի ԴՆԹ-ների մեթիլացման աստիճանի տարբերությունը՝ նշված պատրաստուկներով կենդանիներին բուժելուց առաջ և հետո:

Ծույց է տրված, որ ուլտրամիցինի և երկու շղթա ունեցող ՌՆԹ-ի համատեղ օգտագործման դեպքում ուռուցքի ԴՆԹ-ի մեթիլացման մակարդակը 2,5 անգամ ավելի է ճնշվում, քան միայն ուլտրամիցինի օգտագործման ժամանակ: Դրա հետ միասին ուլտրամիցինի հակաուռուցքային ակտիվությունը կազմում է 63,5%, իսկ երկու շղթա ունեցող ՌՆԹ-ի հետ համագործակցելու ժամանակ, որտեղ օգտագործվել է ուլտրամիցինի 1/2 դոզան, այն կազմում է 55,5%:

Հակաուռուցքային ակտիվության և 5-մեթիլցիտոզինի պարունակության տվյալները ամբողջությամբ համաձայնեցվում են սպեկտրաֆոտոմետրիկ տվյալների հետ: Ուլտրամիցինի և երկու շղթա ունեցող ՌՆԹ-ի համագործակցված ազդեցության պայմաններում T_m պսիլասիլու հետ ավելանում է ΔT , որը նույնպես ցույց է տալիս այդ համագործակցության գերադասելիությունը:

Նկատվում է ուլտրամիցինի հակաուռուցքային ազդեցության ուժեղացում, առանց նրա թունականության բարձրացման:

- ¹ *Н.И.Переводчикова*, в кн.: Клиническая химиотерапия опухолевых заболеваний, М., Медицина, 1976.
- ² *С.М.Навашин, И.П.Фомина*, Рациональная антибиотикотерапия, 4-ое изд., М., Медицина, 1982.
- ³ *И.В.Малкова*, Антибиотики, №2, с.140-144, 1980.
- ⁴ *Г.М.Сухин, Е.В.Печерских, Л.Л.Стоцкая и др.*, Химиотерапия опухолей в СССР, т.58, с.113-119 (1992).
- ⁵ *А.М.Земсков, Е.Б.Войтекунас*, Вопросы онкологии, т.32, №6, с.98-101 (1986).
- ⁶ *Г.Я.Федмане, Б.К.Килена, Б.А.Попена и др.*, в кн.: Изучение индуктора интерферона двуспиральной РНК в различных биологических системах, Рига, с.141-148, 1989.
- ⁷ *B.F.Vanyushin, A.L.Masin, V.K.Vasiliev s.a.*, Biochim. et Biophys. acta, v.299, p.397 (1973).
- ⁸ *Ю.С.Бабаян, Д.В.Гарибян*, Биофизика т.35, вып.4, с.592-596 (1990).
- ⁹ *В.А.Чернов*, в кн.: Методы экспериментальной химиотерапии, М., Медицина, с.357-403, 1971.
- ¹⁰ *В.К.Васильев, Д.В.Гарибян, Р.А.Захарян и др.*, ДАН СССР, т.205, №3, с.721-723 (1972).
- ¹¹ *Ю.С.Бабаян, П.О.Вардеванян, Д.В.Гарибян и др.*, Биофизика, т.24, №2, с.313-314 (1984).
- ¹² *Н.Н.Бурцева, Н.П.Демидкина, Ю.М.Азизов и др.*, Биохимия, т.43, с.2082-2091 (1978).
- ¹³ *Л.Ю.Дедерер, О.М.Рогова*, Химиотерапия опухолей в СССР, №30, с.73-77 (1987).
- ¹⁴ *В.Д.Соловьев, Т.Бектемиров*, в кн.: Интерферон в теории и практике медицины, М., с.321-341, 1981.
- ¹⁵ *M.J.Waling*, Annu. Rev. Biochem., v.50, p.159-192 (1981).