

БИОХИМИЯ

УДК 577.12:616-006

Л. Э. Нерсисян, Н. К. Гаспарян, Н. В. Худавердян, Г. А. Геворгян

Роль метилирования ДНК в реализации противоопухолевого действия
потенциального противоопухолевого соединения *in vitro*

(Представлено академиком К.Г.Карагезяном 17/IX 2008)

Ключевые слова: *опухоль, ДНК, метилирование*

Повышение заболеваемости злокачественными опухолями – важнейшая проблема современной биологии и медицины. Действие ряда противоопухолевых препаратов обусловлено их способностью образовывать обратимые комплексы с ДНК с проявлением определенной токсичности, являющейся основным фактором, ограничивающим их широкое практическое использование. Следовательно, при поиске новых химических антиопухолевых средств внимание должно быть сосредоточено на обеспечении высокой степени эффективности при отсутствии побочных признаков токсичности.

На протяжении многих лет в лаборатории ароматических соединений Института тонкой органической химии НАН РА проводятся систематические исследования, касающиеся корреляции «структура – биологическая активность» в ряду α -, β -, γ - моно- и бис-аминокетонов. Изучение противоопухолевой активности дигидрохлоридов диаминодикетоное привело к отбору активного и нетоксичного соединения под условным номером 1724 [1,2]. Последнее обладает выраженным ингибирующим действием в отношении ряда экспериментальных опухолей, характеризуется отсутствием токсичности и выраженной противоопухолевой активностью по сравнению с аналогом – известным цитостатиком эмбихином. Кроме того, максимально переносимая доза соединения при многократном введении в 200 раз меньше аналогичных доз эмбихина, не обладает мутагенными свойствами [3] и относится к алкилирующим соединениям, в механизме противоопухолевого действия которых существенную роль играют алкилирующие свойства.

способствующие их реагированию с нуклеофильными центрами белковых молекул с нарушением синтеза ДНК, жизнедеятельности клеток и блокадой митотической активности последних, что сопровождается перекрестным связыванием двух нитей ДНК и нарушением их деления во время репликации [4], обеспечивая геномную нестабильность, которая может привести к апоптозу опухолевых клеток. Следовательно, противоопухолевые препараты этого типа оказывают повреждающее действие на малигнизированные клетки путем нарушения структуры и функции ДНК [5,6], с изменением статуса метилирования ДНК, являющегося важнейшим молекулярным механизмом при неоплазиях. Гиперметилирование ДНК является критическим для большинства раковых опухолей. Мутации возникают после дезаминирования 5-метилцитозина (5МЦ), с превращением ГЦ-пар в АТ-пару и в результате с изменением кодирующей последовательности нуклеотидов в гене и функции белка [7].

В данной работе мы попытались выявить характер взаимодействия и обусловленность терапевтической эффективности исследуемого активного противоопухолевого соединения 1724 с ДНК опухолевой ткани – саркомы 45 (С-45), поскольку последняя во многом обусловлена взаимодействием лечебного фактора с НК, в частности с ДНК. При изучении механизма действия цитостатических препаратов этого типа имеется возможность проследить за сдвигами реакций метилирования ДНК в опухолевой ткани до и после воздействия изучаемого соединения. Полученные изменения могут служить основой к рассмотрению их в качестве скрининговых свойств при неопластических заболеваниях [8].

Материалы и методы. Материалом для исследования *in vitro* служили печень здоровых животных (чистый контроль), опухоль С-45, опухоль С-45 + изучаемое соединение. Предварительно перевивку опухоли проводили в асептических условиях известным методом [9] на самцах линии "Вистар" массой 100-120 г. На 15-й день животных забивали и работали с извлеченной опухолью, а чистым контролем служила печень интактных животных. В качестве контрольного препарата в наших экспериментах был применен циклофосфан, поскольку несмотря на то, что в эксперименте эмбихин заметно тормозит рост ряда перевивных опухолей животных, с получением новых, более эффективных и менее токсичных препаратов эмбихин во многих странах перестали применять.

Циклофосфан при проникновении в опухолевые клетки быстро расщепляется под влиянием фосфатаз, в большом количестве находящихся в опухолевой ткани с освобождением ди(2-хлорэтил)amina, который рассматривается как соединение, доставляющее активное цитостатическое вещество

в опухолевые клетки.

Циклофосфан, как и ДНК, легко растворим в воде; в результате при выделении в опытах *in vitro* не исключены потери, что может привести к занижению активности препарата. Учитывая вышеизложенное, растворение циклофосфана производили в карбоксиметилцеллюлозе из расчета 1 мг в 5 мл раствора с вычислением нужной нам концентрации на 10 г опухоли. Последующее гомогенизирование опухолевой ткани и печени осуществляли в 0.15 М NaCl, гомогенаты инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. В работе использовали метод экстракции ДНК, на основе ее фенольно-хлороформенного экстрагирования в присутствии 1.5% SDS. Гидролитическое получение азотистых оснований проводили в запаянных стеклянных ампулах в 85% муравьиной кислоте при 176°C в течение часа (0.1 мл кислоты на 1 мг ДНК); тонкослойную хроматографию азотистых оснований (гуанин(Г), цитозин(Ц), 5МЦ, аденин(А), тимин(Т)) производили на ДЭАЭ-целлюлозе в растворителе бутанол:вода:аммиак (60:10:0.1), а спектрофотометрию элюатов всех оснований (А, Т, Г, Ц, 5МЦ) – против элюатов из соответствующих участков хроматограмм.

Результаты и их обсуждение. Обнаружено высокое содержание 5МЦ в ДНК С-45 (таблица). Гиперметилирование ДНК при неоплазии является специфическим эпигенетическим признаком, чем можно руководствоваться при диагностике и лечении этой болезни [10]. Учитывая существование тесной связи между процессами метилирования ДНК и возникновением опухолей, не исключено, что нарушение метилирования может привести к активации протоонкогенов и в свою очередь к усилению злокачественного роста [10,11]. Предполагается также, что одноцепочечная ДНК, образующаяся во время репликации или репарации, может стать объектом для метилирования *de novo* ДНК-метилтрансферазой, что часто встречается в процессе опухолевого роста [12], наряду с мутациями, возникающими после дезаминирования 5МЦ [13].

Нуклеотидный состав опухолевой ДНК в контроле и при воздействии изучаемого соединения под кодовым названием 1724 *in vitro*

Источник ДНК	Содержание оснований в ДНК, мол. %					
	Г	Ц	5МЦ ±σ	А	Т	Г+Ц+5МЦ
Печень (чистый контроль)	21.5	20.5	1.06±0.01	28.9	28.9	43.0
Опухоль (С-45)	21.0	18.1	3.09±0.01	29.0	29.0	44.0
С-45 + циклофосфан	21.2	19.5	1.47±0.01	29.2	29.2	42.1
С-45 + 1724	21.3	20.3	0.57±0.01	29.0	29.0	42.1

Примечание. В каждой группе – 10 животных. Число определений – 12. Проведенные изменения статистически достоверны ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (печень, опухоль).

При инкубации опухолевых клеток с потенциальным противоопухолевым соединением 1724 отмечается уменьшение содержания 5МЦ в ДНК опухолевой ткани; примечательно при этом практически одинаковое содержание основных оснований (Г, Ц, А, Т) в изученных ДНК. Выделенные ДНК принадлежат к АТ-типу, количество Г+Ц+5МЦ в них составляет 40.5-44.0 мол.%. Четкое различие между образцами ДНК из опухолевой ткани до и после воздействия исследуемого соединения обнаруживается только в отношении содержания 5МЦ. Одним из важнейших критериев чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии является способность активных соединений устранять дефекты в структуре ДНК. Восстановление поврежденной ДНК осуществляется разными путями, важнейшим из которых является механизм модификации ДНК, в особенности касающийся процесса метилирования опухолевой ДНК. Поскольку исследуемое соединение является алкилирующим агентом, механизм его действия объясняется образованием прочных ковалентных связей с ДНК, нарушением ее стабильности, при котором ингибируется эффективная репарация ДНК, что приводит к летальному повреждению чувствительных опухолевых клеток *in vitro* [14]. Кроме того, исследуемое соединение может ингибировать и ДНК-метилтрансферазу, вызвать обратное эпигенетическое глушение аберационно метилированных генов [15], что приводит к ингибированию роста опухоли. Эпигенетические модификации, включающие метилирование ДНК, обратимы и играют важную роль в регуляции генной экспрессии. Изменения метилирования могут привести к мутациям разных опухолесупрессорных генов или протоонкогенов. Как результат aberrаций метилирования геномной ДНК выступает и канцерогенез, а обратимость гиперметилирования может быть использована как мишень при терапевтическом лечении опухолей [16].

Результаты проведенных нами экспериментальных исследований подтверждают существование корреляционной связи между задержкой роста опухоли (78%) и уровнем ингибирования процесса метилирования опухолевой ДНК (81.5%) под воздействием исследуемого соединения, по сравнению с циклофосфаном (52.4%). Из полученных данных можно заключить о возможности использования оптических методов для исследования при опухолевой трансформации структурных изменений ДНК, в частности ее метилирования и установления характера связывания потенциальных противоопухолевых соединений с ДНК. Иначе говоря, становится очевидной целесообразность использования этих методов при разработке лекарственных мишеней, ингибирующих уровень метилирования ДНК. Кроме того, вышеизложенное свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения структурно-функциональных особенностей соединения 1724 *in vivo* в пред-

клинических исследованиях как препарата противоопухолевого действия.
Авторы выражают благодарность Д.В. Гарибян за содействие в работе.

Научно-технологический центр органической и фармацевтической
химии НАН РА

Национальный центр онкологии МЗ РА

Л. Э. Нерсисян, Н. К. Гаспарян, Н. В. Худавердян, Г. А. Геворгян

**Роль метилирования ДНК в реализации противоопухолевого действия
потенциального противоопухолевого соединения *in vitro***

Исследовано воздействие потенциального противоопухолевого соединения (под условным номером 1724) на ДНК, выделенной из здоровой печени и опухолевой ткани опухоленосящих животных в условиях *in vitro*. При инкубации опухолевых клеток с соединением 1724 и контрольным препаратом циклофосфаном наблюдается понижение содержания 5-метилцитозина в опухолевой ДНК. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения структурно-функциональных особенностей соединения 1724 *in vivo* в предклинических исследованиях как препарата противоопухолевого действия.

Լ. Է. Ներսեսյան, Ն. Կ. Գասպարյան, Ն. Վ. Խուդավերդյան, Գ. Ա. Գևորգյան

**ԴՆԹ-ի մեթիլացման նշանակությունը պոպերենցիալ հակաուռուցքային միացության
հակաուռուցքային ազդեցության կայացման մեջ *in vitro* պայմաններում**

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է պոպերենցիալ հակաուռուցքային միացության (1724 պայմանական անվանումով) ներգործությունը առողջ լյարդի եւ ուռուցքակիր կենդանիներից անջատված ուռուցքի վրա *in vitro* պայմաններում: Ուռուցքային բջիջների հետ 1724 միացության եւ սպուդիչ պատրաստուկ ցիկլոֆոսֆանի ինկուբացիայի ժամանակ ուռուցքային ԴՆԹ-ի կազմում դիտվում է 5-մեթիլցիտոզինի քանակի իջեցում: Փորձի արդյունքները վկայում են 1724 միացության հեռանկարային՝ հետագա, ավելի խորը *in vivo* ուսումնասիրության անհրաժեշտության մասին՝ որպես պոպերենցիալ հակաուռուցքային ակտիվությամբ օժտված միացություն:

L.E.Nersesyan, N.K. Gasparyan N.V.Khudaverdyan, G.A.Gevorgyan

**The Role of DNA Methylation in the Realization of Antitumoral Action of Potential
Antitumor Compound *in vitro***

The structural properties of DNA of tumor Sarcoma 45 (S-45), in particularly the methylation process (content of 5-methylcytosine (5mc)) of DNA of liver and tumor tissue

of healthy and cancerous animals under the influence of potential antitumor compound named N1724 are investigated in vitro. It is shown that methylation level is decreased in DNA of S-45 at the incubation of tumor cells with the compound named N1724 and the control preparation cyclophosphan. The results obtained have shown that compound N1724 must be studied in more details in vivo as a potent factor with the antitumor activity.

Литература

1. Авт свид. СССР, 1015599 (1983). Мнджоян О.Л., Геворгян Г.А., Петросян Л.М. и др. Дигидрохлорид 1,6-ди(п-пропоксифенил)-2,5-ди-(β, β' -дихлордиэтиламино)метил-1,6-гександаона, обладающий противоопухолевой активностью. БИ. 1983. N161.
2. Авт свид. СССР, 1121947 (1984). Геворгян Г.А., Габриелян С.А., Галстян Д.А. и др. Гидрохлорид α -фенил- β -пирролидино-п-фторпропиофенона, обладающий противоопухолевой активностью. БИ. 1984. N401.
3. Геворгян Г.А., Габриелян С.А., Мнджоян О.Л. и др. - Химиотерапия опухолей в СССР. 1984. Вып. 4. С. 84-88.
4. Prikul J.V., Gorn A.L., Tseitlin P.J. et al. - Biull. Eksp. Biol. Med. 1980. V. 90(10). P. 436-442.
5. Epstein I.I. - Clin. Oncol. 1990. V. 8. N12. P. 2062-2084.
6. Kumar R., Lown I.W. - Mini Rev. Med. Chem. 2003. V. 3(4). P. 323-339.
7. Корочкин Л.И. - Соросовский образовательский ж. 1996. N1. С. 17-22.
8. Muller H.M., Widschwendter M. - Expert Reiew of Molecular Diagnostics. 2003. V. 3. N4. P. 443-458.
9. Чернов В.А. В кн.: Методы экспериментальной химиотерапии. М. Медицина. 1971. С. 357-403.
10. Long-Cheng Li, Carroll P.R., Rajvir Dahiya - J. of National Cancer Institute 2005. V. 97. N2. P. 103-115.
11. Chih-Lin Hsief. - BMC Biochemistry. 2005. V. 6. P. 6.
12. Barret J.-M., Salles B., Provot C. - Carcinogenesis. 1997. V. 18. N12. P. 2441-2445.
13. Гвоздев В.А. - Биология. 1999. С. 11-17.
14. Allis C.D., Jenuwein T., Reinberg D. - Epigenetics-Cold Spring Harbor (N.Y). 2007. N3. P. 23-61.
15. Brown R., Plumb J.A. - Expert Review of Anticancer Therapy. 2004. V. 4. N4. P. 501-510.
16. Luczak M.W., Jagodzinski P.P. - Folia Histochem. Cytobiol. 2006. V. 44. N3. P. 143-154.