

УДК 616—006:615.277.3

А. А. ЧАЧОЯН, Дж. В. ГАРИБЯН, К. А. АКОПЯН, Б. Т. ГАРИБДЖАНЫН

ВЛИЯНИЕ АКТИВНОГО КАНЦЕРОЛИТИКА НА УРОВЕНЬ
МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НЕКОТОРЫХ ТКАНЕЙ ИНТАКТНЫХ
И ОПУХОЛЕВЫХ КРЫС

Изучено влияние противоопухолевого препарата из группы гомополипептидных производных сарколизина на уровень метилирования ДНК у интактных (без опухоли) крыс-самцов и у животных с привитой саркомой 45.

Установлено уменьшение уровня метилирования ДНК под воздействием активного канцеролитика, причем действие препарата тканеспецифично.

Известно, что торможение пролиферации и последующая гибель опухолевых клеток при противораковой химиотерапии наступает вследствие глубоких нарушений обмена ДНК, РНК, разрушения органоидов, повреждения ферментных систем окислительного фосфорилирования и т.д. Синтез ДНК является ключевым в метаболизме нормальных и опухолевых клеток, и интерес к особенностям механизма репликации и транскрипции ДНК вполне оправдан. Тем не менее функциональные и структурные изменения нуклеиновых кислот в опухолевых клетках при противораковой химиотерапии изучены недостаточно. Что касается такого высокоспецифического процесса модификации ДНК, каким является метилирование ДНК, которое к тому же сопряжено с опухолевым перерождением в сторону резкого увеличения уровня метилирования ДНК, то этот вопрос практически не изучен в условиях применения противоопухолевых препаратов.

Преобладающее число имеющихся в литературе работ свидетельствует о том, что основным метилированным компонентом ДНК животных является 5-метилцитозин [9, 21]. Процесс метилирования ДНК осуществляется специфическими метилазами [13] на уровне готовой полинуклеотидной цепи [3]. К сожалению, до сих пор значение метилирования ДНК в животных клетках еще не совсем ясно, однако оно, по-видимому, играет большую роль в регуляции активности генов, в особенности на уровне репликации и транскрипции ДНК [3]. Уровень метилирования ДНК может изменяться в зависимости от функциональной активности клеток, на что указывают данные по уменьшению содержания 5-метилцитозина в ДНК соматических клеток по мере полового созревания и нерестовой миграции горбуши, т. е. старения и угасания функциональной активности клеток [2]. Содержание 5-метилцитозина в ДНК животных связано также с их видовой принадлежностью [20]. Более того, ДНК из разных тканей одного и того же животного, а также клетки из разных отделов одной и той же высококодифференци-

рованной ткани (головной мозг) обладают разным уровнем метилирования ДНК [4]. Гормональная активация клеток печени гидрокортизоном и дексаметазоном [5] также сопровождается увеличением количества 5-метилцитозина в ДНК печени.

В литературе имеются работы [14, 15], в которых показано, что под действием различных противоопухолевых препаратов подавляется активность рРНК-метиляз, что приводит к прекращению синтеза новых рибосом и лимитации опухолевых клеток, а также подавляется синтез РНК, хотя и в меньшей степени, чем синтез ДНК. Наконец, из-за блокирования рибонуклеозидредуктазы и подавления активности ДНК-лигазы усиливается эффект ингибирования макромолекулярных синтезов и, в первую очередь, ДНК.

Как известно, синтез ДНК в опухолевых и нормальных тканях опухоленосителей под влиянием алкилирующих противоопухолевых соединений резко подавляется, причем в механизме цитостатического действия этих веществ угнетение биосинтеза ДНК занимает одно из ведущих мест независимо от механизма действия препаратов непосредственно на этапы синтеза или опосредованно через иные клеточные системы.

Физико-химические исследования препаратов ДНК, полученных после введения алкилирующих агентов, показали, что характеристическая вязкость однотожевых ДНК и эластовязкостные свойства высокополимерных ДНК не изменяются, что позволяет утверждать, что молекулярная структура менее чувствительна к действию указанных веществ [6]. И поскольку единственным изменением в молекулярной структуре ДНК, отмеченным в имеющейся литературе, является изменение степени метилирования, то мы решили уделить особое внимание исследованию уровня метилирования (содержание 5-метилцитозина) в ДНК некоторых тканей интактных и опухолевых животных до и после воздействия активного противоопухолевого агента, синтезированного в ИТОХ АН АрмССР [1].

Кроме того, мы исходили из известного представления о возможной роли метилирования ДНК в явлениях клеточной дифференцировки [17], о связи процесса метилирования ДНК с дифференциацией и специализацией клеток [18], а также из того, что раковое перерождение клеток или тканей сопряжено с изменением метилирования их ДНК.

Материал и методы

Опыты осуществлены на 40 белых беспородных крысах-самцах весом 100—120 г, из коих 20 были интактные и 20 с трансплантированной саркомой 45. Десяти интактным крысам ежедневно внутривентриально вводили активный канцеролитик в оптимальной терапевтической дозе—20 мг/кг. Контролем служили крысы, которые в аналогичных условиях получали физиологический раствор. Через сутки после 8-й инъекции животных забивали декапитацией, быстро удаляли печень, селезенку и семенники для получения ДНК.

Таблица 1

Нуклеотидный состав ДНК печени, селезенки, семенников крыс до и после воздействия активного канцеролитика

Ткань	Основания, мол. %					
	Г	Ц	МЦ (x±σ)	А	Т	ГЦ
Печень интактных крыс	21,5	20,0	1,1 ±0,05	29,1	28,3	42,6
Печень крыс с С-45	24,4	23,0	1,4 ±0,06	26,6	24,6	48,8
Селезенка интактных крыс	21,1	19,7	0,97±0,07	29,2	29,1	41,8
Селезенка крыс с С-45	22,3	21,0	1,3 ±0,09	28,4	27,0	44,6
Семенники интактных крыс	20,4	18,5	1,1 ±0,07	30,0	29,8	40,2
Семенники крыс с С-45	23,0	22,0	1,0 ±0,04	28,0	26,0	46,0
Печень интактных крыс + препарат	22,8	21,8	1,4 ±0,03	28,0	26,0	46,0
Печень крыс с С-45 + препарат	24,2	22,6	1,1 ±0,07	27,1	25,0	47,9
Селезенка интактных крыс + препарат	23,1	22,1	1,3 ±0,04	28,0	25,7	46,3
Селезенка крыс с С-45 + препарат	23,1	22,1	1,1 ±0,05	27,6	26,1	46,3
Семенники интактных крыс + препарат	21,9	21,5	0,99±0,05	28,0	27,6	43,5
Семенники крыс с С-45 + препарат	22,9	21,2	0,9 ±0,04	28,0	27,0	45,0

На крысах с перевивной саркомой 45 осуществляли обычный химиотерапевтический эксперимент, т. е. на 6-е сутки после перевивки опухоли их взвешивали и после определения исходных размеров опухоли разделяли на подопытную и контрольную группы по 10 животных в каждой. Подопытным крысам вводили ежедневно внутривенно (в течение 8 дней) активный канцеролитик в оптимальной терапевтической дозе 20 мг/кг. Контрольные животные за этот период лечения не получали. Через день после последней инъекции животных повторно взвешивали, забивали декапитацией и удаляли печень, селезенку и семенники для получения ДНК. У этих животных также высчитывали процент торможения роста опухоли и общетоксическое воздействие препарата на организм животных [8].

Высокополимерные препараты ДНК выделяли по методу Мармура [16] из помогенатов печени, селезенки и семенников в стандартном солевом растворе с ЭДТА в присутствии 1—2% додецилсульфата натрия при рН 8, используя метод депротеинизации хлороформом и фенолом. Выделенные сухие препараты ДНК гидролизовали до оснований (99% муравьиная кислота, 175°, 30 мин), основания разделяли путем двукратной восходящей хроматографии на бумаге в растворителе Н-бутанол—вода—25% NH₄OH (60:10:0,1).

Результаты и обсуждение

Данные, приведенные в таблице, показывают, что уровень метилирования ДНК в печени и селезенке крыс с саркомой 45 на 30% выше, чем в ДНК тех же органов здоровых животных. В уровне метилирования ДНК семенников здоровых и больных животных заметной разницы нет.

Исследованиями ряда авторов [7, 12] показано, что вводимая метка ($^{14}\text{C}\text{H}_3$ -метионин) включается во все основания ДНК лимфоцитов, инкубированных в среде Игло, что свидетельствует об активном биосинтезе пиримидинов в лимфоцитах *de novo*, однако удельная радиоактивность 5-метилцитозина была выше удельной радиоактивности цитозина в нормальных лимфоцитах в 10 раз, в лимфоцитах больных хроническим лимфолейкозом в 40 раз.

Десэй и др. [10] также произвели определение 5-метилцитозина и четырех других оснований в ДНК лимфоцитов, полученных от здорового человека и двух больных лимфолейкозом. Содержание 5-метилцитозина в ДНК лейкозных лимфоцитов было в 5 раз выше, чем в ДНК лимфоцитов здорового человека. Содержание гуанина было увеличено на 2—3%, а содержание цитозина—2—2,5%. Но, к сожалению, данные об изменении нуклеотидного состава в лейкозной клетке другими авторами не подтвердились.

При рассмотрении причин, приводящих к увеличению степени метилирования ДНК опухолевых клеток, возникает, в частности, вопрос о том, не связано ли это увеличение с появлением в ДНК хроматина раковых клеток дополнительных сайтов, доступных для метилирования, и с активацией метилаз. Согласно сообщению Галло [11], увеличение степени метилирования ДНК связано с нарушением дифференцировки клеток при лейкозе, так как уровень метилирования тРНК пропорционален степени незрелости клеток. Можно также полагать, что увеличение уровня метилирования в опухолевой клетке в условиях подавления общего уровня синтеза ДНК [19] в известной мере может рассматриваться как процесс, находящийся в прямой связи с транскрипцией и, возможно, амплификацией генов.

Установлено, что активный канцеролитик тормозит рост саркомы 45 на 88%, не оказывая общего токсического воздействия на организм животных ($\text{Kr} = +1,8\%$). Полученные нами результаты (таблица) также показали, что после введения активного канцеролитика животным с привитой саркомой 45 уменьшается степень метилирования ДНК изученных препаратов (печень, селезенка). Отмеченное уменьшение уровня метилирования ДНК под действием препарата может быть обусловлено многими моментами, в том числе и изменением конформационной доступности ДНК метилированию в результате взаимодействия препарата с ДНК. Под влиянием противоопухолевого препарата в ДНК семенников достоверных изменений по содержанию метилцитозина не наблюдается. Полученные данные свидетельствуют о корреляции между уровнем генетической активности и количественным содержанием 5-метилцитозина в ДНК, причем понижение степени метилирования отражает или обуславливает действие препарата на генетический аппарат опухолевой клетки и может быть следствием возможного энзиматического деметилирования соответствующих участков ДНК.

Институт биохимии АН Арм.ССР,
Институт тонкой органической химии АН АрмССР

им. А. Л. Минджояна

Поступила 23/11 1977 г.

Ա. Ա. ՉԱՉՈՅԱՆ, Զ. Վ. ՂԱՐԻԲՅԱՆ, Կ. Հ. ՀԱԿՈՐՅԱՆ, Բ. Տ. ՂԱՐԻԲՋԱՆՅԱՆ

ԱԿՏԻՎ ԿԱՆՑԵՐՈՒԻՏԻԿԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴՆԹ-Ի
ՄԵԹԻԼԱՑՄԱՆ ՎՐԱ ԱՌՈՂՋ ԵՎ ՈՒՌՈՒՑՔՈՎ ՀԻՎԱՆԻ
ԱՌՆՆՏՆԵՐԻ ՄԻ ՇԱՐՔ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրված է հակառուսացրային (սարկոտիդինի հոմոպոլիպեպտիդիլային ածանցյալների խմբից) պրեպարատի ազդեցութունը ԴՆԹ-ի մեթիլացման վրա առողջ (առանց ուռուցքի) առնետների և ուռուցքով հիվանդ, սարկոմա 45, ներարկված կենդանիների մոտ:

Պարզվել է ԴՆԹ-ում մեթիլացման նվազում ակտիվ կանցերոլիտիկի ազդեցության տակ, ըստ որում պրեպարատի ազդեցութունը հյուսվածքների վրա ընտրովի է:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанян Ц. Е., Амбоян К. Л., Гарибджанян Б. Т., Качоян А. А. Арм. хим. журн., 1972, 25, стр. 965.
2. Бердышев Г. Д., Коротаев Т. К., Боярских Г. В., Ванюшин Б. Ф. Биохимия, 1967, 32, стр. 98.
3. Ванюшин Б. Ф. Успехи совр. биол., 1968, 65, стр. 163.
4. Васильев В. К., Гарибян Д. В., Захарян Р. А., Галоян А. А., Ванюшин Б. Ф. ДАН СССР, 1972, 205, 3, стр. 721.
5. Галфаян В. Т., Васильев В. К., Захарян Р. А., Галоян А. А., Ванюшин Б. Ф. ДАН СССР, 1973, 212, стр. 992.
6. Стручков В. А., Жоголева И. Б. В кн.: II Всесоюзн. конф. по химиотерапии злокач. опух. М., 1974, стр. 154.
7. Федоров Н. А., Боровкова Т. В., Қимерал Р. Э. В кн.: Патогенез, лечение и эпидемиол. лейкозов. Рига, 1971, стр. 98.
8. Чернов В. А. В кн.: Методы эксперимент. химиотерапии. М., 1971, стр. 357.
9. Culp L. A., Dore E., Brown G. M. Arch. Biochem. Biophys., 136, 73, 1970.
10. Desai L. S., Wulff M. C., Foley G. E. Exper. Cell. Res., 65, 1, 260, 1971.
11. Gallagher R. E., Ting R. C., Gallo R. C. Cancer Congr., abstr., 1970, 622, 384.
12. Ito Kazuhiko, Uchimo Haruto J. Biol. Chem., 1971, 246, 12, 4060.
13. Kalousek F., Morris N. R. J. Biol. Chem., 1968, 244, 1157.
14. Lapis Kardy, Kopper Laszlo, Benedeczky Istvan. Mady onkol., 1975, 19, 3, 162.
15. Liau Ming C., Smittn Don W., Hurlbert Robert B. Cancer Res., 1975, 35, 9, 2340.
16. Marmur J., Doty P. J. Med. Biol., 5, 109, 1962.
17. Scarano E., Iaccarino M. et al. Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 1967, 57, 1394.
18. Silber R., Berman E., Golastein B., Farnham G., Bertino J. Biochim. et biophys. acta, 1966, 123, 638.
19. Syemayer J. Biochim. Biophys. Acta, 1970, 224, 10.
20. Vanyuschin B. F., Tkacheva S. G., Belozersky A. N. Nature, 1970, 225, 73.
21. Vanyuschin B. F., Masin A. L., Vasillev V. K., Belozersky A. N. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 299, 397.