

ОСОБЕННОСТИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК У ЖИВОТНЫХ С ГЕМОЦИСТОБЛАСТОЗОМ La ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЦИКЛОФОСФАНА И РНК

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

*/Институт тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна НАН РА/
375025, Ереван, ул Корюна, 2*

Ключевые слова: метилирование ДНК, 5-метилцитозин, циклофосфан

Несмотря на значительный прогресс в области изучения этиологии и патогенеза неопластического процесса, проблема терапии злокачественных опухолей все еще остается нерешенной. Так, даже при кратковременной экспозиции больших доз противоопухолевых соединений они, целенаправленно расщепляя ДНК опухолевых клеток, одновременно расщепляют ДНК и некоторых других клеток. В настоящее время считается наиболее вероятным, что под влиянием этих соединений происходит модификация генома клетки.

Метилирование и деметилирование ДНК в последнее время чаще рассматривают как способы поддержания дифференцированного состояния клеток. Кроме того, метилирование динуклеотида в ДНК является одним из источников спонтанного мутагенеза. Чем выше доля метилированных участков, тем большее их число мутирует. Вследствие спонтанного дезаминирования остатки 5-метилцитозина (m^5C) могут превращаться в остатки "минорного тимина". Такие мутации, очевидно, не могут эффективно репарироваться и поэтому, накапливаясь в геноме, приводят к неуправляемому росту клеток. Процесс дифференцировки и остановка деления клеток могут быть индуцированы различными противоопухолевыми соединениями, т.е. эти вещества могут стать индукторами дифференцировки и вернуть опухолевой клетке утраченную способность к дифференцировке. К таким препаратам относятся соединения, снижающие уровень метилирования ДНК. Вместе с тем ограниченная избирательность противоопухолевых цитостатиков, их высокая токсичность для организма вынуждают к поиску новых методов и способов повышения эффективности и избирательности действия препаратов. Комбинированное применение цитостатиков с природными соединениями способствует снятию побочных токсических эффектов и усилению их противоопухолевого действия. Среди естественных препаратов РНК наиболее известен нуклеинат Na, уже достаточно хорошо известный в эксперименте. Установлено, что низкомолекулярная двуспиральная РНК (дсРНК) играет важную роль в регуляторных процессах как на клеточном уровне, так и на уровне целостного организма.

Целью настоящего исследования было изучение характера метилирования ДНК в селезенке и печени животных с гемоцитобластозом La до и после лечения дсРНК и циклофосфаном при раздельном и сочетанном применении.

Материал и методы

Эксперименты проведены на мышах линии $C_{57}Bl_6$ массой 18-20 г. Животные были подразделены на 5 групп (по 10 в каждой). Из них 4 группам животных перевили гемоцитобластоз La по известной методике [4], а 5-я группа служила контролем. В 1-ю группу вошли здоровые животные (чистый контроль), 2-я группа с гемоцитобластозом La не получала препаратов (контроль с опухолью), 3-й группе вводили дсРНК*, 4-й — циклофосфан, 5-й — дсРНК и циклофосфан. Препараты вводили животным внутривенно в изотоническом растворе хлорида натрия. Суммарная доза составляла для дсРНК 50, а для циклофосфана — 200 мг/кг как при раздельном, так и при сочетанном применении.

Циклофосфан вводили в 1-й и 4-й дни опыта, а дсРНК ежедневно в течение 5 дней. На 6-й день животных забивали декапитацией, удаляли печень и селезенку, взвешивали. Критерием противоопухолевой активности дсРНК и циклофосфана у опухоленосящих животных служило увеличение средней продолжительности жизни (СПЖ). Извлеченные после забоя животных органы замораживали и выделяли ДНК по модифицированному методу Мармура [1] с последующей хлороформной обработкой. Полученные препараты ДНК содержали не более 1,5-2 % белка и РНК. При изучении зависимости между изменением функционирования генома, с одной стороны, и уровнем метилирования ДНК — с другой, используется, как правило, подход, основанный на определении содержания m^5C в ДНК. Для определения нуклеотидного состава ДНК, включая m^5C , препараты ДНК высушивали при 105°C и гидролизовали в запаянных ампулах до оснований (89% муравьиная кислота, 175°C, в течение 1 ч). Разделение азотистых оснований производили с помощью тонкослойной хроматографии на ДЭАЭ целлюлозе в растворителе н-бутанол: вода: аммиак (60:10:0,1). Разделенные основания определяли спектофотометрически [2].

Результаты и обсуждение

В химиотерапевтических опытах (табл. 1) выявлено, что дсРНК при раздельном применении увеличивает СПЖ животных на 128%, циклофосфан — более чем в 2 раза. При сочетанном применении дсРНК и циклофосфана противоопухолевый эффект достигает 224%. Кроме того, вес селезенки у контрольных животных (без опухоли) 135 мг, а у животных с опухолью он увеличивается более чем в 4 раза. При лечении животных, получивших только дсРНК, вес селезенки в 2 раза уменьшается, но почти в 2 раза превышает этот показатель в норме.

При введении опухолевым животным циклофосфана как раздельно, так и при сочетанном применении с дсРНК вес селезенки уменьшается по сравнению с нелечеными опухоленосителями в 12-15 раз, а с контрольными в 3-4 раза. Циклофосфан при раздельном применении на 20% больше уменьшает вес селезенки, чем при применении с дсРНК, что, по-видимому, свидетельствует о некоторой защитной функции дсРНК.

*Двуспиральная дрожжевая РНК получена из нуклеината натрия в лаб. НК Ин-та экспериментальной биологии НАН РА Захаряном Р.А. с соавт. и любезно предоставлена нам, за что авторы выражают свою искреннюю благодарность.

Комбинированное действие РНК и циклофосфана на рост гемоцитобластома

Препараты	Суммарная доза в мг/кг	СПЖ в %	Вес селезенки в мг
дсРНК	50	128	262±9,5
Циклофосфан	200	233	36±1,3
дс РНК+циклофосфан	50+200	224	45±1,45
Контроль с опухолью	—	100	536±16,8
Чистый контроль	—	—	135±4,5

В биохимических исследованиях (табл. 2) обнаружено, что в норме (чистый контроль) содержание m^5C в селезенке составляло $1,12 \pm 0,02$ мол%, у опухоленосителей оно повышалось до $2,35 \pm 0,03$ мол%, при лечении дсРНК снизилось до $0,40 \pm 0,03$ мол%, циклофосфаном до $0,28 \pm 0,02$ мол%, при сочетанном применении РНК и циклофосфана до $1,60 \pm 0,02$ мол%. Отличий в содержании других азотистых оснований ДНК при этом не обнаружено. Следовательно, в ДНК селезенки всех леченых групп животных, получивших дсРНК и циклофосфан, содержание m^5C снижено по сравнению с ДНК селезенки животных с гемоцитобластомой La, где уровень метилирования был высоким. Кроме того, уровень метилирования ДНК селезенки коррелирует с противоопухолевым эффектом применяемых препаратов, причем при сочетанном воздействии дсРНК и циклофосфана, не снижая противоопухолевой активности, можно снизить токсическое действие цитостатика. Нами также выявлена и подтверждена гепатогенность циклофосфана, которая даже в терапевтических дозах приводит к нарушению функции печени.

При анализе ДНК печени до и после лечения животных с гемоцитобластомой La явно выделяется разница в уровне их метилирования. Показано, что у опухоленосителей животных содержание m^5C снижено, дсРНК не влияет на уровень метилирования, циклофосфан повышает содержание m^5C , а при сочетанном применении дсРНК и циклофосфана это значение несколько снижено. По нуклеотидному составу эти ДНК также не отличаются от ДНК контрольных клеток. Нуклеотидный состав всех выделенных препаратов ДНК соответствует правилам Чаргаффа. Изученные препараты принадлежат к АТ-типу, количество ЦГ пар оснований ($g+c+m^5C$) в них составляет $42,9 - 44,9$ мол%. Приведенные величины являются средними не менее чем из 6 определений для каждого препарата ДНК.

Поскольку метилирование ДНК по цитозиновым остаткам у эукариот рассматривается в качестве одного из механизмов модуляции активности генов и клеточной дифференцировки и вполне определенно отражает происходящее *in vivo* патологические процессы [7], мы исследовали характер метилирования ДНК и возможность коррекции цитогенетического эффекта циклофосфана и дсРНК на фоне злокачественной опухоли.

Нуклеотидный состав ДНК в мол%

Условия опыта	Источник ДНК	Содержание оснований в ДНК, мол %					
		g	c	m ⁵ C (M±m)	A	T	g+c+m ⁵ C
Норма (чистый контр.)	селезенка	22,9	19,9	1,12±0,02	29,2	29,0	43,9
Лейкоз	"	22,1	19,6	2,35±0,03	29,6	29,6	44,0
Препараты:							
дсРНК	"	22,9	19,8	0,40±0,03	29,5	29,6	43,1
циклофосфан	"	22,6	20,4	0,28±0,02	29,0	29,0	43,2
дсРНК + циклофосфан	"	22,5	20,6	1,60±0,02	29,3	29,0	44,7
Норма (чистый контр.)	печень	22,1	20,5	1,02±0,02	29,1	29,0	43,6
Лейкоз	"	22,2	20,2	0,51±0,01	29,2	29,2	42,9
Препараты:							
дсРНК	"	21,9	20,6	0,51±0,03	29,0	29,0	43,0
циклофосфан	"	22,9	20,6	1,47±0,02	29,1	29,3	44,9
дсРНК+циклофосфан	"	22,4	20,5	1,31±0,03	29,0	29,1	44,2

Примечание. Число определений — 6. Различия между средними значениями m⁵C в селезенке и печени контрольных животных и животных, получивших препараты, статистически достоверно (P<0,05); g — гуанин, c — цитозин, A — аденин, T — тимин.

Независимо от того, вызвано ли снижение содержания m⁵C в ДНК при лечении действием нуклеаз, т.е. прямым деметилированием остатков m⁵C или выстриганием их с последующей репарацией ДНК и дезаминированием m⁵C с образованием "минорного" тимина [9], результатом может быть односторонняя разрыв ДНК. Тот факт, что некоторые противоопухолевые препараты являются сильными индукторами дифференцировки [5], может иметь значение для их лечебного эффекта. Индукция дифференцировки опухолевых клеток сопровождается повышением лабильности структуры ДНК в ее спонтанной фрагментации (разрывах), и не исключено, что эта лабильность ДНК связана с уменьшением степени ее метилирования [8], тем более, что к индукторам дифференцировки могут быть отнесены и некоторые бифункциональные алкилирующие агенты, снижающие уровень метилирования ДНК [6]. Поскольку в механизме антибла-

стомного действия циклофосфана важная роль принадлежит реакции алкилирования, в результате которой препарат реагирует с нуклеофильными субстанциями клетки. терапевтический эффект в таких случаях, как нам кажется, достигался бы за счет нормализации, а не гибели опухолевых клеток. В этих клетках могут быть реализованы по крайней мере два механизма уменьшения содержания m^5C — блокировка действия ДНК-метилазы препаратом и возможная утрата метилирования при репарации алкилированных ДНК.

При комбинированном воздействии на организм одно из воздействий должно быть направлено на защиту системы регуляции в клетках органов опухоленосителя. Дрожжевая дсРНК наделена такими функциями, которые делают возможной коррекцию иммунодепрессии, вызванной лекарственными препаратами [3]. Применяя дсРНК в наших экспериментах, мы несколько увеличивали уровень метилирования ДНК, снижая токсическое действие сильного химиотерапевтического препарата циклофосфана, не снижая его противоопухолевой активности.

Таким образом, изменение характера метилирования ДНК оказывается очень важным в опухоли и может лежать в основе искажения клеточной дифференцировки. Задержка роста опухоли коррелирует с выраженным уменьшением метилирования ДНК селезенки, поскольку ингибирование метилирования ДНК является необходимым условием экспрессии соответствующих генов. Следовательно, по характеру метилирования ДНК можно судить о целесообразности терапевтического воздействия цитостатика и РНК на организм опухоленосителя. Поскольку многие цитотоксические агенты оказывают повреждающее действие на клетки путем нарушения структуры и функции ДНК, исследование уровня метилирования ДНК позволит также наметить пути поиска новых средств ингибирования злокачественной трансформации клеток.

Поступила 15.08.95

**ԴՆԹ-ի ՄԵԹԻԼԱՑՄԱՆ ԱՌԱՆՉՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ
ՀԵՄՈՅԻՏՈՒԼԱՍՏՈՋ La ՊԱՏՎԱՍՏՎԱԾ ԿԵՆԴՐԱՆԻՆԵՐԻ ՄՈՏ
ՑԻԿԼՈՖՈՍՖԱՆԻ ԵՎ ՌՆԹ-ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ**

**Ջ.Վ.Ղարիբյան, Ի.Ս.Դանիելյան, Հ.Ս.Ստեփանյան, Բ.Տ.Ղարիբջանյան,
Ն.Վ.Խոսրովերդյան**

Հետազոտվել է հեմոցիտոքրաստոզ La պատվաստված կենդանիների լյարդի և փայծաղի ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանը ցիկլոֆոսֆանի և ՌՆԹ-ի ազդեցության պայմաններում:

Հայտնաբերվել է, որ բուժված կենդանիների բոլոր խմբերի փայծաղի ԴՆԹ-ում 5-մեթիլցիտոզինի պարունակությունը բուժված կենդանիների ԴՆԹ-ի համեմատությամբ զգալի նվազել է:

Հաստատվել է ուղղակի կապ հակառուտոցային ակտիվության և փայծաղի ԴՆԹ-ի մեթիլացման արտահայտված նվազեցման միջև:

PECULIARITIES OF DNA METHYLATION IN ANIMALS WITH HEMOCYTOBLASTOSIS
LA UNDER THE INFLUENCE
OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND RNA

D.V.Gharibian, I.S.Danielian, G.M.Stepanian, B.T.Gharibdjian,
N.V.Khoudaverdian

The degree of methylation of DNA in the spleen and liver of animals with hemocytoblastosis La has been investigated before and after treatment with cyclophosphamide and RNA.

It has been revealed that in DNA of the spleen of the animals in all studied groups the content of 5-methylcytosine (m^5C) is lower in comparison to DNA of tumoral animals. The inhibition of the tumor growth is correlated with the marked decrease of DNA methylation in the spleen.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев В.К., Гарибян Д.В., Захарян Р.А. и др. ДАН СССР, 1972, 205, 3, с. 721.
2. Васильев В.К. Науч. докл. высшей школы, биол. науки, 1971, 9, с. 118.
3. Земсков В.М., Лидак М.Ю., Земсков А.М., Микстайс У.Я. В кн.: Низкомолекулярные РНК. Получение, гидролиз, применение в медицине. Рига, 1985.
4. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. М., 1980.
5. Block A. Cancer Treat. Rep., 1984, 68, 199.
6. Sachs L., Lotem J. Nature, 1984, 312, 5993, 407.
7. Korba B., Wilson V., Yookum G. Science, 1985, 228, 1003.
8. Triftsoglon A.S., Wong W. Anticancer Res., 1983, 5, 1, 89.
9. Zell R., Fritz H.I. EMBO J., 1987, 6, 1809.
10. Hubbel Howard R. Pegulgnot Edward Cetal Anticancer Res., 1990, 10, 3, 795.