

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК
У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ
ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ДЕКСАМЕТАЗОНА
И ЦИКЛОФОСФАМИДА**

Ю.С.Бабаян, Н.В.Худавердян, Л.Г.Карапетян, Д.В.Гарибян,
И.С.Даниелян

*/Ереванский государственный университет,
Республиканский противоопухолевый диспансер,
Институт тонкой органической химии НАН РА/
375049, Ереван, ул. Мравяна, 1*

Ключевые слова: ДНК, 5-метилцитозин, параметры плавления,
циклофосфамид

К основным признакам, отличающим злокачественно трансформированные клетки от нормальных, относят их дедифференцировку или измененную способность к дифференцировке [8, 9, 14]. Одним из ведущих регуляторов 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 [9]. Серьезным недостатком большинства противоопухолевых препаратов, в том числе и циклофосфамида, является низкая избирательность их противоопухолевого действия, в результате чего они в эффективных дозах оказывают нежелательное токсическое действие на организм. Многочисленные исследования [3, 12] показали, что одна из возможностей повышения избирательности действия противоопухолевых препаратов — применение их в сочетании с гормональными препаратами.

В настоящей работе предпринята попытка выяснить, как влияет циклофосфамид в сочетании с глюкокортикоидом — дексаметазоном на структуру и метилирование ДНК двух экспериментальных опухолей, характеризующихся разными морфологическими и биологическими свойствами (карциносаркома Уокера-256 и саркома-45), поскольку главными мишенями для атаки со стороны алкилирующих противоопухолевых препаратов служат молекулы ДНК [14].

Материал и методы

В работе использованы белые беспородные крысы-самцы массой 90-100 г, которым прививали вышеуказанные экспериментальные опухоли в асептических условиях стандартными методами путем подкожного введения крысам примерно 5×10^6 клеток [1, 4]. Скорость роста опухолей регистрировали путем ежедневного измерения их объема, а также взвешивания удаленных опухолей у забитых животных. Препараты вводили животным внутривенно в изотоническом растворе хлорида натрия. Циклофосфамид и дексаметазон вводили начиная с пятых суток после прививки опухолей в течение 8 дней. Суммарная доза вводимого циклофосфамида составляла 200 мг/кг как при раздельном, так и при сочетанном применении. Дексаметазон вводили из расчета 25 мкг на 100 г массы животного ежедневно [6]. На 14-е сутки опыта животных забивали декапитацией и извлекали опухоль. ДНК из тканей выделяли по модифицированному методу Мармура, который подробно описан Д.В.Гарибяном и соавт. [5]. Полученные препараты ДНК содержали не более 1% белка и РНК.

Плавление ДНК проводили в водном растворе, содержащем 0,02 М NaCl, pH 7,3. Кривые плавления получали на спектрофотометре "Unicam SP 8-100" при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК со скоростью 0,25 град/мин. Точность определения температуры $\pm 0,05^\circ\text{C}$, оптической плотности $\pm 5 \times 10^{-4}$ ед.опт.пл. Гиперхромизм для всех образцов ДНК составил 35-37%, что характерно для нативных препаратов ДНК. Кривые плавления каждого образца записывали 10 раз. Из каждой кривой вычисляли характеристики ДНК, которые затем усредняли. Разделение азотистых оснований производили с помощью тонкослойной хроматографии на бумаге в растворителе н-бутанол: вода: аммиак (60:10:0,1) и определяли их количество спектрофотометрически [5].

Результаты и обсуждение

В таблице приведены данные по содержанию 5-метилцитозина (m^5C), ГЦ-пар оснований и параметры плавления (T_m и ΔT) в ДНК исследуемых опухолей и в ДНК печени здоровых животных. Из таблицы следует, что параметры плавления ДНК опухоли карциносаркомы Уокера-256 (КСУ-256) и саркомы-45 (С-45) отличаются от соответствующих параметров для ДНК печени. Содержание ГЦ-пар оснований в препаратах ДНК, выделенных из изучаемых штаммов опухолей и печени, практически одинаковы. Четкое различие между образцами ДНК обнаруживается только по содержанию m^5C . При рассмотрении изменений в уровне метилирования двух штаммов опухолей привлекает внимание тот факт, что опухоль, отличающаяся относительно более высокой степенью дифференцировки (С-45), характеризуется большим содержанием m^5C . Выявленные нами изменения степени метилирования двух разных экс-

периментальных штаммов опухолей могут лежать в основе индуцированного искажения клеточной дифференцировки и быть одной из причин трансформации клеток при различных 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-метилаз, 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 ядрах лимфоцитов крови при хроническом лейкозе у коров разные по активности и специфическому действию ДНК-метилазы [11]. Гиперметилирование ДНК в опухолевой ткани может приводить к изменению и во вторичной структуре к образованию некомплементарной пары Г-Т (при ферментативном дезаминировании м⁵С) [2, 10], вследствие чего, возможно, изменяются и параметры плавления опухолевых ДНК (таблица).

Таблица

Содержание 5-метилцитозина и параметры плавления ДНК изучаемых опухолей под воздействием гормона и противоопухолевого препарата

Условия опыта	Источник ДНК	Число определений	Содержание оснований в ДНК, мол %		ΔT, град	T _m , град
			м ⁵ С	Г+Ц+м ⁵ С		
Здоровые животные	печень	6	1,02±0,02	44,3±0,2	6,5±0,1	71,9±0,2
Животные с С-45	опухоль	6	1,45±0,03	46,0±0,3	7,4±0,1	70,8±0,1
Дексаметазон	опухоль	8	1,21±0,02	45,3±0,2	7,2±0,1	70,9±0,1
Циклофосфамид	опухоль	8	1,25±0,02	45,0±0,2	6,7±0,2	70,4±0,2
Дексаметазон и циклофосфамид	опухоль	9	1,13±0,03	44,8±0,3	6,6±0,2	71,4±0,1
Животные с КСУ-256	опухоль	6	1,24±0,04	45,9±0,3	7,3±0,2	70,9±0,2
Дексаметазон	опухоль	8	1,49±0,03	44,9±0,2	6,9±0,2	71,0±0,2
Циклофосфамид	опухоль	8	1,20±0,02	44,5±0,3	6,6±0,1	70,6±0,2
Дексаметазон и циклофосфамид	опухоль	9	1,10±0,02	44,3±0,2	6,6±0,2	71,5±0,2

Примечание. Различия между средними значениями м⁵С, ΔT и T_m в ДНК опухолей и опухолей после введения препаратов статистически достоверны (p<0,05)

Изучалось влияние дексаметазона и циклофосфамида на уровень метилирования и на вторичную структуру ДНК КСУ-256 и С-45. При КСУ-256 в опухолевой ткани имеется повышение степени метилирования под влиянием дексаметазона (таблица), что, по-видимому, говорит о чувствительности этого штамма (КСУ-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 обусловлено, наряду с опосредованным действием, также и прямым воздействием на метилазу, ДНК или хроматин, причем в гормонозависимых опухолях существует обратная связь между уровнем метилирования и угнетением роста опухоли. Дексаметазон ингибирует рост КСУ-256 на 82%, а С-45 — на 57%. Как следует из таблицы, при С-45 дексаметазон ингибирует уровень метилирования ДНК в опухолевой ткани.

Известно, что применение противоопухолевых препаратов алкилирующего типа приводит к образованию сшивок и односторонних разрывов в молекулах ДНК [7, 13]. Возможно, аналогичные структурные изменения ДНК (образование сшивок и разрывов) происходят и под действием циклофосфамида, вследствие чего и уменьшаются параметры плавления опухолевых ДНК (таблица). В таблице приведены также значения температуры (T_m) и интервала (ΔT) плавления исследуемых препаратов ДНК. Основываясь на характере изменения параметров плавления и содержания m^5C в изучаемых опухолях, исследовано влияние циклофосфамида и циклофосфамида в сочетании с дексаметазоном на структуру опухолевых ДНК. При лечении крыс с С-45 и КСУ-256 только циклофосфамидом наблюдаются определенные сдвиги в сторону "улучшения" степени метилирования и параметров плавления опухолевых ДНК (таблица), однако эти параметры все еще отличаются от соответствующих параметров для ДНК печени. При сочетанном применении циклофосфамида с дексаметазоном, как следует из таблицы, "лучше восстанавливаются" параметры плавления, характеризующие вторичную структуру опухолевых ДНК, приближаясь к соответствующим параметрам для ДНК печени, и резко подавляется степень метилирования обоих штаммов опухолей. Следовательно, данные по метилированию коррелируют со спектрофотометрическими данными по плавлению ДНК и с общепринятым противоопухолевым эффектом.

Таким образом, применение циклофосфамида в сочетании с дексаметазоном, по-видимому, приводит к активации репарационного аппарата клетки и уменьшению нежелательных структурных изменений в ДНК опухоли и, возможно, других органов, что указывает на предпочтительность применения циклофосфамида в сочетании с дексаметазоном.

Обобщая вышеизложенные экспериментальные данные по влиянию циклофосфамида в сочетании с дексаметазоном на первичную и вто-

ричную структуру ДНК опухоли экспериментальных животных, не углубляясь в природу молекулярных механизмов их действия, можно предположить, что сочетание применения цитостатика с гормональным препаратом уменьшает нежелательные побочные действия цитостатика, не снижая противоопухолевой активности.

Поступила 26.10.95

ՓՈՐՉԱՐԱՐԱԿԱՆ ՈՒՌՈՒՅՔՆԵՐՈՎ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ ՈՒՌՈՒՅՔԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԱՅԻՆ ԱՌԱՆՉՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԴԵՔՍԱՄԵԹԱԶՈՆԻ ԵՎ ՑԻԿԼՈՖՈՍՖԱՄԻԴԻ ՀԱՄԱՏԵՂ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ

Յու.Ս.Բաբայան, Ն.Վ.Խուդավերդյան, Լ.Գ.Կարապետյան, Ջ.Վ.Գարիբյան, Ի.Ս.Դանիելյան

Յույց է տրված, որ ակլիլացնող տիպի հակաուռուցքային ցիկլոֆոսֆամիդ դեղանյութի եւ դեքսամեթազոնի համատեղ ազդեցության դեպքում Ուոկերի կարցինոսարկոմա 256 եւ սարկոմա 45 ուռուցքներից անջատված ԴՆԹ-ի որոշ բնութագրեր (5-մեթիլցիտոզինի պարունակությունը, հալման ջերմաստիճանը եւ միջակայքը) մոտենում են առողջ կենդանիների լյարդից անջատված ԴՆԹ-ի համապատասխան բնութագրերին առավել, քան միայն ցիկլոֆոսֆամիդի ազդեցության դեպքում:

STRUCTURAL PECULIARITIES OF TUMOR DNA IN THE ANIMALS WITH EXPERIMENTAL TUMORS UNDER CYCLOPHOSPHAMIDE INFLUENCE IN COMBINATION WITH DEXAMETHASONE

Yu.S.Babayan, N.V.Khudaverdian, L.G.Karapetian, D.V.Gharibian, I.S.Danielian

It is shown that under the influence of anticancer alkylated preparation cyclophosphamide in combination with dexamethasone some characteristics of tumor sarcoma 45 and carcinosarcoma Worker 256 DNA (content of 5-methylcytosine, temperature and interval of melting) are more like the corresponding characteristics of DNA of healthy animals' liver, than under the influence of cyclophosphamide.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаян Ю.С., Гарибян Д.В., Даниелян И.С., Асланян В.М., Гарибджанян Б.Т. Вопросы мед. химии, 1984, т.30, 5, с. 92.
2. Бабаян Ю.С., Гарибян Д.В. Биофизика, 1990, т.35, 4, с. 592.
3. Белоусова А.К., Богуславская О.А., Бергольц В.В., Шкодинская Е.И., Курдюмова К.И. Эксперимент. онкология, 1982, т.4, 2, с. 42.
4. Гарибян Д.В., Степанян Г.М., Даниелян И.С. и др. ДАН Арм.ССР, 1979, т. 69, 4, с. 236.
5. Гарибян Д.В., Степанян Г.М., Даниелян И.С. и др. Биохимия, 1980, т.45, 11, с. 2028.
6. Гарибян Д.В., Степанян Г.М., Даниелян И.С. и др. ДАН Арм.ССР, 1983, т. 76, 4, с. 178.
7. Сьяксте Т.Г., Сьяксте Н.И., Лихтенштейн А.В. Биохимия, 1983, т. 48, 1, с. 137.
8. Федоров Н.А. Структура ДНК и трансформация клеток. М., 1983, с. 128.

9. Эмануэль Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. М., 1977.
10. Adams P.L.P., Eason R. *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 4, p. 5869.
11. Doerfler W. DNA methylation and gene activity. *Ann. Rev. Biochem.*, 1983, 52, p. 93.
12. Ts'o P.O.P., Lu P. *Cancer Res.*, 1982, 42, 4, p. 1433.
13. Walles S.A.S., Ringborg U. *Carcinogenesis*, 1991, 12, 6, p. 1151.
14. Waring M.J. DNA modification and cancer. *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, 50, p. 159.

