

## Влияние доксорубина с деринатом на ферментативное метилирование ДНК в печени и опухолевой ткани крыс при злокачественном росте

Д.В. Гарибян, Л.Э. Нерсисян, И.С. Даниелян, А.С. Агаронян, Г.М. Степанян, Н.В. Худавердян, Б.Т. Гарибджанян

*Институт тонкой органической химии НАН РА*

*375014, Ереван, ул. Азатутян, 14*

**Ключевые слова:** ДНК, 5-метилцитозин, доксорубин

Химиотерапия – важнейшая составная часть комплексной терапии злокачественных опухолей. Отличительной чертой химиотерапевтического способа лечения на современном этапе является рациональный подход к применению цитостатических средств, который предполагает максимальный противоопухолевый эффект при минимальном токсическом действии, поскольку все цитостатики довольно токсичны [4]. Известно также, что при лечении рака цитостатиками подавляется неспецифическая противоопухолевая резистентность организма [1, 4]. Кроме того, цитостатики подавляют иммунологическую реактивность организма, при этом повреждая все звенья иммунологической системы, приводя к выраженной иммунодепрессии [9, 14]. Поэтому изучение иммунодепрессивных свойств противоопухолевых препаратов, а также изыскание средств для устранения нежелательного их действия можно считать одной из основных задач современной противораковой химиотерапии.

Деринат (ДНК-На) применяется в онкологии параллельно с цитостатиками как средство, позволяющее преодолеть резистентность к повторным курсам лечения противоопухолевыми антибиотиками и даже позволяет снизить дозу, необходимую для получения эффекта.

Поскольку на молекулярном уровне может образоваться прочный комплекс противоопухолевого антибиотика и ДНК-На, мы попытались изучить влияние такого конъюгата на рост и первичную структуру (метилирование) ДНК саркомы (С-45). Ставя перед собой такую задачу, мы исходили из того, что метилирование ДНК – специфический механизм экспрессии генов и клеточной дифференцировки [2, 7, 8, 12].

Кроме того, мишенью патологического влияния роста опухолевых клеток, в первую очередь, являются кровеносные сосуды: активация процессов пристеночного тромбообразования, облегчение оседания и пенетрации опухолевых клеток через сосудистую стен-

ку, наблюдаемые в результате активации гемостаза, могут обуславливать стимуляцию опухолевого процесса. В связи с этим интерес, на наш взгляд, представляют результаты фармакологической коррекции фибриногена и фибринолитической активности в процессе опухолевого роста у животных.

### Материал и методы

В работе использованы белые беспородные крысы-самцы массой 100–120 г интактные (без опухоли) и с перевивной С-45. Животным перевивали С-45 в асептических условиях стандартными методами [11] путем подкожного введения взвеси измельченной опухолевой ткани в 0,85% растворе хлорида натрия, содержащем  $5 \times 10^6$  клеток. Скорость роста опухолей регистрировали путем ежедневного измерения их объема, а также взвешивания удаленных опухолей у забитых животных. Препараты вводили в изотоническом растворе хлорида натрия начиная с пятого дня перевивки опухоли, при этом разделив животных на три подопытные и одну контрольную группы по 8 крыс в каждой. Животным I группы вводили доксорубин в дозе 2,5 мг/кг (8 инъекций), II группы – ДНК-На – 1 мг/кг, III группы – доксорубин + ДНК-На. При совместном применении доксорубина и ДНК-На доксорубин вводили через день (4 инъекции) – половина общей дозы препарата, чередуя с ДНК-На (4 инъекции). IV группа служила контролем и получала физиологический раствор. На 14-й день опыта всех животных забивали и определяли степень торможения роста опухоли и общетоксическое действие (Кр) препаратов на организм животных.

Извлеченные после забоя животных ткани (печень, опухоль) замораживали, выделяли ДНК с последующей фенол-хлороформной обработкой и гидролизovali до оснований [3]. Основания разделяли с помощью

тонкослойной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в растворителе н-бутанол : вода : аммиак (60:10:0,1). Спектрофотометрию элюатов всех оснований (гуанин, цитозин, 5-метилурацил, тимин, аденин) производили против элюатов из соответствующих участков хроматограмм. Разделённые основания определяли спектрофотометрически [3].

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены данные по содержанию известных оснований (Г, Ц, А, Т) и 5-МЦ в ДНК здоровой печени, печени опухолёноящих животных, опу-

холи С-45 до и после внутрибрюшинного введения доксорубина и ДНК-На отдельно и при применении антибиотика с ДНК-На. Содержание основных пар оснований в изученных ДНК практически одинаково. Выделенные ДНК принадлежат к АТ-типу, количество (Г+Ц+5-МЦ) в них составляет 43,0–44,4 мол%. Нуклеотидный состав ДНК соответствует правилам Чаргаффа. Чётко выделяется разница в уровне метилирования между образцами ДНК, полученными из печени здоровых животных и опухоли.

Таблица 1

### Нуклеотидный состав ДНК

| Источник ДНК                    | Содержание оснований в ДНК |      |      |             |      |        |
|---------------------------------|----------------------------|------|------|-------------|------|--------|
|                                 | Г                          | Ц    | А    | 5-МЦ±σ      | Т    | Г+Ц+МЦ |
| Печень (норма)                  | 21,4                       | 21,9 | 28,1 | 1,02 ± 0,02 | 28,1 | 44,3   |
| Опухолоноящие животные (печень) | 21,8                       | 20,7 | 28,0 | 1,67 ± 0,02 | 28,0 | 44,1   |
| Печень + доксорубин             | 21,7                       | 20,7 | 28,3 | 1,32 ± 0,02 | 28,3 | 43,7   |
| Печень + ДНК-На                 | 21,8                       | 20,7 | 28,0 | 2,16 ± 0,01 | 28,0 | 44,4   |
| Печень + доксорубин + ДНК-На    | 21,5                       | 20,3 | 28,5 | 1,24 ± 0,02 | 28,5 | 43,0   |
| Опухоль                         | 21,7                       | 20,3 | 28,4 | 1,44 ± 0,03 | 28,4 | 43,4   |
| Опухоль + доксорубин            | 21,9                       | 20,7 | 28,5 | 0,51 ± 0,02 | 28,5 | 43,6   |
| Опухоль + ДНК-На                | 21,8                       | 20,1 | 28,6 | 1,72 ± 0,01 | 28,6 | 43,6   |
| Опухоль + доксорубин + ДНК-На   | 21,5                       | 20,6 | 28,6 | 0,91 ± 0,02 | 28,6 | 43,0   |

*Примечание.* В каждой группе 8 животных. Число определений 9. Приведённые изменения статистически достоверны ( $p < 0,005$ ) по отношению к контролю (печень, опухоль). Г – гуанин, Ц – цитозин, А – аденин, Т – тимин, 5-МЦ – 5-метилцитозин.

Кроме того, обнаруживается разница в содержании 5-МЦ в ДНК печени опухоленосящих животных и опухоли после введения изучаемых препаратов. Наши данные о разном содержании 5-МЦ в нормальных (печень), опухолевых клетках и в клетках печени опухоленосящих животных согласуются с данными литературы о разной ацепторной способности ДНК при метилировании в этих клетках и повышении ДНК-метилазной активности в опухолевых клетках [6, 14].

Как видно из табл. 1, повышен уровень метилирования и в клетках печени опухоленосящих животных. После лечения животных доксорубицином и доксорубицином с ДНК-На наблюдается резкое подавление уровня метилирования в печени и особенно в опухоли. Это можно объяснить следующим образом: комплекс ДНК-На и доксорубицин и раздельно доксорубицин вызывают глубокое торможение синтеза ДНК во многих органах опухоленосящих животных [5]. Конъюгат ДНК-На – антибиотик не распадаясь попадает в злокачественные клетки, и там под действием лизосомальных ферментов ДНК-носитель расщепляется на мелкие фрагменты, и антибиотик может проникнуть в ядро, где образует комплекс уже с ДНК-злокачественной клетки, блокируя в ней матричный синтез, препятствуя нормальному функционированию ферментов, в частности ДНК-метилаз. Кроме того, антибиотик, интеркалируя между основаниями двойной спирали ДНК, также блокирует ДНК-матрицу, а метилирование, являясь важным этапом синтеза ДНК, участвует в механизме регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки [7, 8]. Кроме того, разница в действии изученных соединений на метилирование ДНК печени животных опухоленосителей и опухолевой ткани позволяет говорить о некоторой избирательности действия этих веществ, что может быть связано с большей чувствительностью ДНК опухолевых клеток к препаратам.

Мы попытались выяснить, существует ли связь между уровнем метилирования ДНК и подавлением роста опухоли указанными препаратами. Полученные результаты показали, что после восьмикратного введения доксорубицина содержание 5-МЦ в опухоли уменьшается почти в 3 раза, при этом торможение роста опухоли С-45 – 51,8 %, общетоксическое действие препарата Кр = -22,6 %. Введение крысам-опухоленосителям с С-45 только ДНК-На повышает уровень метилирования как в печени, так и в опухолевой ткани в отличие от ДНК тканей здоровых животных (табл. 1). Последнее, по-видимому, объясняется тем, что в составе хроматина животной клетки ДНК потенциально не дометилована, и они могут быть дометилированы за счет ДНК-На, который может оказать прямое воздействие на метилазу, ДНК и хроматин. При этом не отмечено угнетения роста опухоли, а Кр имеет положительное значение. При комбинированном лечении доксорубицином с ДНК-На наблюда-

ется ингибирование уровня метилирования как в ДНК печени, так и особенно в ДНК опухоли в 1,6 раза. Торможение роста опухоли при комбинированном лечении несколько больше, чем при раздельном (только антибиотик) их применении – 55,3 %. Кр имеет положительное значение и достигает +7,7 %.

Полученные данные позволяют предположить, что сочетанное применение антибиотика и ДНК-На позволяет снять токсическое влияние доксорубицина на организм животных, используя пониженные дозы препарата (4 инъекции), не снижая противоопухолевой активности. По всей вероятности, при сочетанном применении антибиотика и ДНК-На наблюдается эффект потенцирования противоопухолевого действия антибиотика без увеличения его токсичности, которое связано с иммуностимулирующим действием ДНК-На, приводящего к активации репарационных процессов в клетке, вследствие чего уровень метилирования приближается к норме. Корреляция задержки роста опухоли и шадящее изменение уровня метилирования при сочетанном применении доксорубицина с ДНК-На указывает на предпочтительность такой комбинации.

Одним из основных положительных эффектов фармакологической коррекции при опухолевом процессе является стабилизация деятельности свёртывающей системы крови. Исходя из этого, у всех животных на 14-й день после перевивки С-45 и лечения изучаемыми препаратами определяли фибринолитическую активность и концентрацию фибриногена.

Из представленных данных следует (табл. 2), что у контрольных животных с опухолью С-45 по сравнению со здоровыми животными в 2,2 раза понижается фибринолитическая активность крови. Аналогичные результаты получены у животных, которых лечили доксорубицином. Показатели фибринолитической активности и концентрации фибриногена почти такие, как у животных с опухолью С-45 (II гр.). В остальных двух группах, где животных с С-45 лечили в одном случае только ДНК-На, а в другом – ДНК-На совместно с противоопухолевым антибиотиком наблюдается повышение фибринолитической активности соответственно в 2,6 раза и в 1,6 раза по сравнению с животными с С-45.

Таким образом, исходя из полученных данных можно предположить, что при лечении животных только доксорубицином не выявлено изменений концентрации фибриногена и фибринолитической активности, они такие же как и у нелеченных животных. У животных с опухолью С-45, которым вводили только ДНК-На и при совместном введении доксорубицина и ДНК-На наблюдается тенденция к понижению концентрации фибриногена и повышению фибринолитической активности, т.е. показатели свёртывания крови приближаются к норме.

Таблица 2

Некоторые показатели свертывающей системы крови

| Здоровые животные (контроль)    |          | C-45<br>ДНК-Na+<br>доксору- | C-45<br>ДНК-<br>Na | C-45 док-<br>сорубицин | C-45            |
|---------------------------------|----------|-----------------------------|--------------------|------------------------|-----------------|
| Концентрация фибриногена, мг/кг | 188±11,0 | 181±10,0                    | 179±6,0            | 207±12,0               | 202±9,0         |
| Фибринолитическая активность, % | 18±1,0   | 13±1,3<br>P<0,05            | 21±2,0<br>P<0,02   | 9±1,5<br>P<0,05        | 8±1,2<br>P<0,02 |

Таким образом, на основании проведенных биохимических исследований, можно заключить, что специфичность и избирательность противоопухолевого антибиотика с ДНК-Na может осуществляться в результате диметилирования ДНК, которое также связано и с иммуностимулирующим действием ДНК-Na.

Поступила 24.08.01

## Չարորակ աճի ժամանակ դոկսոռուբիցինի և դերինատի համապեղ ազդեցությունը առնետների լյարդի և ուռուցքային հյուսվածքի ԴՆԹ-ի ֆերմենտարիվ մեթիլացման վրա

Ջ. Վ. Դարիբյան, Լ. Է. Ներսեսյան, Ի. Ս. Դանիելյան, Ա. Ս. Ահարոնյան, Տ. Մ. Սյրեփանյան,  
Ն. Վ. Խուդավերդյան, Բ. Տ. Դարիբջանյան

Աշխատանքում փորձ է արվում ուսումնասիրել առանձին դոկսոռուբիցինի և դոկսոռուբիցինի հետ դերինատի համակցված ազդեցությունը ուռուցքակիր կենդանիների լյարդի ուռուցքի աճի ու ԴՆԹ-ի առաջնային (մեթիլացում) կառուցվածքի վրա in vivo պայմաններում:

Ի տարբերություն դոկսոռուբիցինի առանձին կիրառմանը, դոկսոռուբիցինի և դերինատի համակցումը ավելի մեղմ է ընկճում ուռուցքում մեթիլացման մա-

կարդակը, որը հայտնաբերվում է ուսումնասիրվող դեղամիջոցների հակաուռուցքային ազդեցության հետ: Բացի այդ, նրանց համատեղ ազդեցության ներքո մասնակիորեն վերականգնվում է արյան մակարդակը համակարգը: Հետևաբար, կենսաքիմիական ուսումնասիրությունը հաստատում է դոկսոռուբիցինի և դերինատի համատեղ կիրառման նպատակահարմարությունը:

## The effects of doxorubicin with derinat on DNA fermentative methylation of hepatic and tumor tissues of rats with malignant growth

J. V. Garibyan, L. E. Nersesyan, I. S. Danielyan, A. S. Aharonyan,  
H. M. Stepanyan, N. V. Khudaverdyan, B. T. Garibjanyan

A research has been conducted to reveal how in vivo doxorubicin and its combination with derinat act on hepatic and tumor (C-45) growth and DNA primary structure of animals with tumor.

The combination of doxorubicin with derinat suppresses more mildly DNA methylation level in tumor approximating it to the norm in contrast with the use of

doxorubicin alone, that correlates with the antitumor effect of the studied preparations. In addition to the combination the use of derinat with antibiotic partially improves the blood coagulation system. Thus, the biochemical studies affirm the expediency of application of doxorubicin and derinat combination.

### Литература

1. Балицкий К. П. В кн.: Нервная система и противоопухолевая защита. Киев, 1983.
2. Бабаян Ю. С., Гарибян Д. В. Биофизика, 1990, 35, 4, с. 592.
3. Васильев В. К., Гарибян Д. В., Захарян Р. А. и др. ДАН СССР, 1972, 205, 3, с. 721.
4. Гарибджанян Б. Т., Суджян А. В. В кн.: Рак и метаболизм. Ереван, 1998, с. 154.
5. Дедерс Л. Ю., Рогова О. М. Химиотерапия опухолей в СССР, 1987, 30, с. 73.
6. Кляшева Р. И. Вopr. онкологии, 1990, 10, с. 1186.
7. Мазин А. Л. Молек. биология, 1992, 2, с. 244.
8. Мазин А. Л. Молек. биология, 1993, 5, с. 965.
9. Малкова И. В. Антибиотики, 1980, 2, с. 110.
10. Сухин Г. М., Печерских Е. В., Стоцкая Л. Л., и др. Химиотерапия опухолей в СССР, 1992, 58, с. 113.
11. Чернов В. А. В кн.: Методы экспериментальной химиотерапии, М., 1971, с. 357.
12. Vanyushin B. F., Masin A. H., Vasiliev V. K. et al. Biochem. et Biophys. Acta, 1983, 299, p. 397.
13. Doerfler W. Ann. Rev. Biochem., 1983, 52, p. 93.
14. Laizid R. W., Yaenisch R. Hum. Mol. Genet., 1994, p. 1487.