

*Биология*

УДК 577.113.6

Լ. Զ. ՆԵՐՏԻՍՅԱՆ, Ժ. Վ. ԳԱՐԻԲՅԱՆ, Դ. Մ. ՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ա. Դ. ՄԱՐԿԱՐՅԱՆ,  
Ա. Ա. ՕԳԱՆԵՍՅԱՆ, Ա. Ս. ԱՆՏՈՆՅԱՆ, Մ. Ա. ՓԱՐՏԱԴԱՆՅԱՆ, ՅՈՍ. Տ. ԲԱԲԱՅԱՆ

ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА  
ДОКСОРУБИЦИНА С АНТИСТРЕССОВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ  
НА СТРУКТУРУ ДНК САРКОМЫ 45

Показано, что под действием противоопухолевого антибиотика доксорубицина в сочетании с антистрессовыми препаратами (диазепам, соединение 346) некоторые характеристики опухолевой ДНК (содержание 5-метилцитозина, температура и интервал плавления) ближе к таковым ДНК печени здоровых животных, чем под действием только доксорубицина.

В настоящее время широко обсуждается вопрос о роли стресса в возникновении первичных опухолей, поскольку стресс предшествует и обуславливает возникновение многих злокачественных новообразований [1–3]. Кроме того, сама опухоль, а также лечение ее, в ответ на токсическое действие химиопрепаратов, могут вызвать сильный стресс у пациентов [4, 5]. Мы попытались с помощью антистрессовых воздействий (диазепам, соединение 346\*) в процессе лечения противоопухолевым антибиотиком (доксорубицин) саркомы 45 (С45) уменьшить стрессовые реакции и предотвратить стрессовые повреждения в ДНК опухолевых клеток. При этом изучали структуру ДНК (степень метилирования, кривую и параметры денатурации), составляющую молекулярную основу генома, а также природу связи между изменениями в структуре ДНК и подавлением роста опухоли указанными препаратами.

**Материалы и методы.** Опыты проведены на крысах – самцах линии «Вистар» весом 100–120г, интактных (без опухоли) и с перививаемой С45 в асептических условиях известным методом [6].

В опытах использовали ДНК, выделенную из печени здоровых крыс (ДНК-1) и опухоли саркомы 45 (ДНК-2), способ выделения и характеристики которых описаны в работах [7–9].

Препараты вводили внутривентриально, начиная с пятого дня перививки опухоли. Диазепам и соединение 346 вводили за сутки до применения

\* Соединение 346 – потенциальный транквилизатор, синтезированный в ИТОХ НАН РА.

цитостатика, непосредственно перед этим и в последующие двое суток – всего 4 инъекции: диазепам – в дозе 4 мг/кг, соединение 346 – 5 мг/кг, доксорубин – 2,5 мг/кг. При совместном применении антибиотика и антистрессовых препаратов доксорубин вводили через день (4 инъекции – половина общей дозы препарата). На 14-ый день опыта всех животных забивали. Степень торможения опухоли определяли по ее росту в процентах.

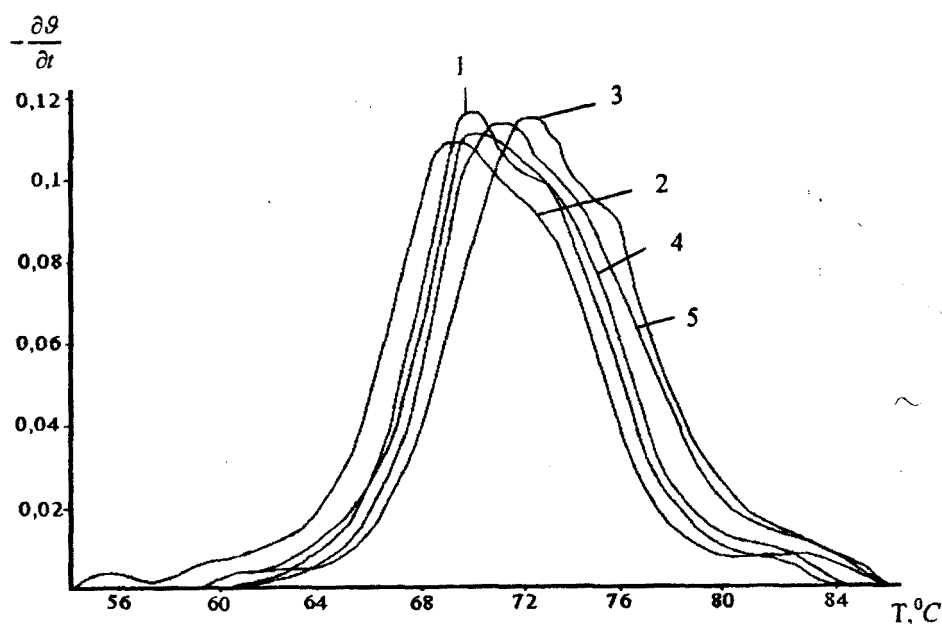
Определяли также общетоксическое действие ( $K_p$ ) препаратов на организм животных. Из печени и опухоли выделяли ДНК. Экстракцию ДНК проводили в фенольно-хлороформном растворе в присутствии 1,5% додецилсульфата натрия [10]. Гидролиз ДНК до азотистых оснований проводили в запаянных стеклянных ампулах в 85% муравьиной кислоте при 176°C в течение одного часа. Разделение азотистых оснований осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на диэтиламиноэтилцеллюлозе в растворителе н-бутанол–H<sub>2</sub>O–NH<sub>3</sub> (60:10:0,1). Спектрометрию элюатов проводили, сравнивая с таковыми соответствующих участков хроматограмм.

Плавление ДНК осуществляли в водном растворе, содержащем 0,02М NaCl, 0,5ММ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), pH 7,3. Растворы ДНК в герметически закрытых кварцевых кюветах помещали в термостатированную ячейку спектрофотометра Unicam SP 8–100 (Англия). Нагрев осуществлялся с помощью программного устройства со скоростью 0,25°C/мин. Значения поглощений ( $A_{260}$ ) регистрировались с помощью программируемого микрокалькулятора HP 97S I/O. Точность определения температуры – 0,1°C, оптической плотности – 0,001 ед. Данные по плавлению каждого образца снимались 8 раз. Для каждой кривой вычислялись параметры плавления, затем они усреднялись методом среднеквадратичного отклонения. Поскольку на спектрофотометрических кривых плавления особенности первичной и вторичной структур ДНК проявляются слабо, мы применили дифференциальные кривые плавления (ДКП), которые были получены путем численного дифференцирования нормированных кривых плавления по методу, описанному в [8].

**Результаты и обсуждение.** В работах [8, 9] показано, что с помощью ДКП можно отличить ДНК опухоли саркомы 45 от ДНК, выделенных из печени здоровых крыс. ДКП ДНК-2 смещены относительно ДКП ДНК-1 в сторону низких температур, при этом на ДКП ДНК-2 появляются дополнительные пики в области 54–61°C, которые отсутствуют в случае ДНК-1. Исследовано влияние доксорубина, а также доксорубина в сочетании с диазепамом и соединением 346 на структуру ДНК-2 с учетом характера изменения ДКП ДНК-2 под действием этих соединений. Одновременно проведено сравнение ДКП ДНК-1 и ДНК-2 (см. рисунок).

В таблице приведены значения температуры ( $T_m$ ) и интервала плавления ( $\Delta T$ ), содержание 5-метилцитозина ( $m^5C$ ) в исследуемых препаратах ДНК. Как видно из таблицы, уровень метилирования в ДНК опухоли С45 без лечения довольно высок – 1,54 моль%, что согласуется

с данными других авторов об изменении и перестройках в ДНК, связанных со злокачественной трансформацией [11, 12]. Кроме того, увеличение 5-метилцитозина в опухолевой ткани может быть результатом деструктивных изменений в хромосомах, которые, теряя свою компактность, становятся более доступными для воздействия специфических метилаз. Доксорубин резко подавляет содержание  $m^5C$  (0,54 моль%) в ДНК опухоли (см. табл.). Совместное применение доксорубина с диазепамом и соединением 346 ингибирует метилирование ДНК в опухолевой ткани, но в меньшей степени и более щадяще, чем только доксорубин.



Дифференциальные кривые плавления ДНК: 1 – печени здоровых животных; 2 – опухоли саркомы 45; 3 – опухоли при введении животным доксорубина; 4 – опухоли при введении животным доксорубина в сочетании с диазепамом и 5 – опухоли при введении животным доксорубина в сочетании с соединением 346.

Содержание 5-метилцитозина ( $m^5C$ ) и параметры плавления ДНК при воздействии доксорубина и доксорубина в сочетании с антистрессовыми препаратами

Условия опыта	Источник ДНК	$m^5C$ , моль %	$\Delta T$ , °C	$T_m$ , °C
здоровые животные	печень	$1,05 \pm 0,02$	$6,5 \pm 0,1$	$71,9 \pm 0,1$
животные с саркомой 45	опухоль	$1,54 \pm 0,02$	$7,4 \pm 0,2$	$70,8 \pm 0,2$
введен доксорубин	опухоль	$0,54 \pm 0,02$	$6,7 \pm 0,1$	$74,3 \pm 0,2$
введен доксорубин в комбинации с диазепамом	опухоль	$1,36 \pm 0,02$	$6,8 \pm 0,1$	$72,1 \pm 0,1$
введен доксорубин в комбинации с соединением 346	опухоль	$1,23 \pm 0,02$	$7,8 \pm 0,1$	$72,4 \pm 0,2$

\* Интервал плавления определяется как разность температур в точках изменения оптической плотности раствора ДНК от 17 до 83%.

При совместном применении доксорубина с диазепамом степень метилирования ДНК-2 понижается, достигая 1,23 моль%, приближаясь к соот-

ветствующему значению для ДНК-1 – 1,05 моль%. Отметим, что заметные различия в содержании других азотистых оснований не обнаружены.

Подавление уровня метилирования в ДНК опухолевой ткани при комплексном лечении животных можно объяснить, во-первых, энзиматическим деметилированием остатков  $m^5C$  под действием изучаемых соединений, во-вторых, глубоким торможением синтеза ДНК из-за внедрения антибиотика между основаниями двойной спирали ДНК, что приводит к блокированию ДНК-матрицы и препятствует нормальному функционированию ферментов, в частности ДНК-метилаз.

Полученные результаты по метилированию коррелируют со спектрофотометрическими данными (см. табл. и рис.). Как уже отмечалось в работах [8, 9], параметры плавления ДНК, выделенных из тканей здоровых животных, отличаются от таковых опухолевых ДНК: с уменьшением  $T_m$ , как следует из таблицы, увеличивается  $\Delta T$ . Под действием доксорубицина в сочетании с диазепамом и соединением 346 значения  $T_m$  и  $\Delta T$  ДНК-2 меняются и приближаются к соответствующим показателям ДНК-1. Из данных таблицы следует, что характер изменения параметров плавления под действием указанных препаратов также указывает на предпочтительность применения доксорубицина с антистрессовыми препаратами.

Проанализируем ДКП, приведенные на рисунке. Под действием доксорубицина в сочетании с антистрессовыми препаратами почти исчезают характерные для ДНК-2 низкотемпературные пики в области 54–62°C, и ДКП ДНК-2 по виду приближается к таковой для ДНК-1, однако все еще остается смещенной в сторону низких температур по сравнению с кривой ДНК-1.

Таким образом, можно предположить, что при лечении доксорубицином в сочетании с антистрессовыми препаратами деметилирование ДНК опухолевой ткани, которое достигается ферментативным механизмом, способно индуцировать дифференцировку клеток, поскольку обеспечивает устойчивое изменение локальной структуры гена [13].

Результаты биохимических исследований коррелируют с противоопухолевой активностью исследуемых соединений. При совместном применении доксорубицина с диазепамом, а также доксорубицина с соединением 346 (половина суммарной дозы антибиотика – 4 инъекции) можно сохранить терапевтическую эффективность доксорубицина (47–48% при совместном применении и 51% – только при антибиотике), при этом значительно снижается общетоксическое действие антибиотика ( $K_p = -5,6 \div -6,2$ ;  $K_p = -20,4$  соответственно).

Следовательно, в результате деметилирования ДНК опухолевых клеток и частичного восстановления некоторых структурных характеристик этих ДНК при совместном применении диазепама и соединения 346 с доксорубицином удалось увеличить противоопухолевую эффективность антибиотика (при использовании половины общей дозы) и уменьшить токсический эффект изучаемого препарата.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fox B.H. – Psychosom. Oncol., 1983, v. 1, № 1, p. 17–33.
2. Simonton O.C., Simonton S.M. – Med. J. Aust., 1981, № 1, p. 679–683.
3. Funch D.P., Marshall J.J. – Psychosom. Res., 1983, v. 27, № 1, p. 77–83.
4. Шапот В.С., Шелепов В.П. – Арх. патологии, 1983, т. 45, № 8, с. 3–12.
5. Гарибджанян Б.Т., Суджян А.В. В кн.: Рак и метаболизм. Ер.: изд-во Гитутюн, 1998, с. 154.
6. Чернов В.А. Методы экспериментальной химиотерапии. М.: Медицина, 1971, с. 357–403.
7. Vanyushin V.F., Masin A.H., Vasiliev V.K. et al. – Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 299, p. 397.
8. Бабалян Ю.С., Вардеванян П.О., Гарибян Д.В., Арутюнян С.Г., Асланян В.В. – Биофизика, 1984, т. 29, с. 313–314.
9. Babayan Yu.S., Garibian J.V. – Biofizika, 1990, v. 35, p. 592–596.
10. Ванюшин Б.Ф., Башките Е.А., Фридрих А.Л., Хвойка Л.А. – Биохимия, 1981, т. 46, № 1, с. 47–54.
11. Waring M.J. – Ann. Rev. Biochem., 1981, v. 50, p. 159.
12. Жижина Г.П., Когарко И.Н., Троицкая Т.П., Виноградова Ю.Е. – Эксперим. онкология, 1989, № 5, с. 54–56.
13. Rasin Aharon, Szuf Moshe, Kafri Tal et al. – PNAS USA., 1986, v. 83, № 9, p. 2827–2831.

Լ. Է. ՆԵՐՍԻՍՅԱՆ, Զ. Վ. ԴԱՐԻԲՅԱՆ, Գ. Մ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ա. Գ. ՄԱՐԿԱՐՅԱՆ,  
Ա. Ա. ՈԳԱՆԵՍՅԱՆ, Ա. Պ. ԱՆՏՈՆՅԱՆ, Մ. Ա. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ, ՅՈՒ. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ

ՍԱՐԿՈՄԱ 45-ի ԴՆԹ-ի ԿԱՌՈՒՅՎԱԾՔԻ ՎՐԱ ՀԱԿԱՌՈՒՌՈՒՅՔԱՅԻՆ  
ՀԱԿԱՔԻՈՏԻԿ ԴՈՔՍՈՌՈՒԲԻՑԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ  
ՀԱԿԱՍԹՐԵՍԱՅԻՆ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՀԵՏ ՀԱՄԱՏԵՂ

### Ամփոփում

Ցույց է տրված, որ հակառուցքային միացություն դոքսորուբիցինի և հակասթրեսային միացությունների դիագեպամ և 346 պրեպարատների համատեղ ազդեցության դեպքում ուռուցքային ԴՆԹ-ի որոշ բնութագրերը (5-մեթիլցիտոզինի պարունակությունը, հալման ջերմաստիճանը և միջակայքը) ավելի մոտ են առողջ կենդանիների լյարդից անջատված ստուգիչ ԴՆԹ-ի համապատասխան բնութագրերին, քան միայն դոքսորուբիցինով ազդելիս:

L. E. NERSISYAN, G. V. GARIBYAN, G. M. STEPANYAN, A. G. MARKARYAN,  
A. A. OGANESSYAN, A. P. ANTONYAN, M. A. PARSADANYAN, Yu. S. BABAYAN

INFLUENCE OF ANTITUMOR ANTIBIOTIC DOXORUBICINE WITH  
ANTISTRESSFUL PREPARATIONS ON DNA STRUCTURE  
OF SARCOMA 45

### Summary

It has been shown that under influence of antitumor antibiotic doxorubicine in combination with antistressful preparations (diazepam, preparation-346) some characteristics of tumor DNA (5-methylcytosine, temperature and interval of melting) approximate to appropriate characteristics of DNA of control rats more closely than only under doxorubicine influence.