

## **Молекулярні особливості протипухлинної дії амітозину.**

Швачко Л.П., Бух І.Г., Алексеева І.В., Потопальський А.І.

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна*

Амітозин – протипухлинний препарат рослинного походження на основі алкілованих тіофосфамідом сумарних алкалоїдів чистотілу за оригінальною розробкою А.І. Потопальського на базі Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ [1].

Клінічні випробування визначають протипухлинну дію амітозину на ранніх стадіях онкологічного захворювання, з суттєвим імуномодуючим ефектом [2]. Встановлено цікавий факт: амітозин дає змогу організму нормального співіснування з пухлиною протягом досить тривалого часу, отже здатний гальмувати розмноження пухлинних клітин і попереджувати рецидиви після видалення пухлини. Ця надзвичайна властивість амітозину не тільки потребує досліджень молекулярних основ протипухлинної дії препарату, але й свідчить та підтверджує можливість самого існування молекулярного передканцерного механізму у динаміці пухлинної прогресії. Концепція соматичного мутагенезу канцерогенного типу в індукції злоякісної клітинної трансформації узгоджується, насамперед, як з етіологією клонального соматичного походження спорадичних пухлин, так і з визнанням онкопрогресії “захворюванням “ геному з тривалим латентним періодом розвитку до появи пухлини. Вивчення молекулярної специфічності передканцерного механізму на рівні соматичного мутагенезу канцерогенного типу та пізнання ранніх адекватних мішеней в індукції онкологічного процесу відкривають шляхи прогнозування та передчасного попередження розвитку злоякісної клітинної трансформації.

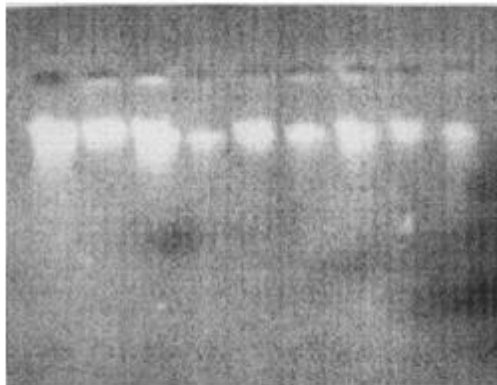
Переконливі молекулярні механізми канцерогенезу лежать у площині дедиференціювання малігнізованих клітин, що вірогідно асоціюється з порушенням епігенетичного контролю, головну увагу в якому привертає механізм ДНК метилювання [3]. Дія специфічних інгібіторів антиметаболітів ДНК метилювання по залишкам цитозину у складі CpG динуклеотидів - 5-азацитидину та 5-дезоки-аза-цитидину, засвідчують про ключову роль (pattern) ДНК

метилування в інактивації транскрипції та організації транскрипційно мовчащого (до 95%) стану геному і генної експресії [4]. Поряд з цим, ембріонально-летальні мутації ключового гену (pattern) ДНК-метилтрансфери демонструють пряму залежність ембріогенезу та диференціації ембріональних клітин від стану геномного ДНК метилування [5]. Досить сказати, що відкритий за останні роки феномен епігенетичного ДНК гіперметилування 5'-неметильованих CpG острівців у промоторних ділянках онкосупресорних генів та, як наслідок, подавлення експресії цих ключових генів захисту геному при аналізі переважної більшості пухлин та клітинних пухлинних ліній, є наразі головним чинником у поєднанні de novo ДНК метилування з механізмом канцерогенезу [6]. Однак, нами було показано, що на рівні соматичного мутагенезу канцерогенного типу, при аналізі лімфоцитів периферійної крові хворих з різною етіологією пухлинної прогресії, має місце саме геномне (pattern) ДНК-гіпометилування, за рахунок значного деметилування (Alu) сателітних ДНК повторів (малюнок 1). Збагачені метил- CpG динуклеотидами (на 56%) та найбільш чисельні за копійністю, складаючи до 10% геному [7], Alu повтори є вірогідними молекулярними сенсорами стану ДНК метилування на рівні соматичного мутаційного процесу, пов'язаного з індукцією канцерогенезу. Нами визначено, що феномен передканцерного механізму пухлинної прогресії полягає у функціональному поєднанні патерн ДНК гіпометилування, деметилування Alu альфоїдних сателітних повторів та деконденсації центромерного/перичентромерного гетерохроматину, наслідком якого є центромерна нестабільність метафазних хромосом з появою передчасного розділення сестринських хроматид та аномальної сегрегації хромосом на стадії мітозу [8, 9].

Малюнок 1.

Стан ДНК гіпометиллювання при пухлинній прогресії на основі Нра II-чутливої до неметильованих CpG сайтів епдонукулеазної рестрикції.

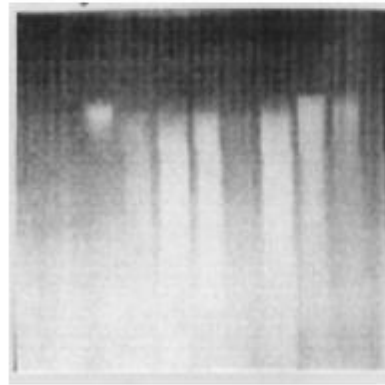
**1a**                    **Контроль**



**1 2 3 4 5 6 7 8 9**

1-9 – геномні ДНК  
здорових донорів

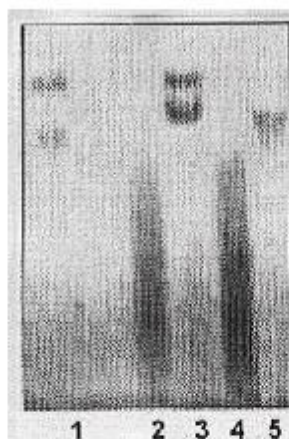
**1b**                    **Пухлинна прогресія**



**1 2 3 4 5 6**

1 – контроль – ДНК фага λ  
2 – ембріональна ДНК  
3 – ДНК хворого на рак щитовидної залози  
4 – ДНК хворого на колоректальний рак  
5 – ДНК хворого на нейробластому  
6 – ДНК хворого на пухлину Вільмса

**1c**                    **Молекулярна гібридизація DIG – (Alu)  
сателітних ДНК повторів з профілем ДНК  
гіпометиллювання при пухлинній прогресії.**

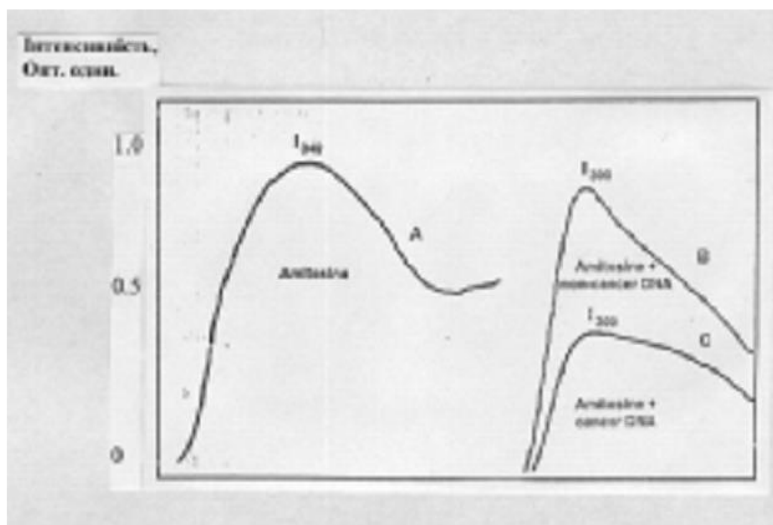


1- ДНК здорового донора  
2 - ембріональна ДНК  
3 – канцер-асоційована ДНК

Амітозин, як протипухлинний препарат, досліджувався нами, з точки зору феномену (pattern) ДНК гіпометилування, в попередженні індукції пухлинної прогресії на рівні передканцерного механізму. Включаючи до складу алкалоїди з сильною флуоресценцією (берберин, хелідонін, сангвінарін), амітозину притаманна аутофлуоресценція, яка лежить в основі специфічності дії препарату [2, 10]. Так, за спектрами флуоресценції при довжині хвилі 300-340 нм показана диференційна специфічність амітозину у зв'язуванні геномних ДНК клітин лімфоцитів при пухлинній прогресії та нормальної ДНК лімфоцитів, в основі якої - принципові зміни в ДНК метилуванні (малюнок 2).

Малюнок 2.

**Спектри флуоресценції Амітозину(А) з нативними препаратами геномних ДНК здорового донора(В) та при пухлинній прогресії (С).**



А - амітозин (25 мкг/мл).

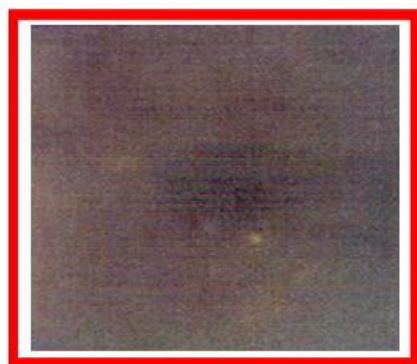
В, С – ДНК (10 мкг/мл) + Амітозин ( $4 \cdot 10^{-5}$ )

Подальші дослідження можуть спрямовуватись також на аналіз конформаційних особливостей пухлинної та непухлинної ДНК з амітозином як специфічним лігандом. За даними клінічних досліджень Потопальського та співавторів [10], виявлена специфічна флуоресценція адсорбції

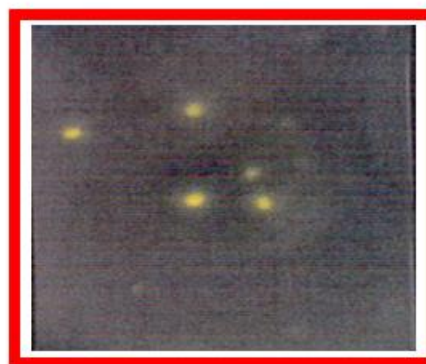
амітозину (після введення через 2-4 год. хворому ) саме на тканині пухлини та її відсутність на здорових тканинах далі від пухлини, що переконливо засвідчує про відношення амітозину до молекулярного механізму пухлинної прогресії, тригерною стадією якого, на нашу думку, є передканцерний механізм, пов'язаний з ДНК гіпометилуванням. Нами показано, що селективна молекулярна чутливість амітозину до феномену патерн ДНК гіпометилування мала місце, за специфічною флуоресценцією, як в культурі лімфоцитів хворих з онкологічною прогресією, так і в популяції здорових лімфоцитів, що культивувались з ДНК- деметилуючим реагентом 5-аза-цитидином, при відсутності флуоресценції амітозину в культурі лімфоцитів здорових донорів (малюнок 3).

Малюнок 3.

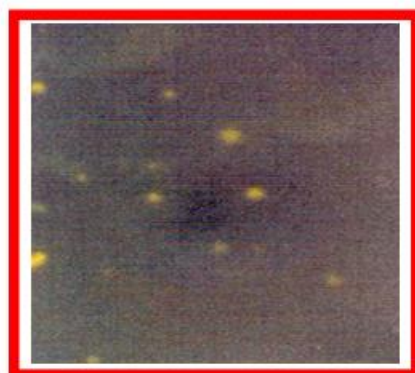
**Специфічна флуоресценція Амітозину з культурою лімфоцитів при пухлинній прогресії та дії ДНК-деметилуючого реагенту 5 - Аза – цитидину.**



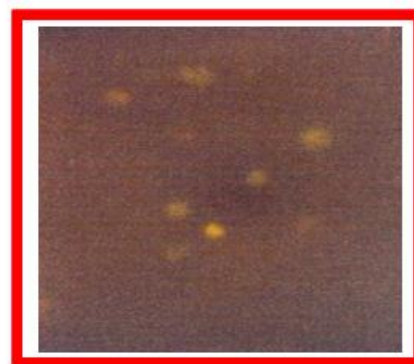
**Контроль**



**Колоректальний рак**



**Рак щитовидної залози**



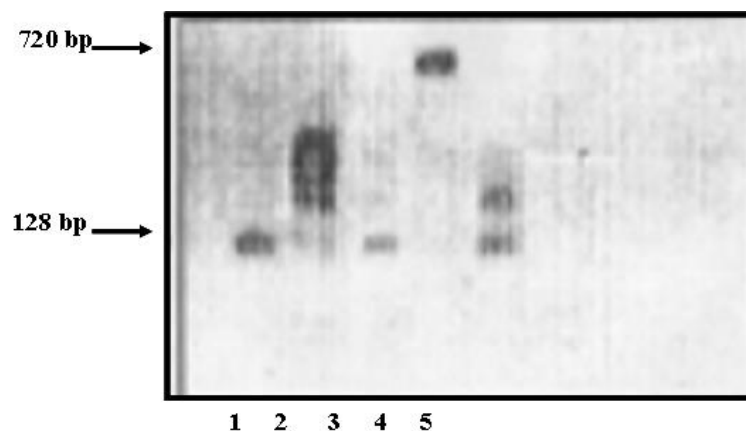
**5 – Аза - цитидин**

Саме цей факт надає амітозину прогностичного значення у виявленні клітин зі станом ДНК гіпометилування на рівні соматичного мутагенезу канцерогенного типу.

5-Аза-цитидин є специфічним конкурентним інгібітором ключового ферменту ДНК метилування геному – (pattern) ДНК-метилтрансферази [5]. За результатом ПЛР-аналізу ДНК-метилтрансферазного гену, показано, що онкологічну прогресію на рівні геному соматичних клітин крові супроводжує втрата, або подавлення саме патерн ДНК-метилтрансферазного гену, спряженого з одночасною появою профілю транскриптів *de novo*, не тільки не типових, але принципово суттєвих для подальшого нашого дослідження феномену *de novo* ДНК гіперметилування при пухлинній прогресії та його координації з феноменом ДНК гіпометилування. Показано, що амітозин, як протипухлинний препарат, є ефективним молекулярним протектором у появі профілю *de novo* варіантів ДНК-метилтрансферазного гену, з домінуючою транскрипцією патерн ДНК-метилтрансферазного варіанту в клітинах лімфоцитів хворого з онкологічною прогресією після культивування з амітозином на протязі 72 год. (малюнок 4).

Малюнок 4.

**Профіль генетичного поліморфізму ДНК – метилтрансферазного гену при пухлинній прогресії за результатами ПЛР-ампліфікації**



1 – Геномна ДНК здорового донора; 2 – Геномна ДНК з онкологічною прогресією; 3 – Онкологічна прогресія + Амітозин (культура лімфоцитів в присутності амітозину, 72 години); 4 – Внутрішній ПЛР – контроль; 5 – Мітогенстимульована культура лімфоцитів здорового донора, 72 години.

Таким чином, результати досліджень дають підставу стверджувати про існування феномену ДНК гіпометилування на рівні передканцерного механізму пухлинної прогресії, як ключового чинника соматичного мутагенезу канцерогенного типу. Показано, що протипухлинна дія амітозину, як на клітинному так і на молекулярному рівні, специфічно поєднується з механізмом протекції геномного ДНК гіпометилування та може акумулювати у собі одночасно прогностичну, діагностичну та лікувальну функції протипухлинного препарату молекулярної дії.

### Список літератури.

1. Потопальський А.І. Результати експериментального вивчення нового протипухлинного препарату "Амітозин" // Дисертація , Івано-Франківськ, - 1965 р.
2. Потопальський А.І. Препарати чистотила в біології та медицині. // Київ, Наукова Думка, - 1992, - 237 с.
3. Noyer-Weidner M., Trautner T.A. In DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance. (Eds. Jost J.P., and Saluz N.P., Birkhauser, Basel. 1993, pp. 39-108.
4. Jones P.A. Altering gene expression with 5-Azacytidine. // Cell – 1985, v.40, N3, pp.485-486.
5. Creusot F., Acs G., Christman J.K. Inhibition of DNA Methyltransferase and induction of Friend erytroleukemia cell differentiation by 5-Aza cytidine and 5-Aza-2'-deoxycytidine. // J. Biol. Chem.- 1982. v.257, N4, pp.2041-2048.
6. Baylin S. A., Herman J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. // Trends Genet. – 200, v.16, pp.168-174.
7. Швачко Л.П. Мутаційний процес, пов'язаний з розвитком канцерогенезу: роль Alu повторів у генетичній нестабільності. // Біополімери і клітина - 1998. т.14, N5, с.389-395.
8. Shvachko L.P., Buck I.G., Maliuta S.S., Stepanenko A.P., Procyk V.S., Kikotj V.A., Klimnjuk G.I., Balitskja O.V. The cancer somatic mutagenesis: the target role of Alu Klimnjuk G.I., Balitskja O.V. The cancer somatic mutagenesis: the target role of Alu 93-rd Annual Meeting, April 6-10, 2002. San-Francisco, California, p. 72.
9. Швачко Л.П., Бух І.Г., Степаненко А.П., Гульчій М.В., Цимбалюк С.М., Процик В.С., Кікоть В.О., Климнюк Г.І. Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин. // Деклараційний патент на винахід, Україна, 6453А 2004 р.
10. Потопальська Ю.А., Заїка Л.А., Сусак Я.М. Використання явища флуоресценції амітозину в оцінці механізму дії, діагностиці і контролі лікування новоутворень. // Матеріали III з'їзду онкологів і радіологів СНГ, м. Мінськ, 25-28 травня, 2004 р.