

В.О. Шляховенко
А.В. Вербиненко
В.О. Міліневська

Інститут експериментальної
патології, онкології і
радіобіології ім. Р.Е.Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: епігеномні
зміни, метилування ДНК,
ацетилювання гістонів,
РНКази, експериментальний
лейкоз, протипухлинна терапія.

ЕПІГЕНОМНІ ЗМІНИ В КЛІТИНАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛЕЙКОЗУ ПРИ БЛОКУВАННІ СИНТЕЗУ ПОЛІАМІНІВ

Мета: дослідити зміни активності гістондеацетилаз, рибонуклеаз і загального метилування ДНК у клітинах експериментального лейкозу L1210 при блокуванні синтезу поліамінів *in vitro* та *in vivo*. **Об'єкти і методи:** лейкоз L1210, суспензія лейкозних клітин; стандартні методи визначення метилування ДНК, активності гістондеацетилаз, РНКази. **Результати:** встановлено, що блокування синтезу поліамінів *in vitro* як на етапі декарбоксилювання орнітину (синтез путресцину), так і на етапі декарбоксилювання S-аденозил-метіоніну (синтез спермідину та сперміну) уже протягом перших 1–4 год призводить до пригнічення активності гістондеацетилази та зростання активності РНКази. Рівень загального метилування ДНК змінювався переважно у бік зниження. При введенні (двічі з інтервалом 24 год) інгібіторів синтезу поліамінів мишам CDF1 із прищепленим лейкозом L1210 одержано аналогічні результати. **Висновки:** застосування інгібіторів синтезу поліамінів із різним механізмом дії є перспективним напрямом у розробці цілеспрямованих впливів на пухлинний ріст.

ВСТУП

Останнім часом увага дослідників пухлинного росту привернута до особливостей функціонування геному, пов'язаних з епігеномними механізмами. Найсвіжіші дані свідчать про існування спеціальної системи регулювання експресії генів і збереження спадкової інформації, яка знаходиться за межами структурної перебудови ДНК. Епігеномні модифікації — це оборотні перебудови хроматину, які модулюють генну експресію без зміни послідовностей ДНК та забезпечують варіабельність транскрипційної активності окремих генів, перебігу клітинного циклу, реплікації та репарації ДНК, а також феноменів імпринтингу. Два незалежні епігеномні механізми — метилування ДНК й ацетилювання гістонів — часто залучені до процесу злоякісної трансформації клітин [1, 2].

На додаток до відомостей про генетичну природу раку відомо, що рак є епігеномним захворюванням [2–5]. Основною епігеномною модифікацією при злоякісних новоутвореннях є метилування ДНК, зокрема однією з найбільш важливих є інактивація генів-супресорів пухлинного росту через гіперметилування CpG-острівців в їх промоторних регіонах [6–8]. Ці ділянки (серед інших) є мішенями для ДНК-деметилуючих агентів як можливих протипухлинних засобів [1, 6, 7].

Друга група епігеномних регуляторних механізмів (на рівні транскрипції) реалізується модифікаціями структури гістонових білків. Відомо, що структура ядерного хроматину, щільність його упаковки значною мірою залежать від сумарного заряду гістонів. Зміни процесів ацетилювання, фосфорилювання, метилування, убіквітінування та інші модифіка-

ції істотно впливають на рівень цього заряду, а тим самим — на здатність гістонів зв'язуватися з ДНК, виключати функцію окремих генів чи їх груп [9, 10].

Гістоновий код, що регулює генну експресію, формується із по-різному ацетилюваних залишків лізину в гістонах. У злоякісних клітинах значне збільшення частки деацетилюваних гістонів звичайно асоціюється з гіперметилуванням ДНК і виключенням генів-супресорів пухлинного росту. Ці механізми одержали назву «Histone language» [11]. Ряд сполук, відомих як протипухлинні засоби, здатні інгібувати деацетилази гістонів (HDAC) [1, 12, 13]. HDAC — група ферментів, що регулює транскрипцію і ряд специфічних клітинних функцій, зокрема пригнічення пухлинного росту за участі білка p53. Інгібітори HDAC (iHDAC) виявляють протипухлинну активність, в більшості випадків добре переносяться та були успішно введені у клінічні випробування [14, 15, 19]. Вони класифікуються за хімічною структурою та здатністю пригнічувати HDAC I, II і IV класів. Серед iHDAC найбільш потужними є похідні гідроксамової кислоти, зокрема SAHA, що недавно була використана для терапії шкірних лімфом. Інші класи iHDAC: короткі ланцюжки жирних кислот (SCFA), бензаміди, епоксикетони, неепоксикетони, що містять циклічні тетрапептиди, та гібридні молекули [8–10, 12, 13, 16–18], — були також низькотоксичними і виявили протипухлинну активність проти солідних і гематологічних пухлин [10, 13, 19]. Крім того, iHDAC є сенсibilізаторами для радіаційного впливу. Водночас молекулярна основа селективної протипухлинної дії цієї групи речовин залишається невідомою. На наведених даних ґрунтується

ідея, що глибоке вивчення і використання HDAC (як окремих препаратів або їх синергічного впливу з гіпометилуючими засобами, а також засобами хіміо- та радіотерапії) становить значний інтерес і може стати однією зі стратегій для лікування злоякісних пухлин [10, 14, 16, 17].

Ще одним важливим епігеномним механізмом регулювання експресії геному є активність численних внутрішньоклітинних рибонуклеаз (РНКази). Останні являють собою велику групу життєво важливих для клітини ферментів, функціонування яких забезпечує необхідну рівновагу між процесами синтезу, функціонування і руйнування РНК; відома їх роль у механізмах процесингу та сплайсингу різних класів РНК [20–22]. Численні РНКази мають важливе значення для експресії продуктів різних генів. Зокрема, вони відіграють важливу роль у процесах апоптозу [23], знищенні вірусних і позаклітинних РНК [24]. Зараз відомо, що деякі види РНКази виявляють значну протипухлинну активність і в найближчому майбутньому можуть бути використані як протипухлинні засоби [25–28]. Рівень активності РНКази у клітинах злоякісних новоутворень знижений [28, 29, 30, 33, 34]. Їх активність зростає у біологічних рідинах в організмі з пухлиною. Причиною цього може бути підвищений рівень «витікання» ферментів із трансформованих клітин, що зумовлено, зокрема, ослабленням білок-білкових зв'язків за участю поліамінів [32, 35].

На сьогоднішній день недостатньо вивчено взаємодію між РНКазами та поліамінами. Показано, що спермін і спермідин у мікромолярних концентраціях здатні у кілька разів (до 7) підвищувати активність різноманітних РНКази, пригнічених інгібіторами [36]. Дія таких інгібіторів РНКази, як полі-А, полі-Г, диниткові РНК або ДНК, може бути повністю припинена за наявності малих концентрацій спермідину, сперміну і меншою мірою путресцину [36–38]. Водночас великі концентрації поліамінів здатні пригнічувати активність РНКази аж до повного блокування. Заслужують на увагу дані стосовно того, що під впливом поліамінів може змінюватися субстратна специфічність цих ферментів, пов'язана з послідовністю тих чи інших нуклеотидів у молекулі РНК [38]. Усе це вказує на те, що РНКази разом із поліамінами являють собою важливий механізм регуляції генетичної активності та мають бути предметом активного дослідження.

Враховуючи вищевикладене, метою роботи було вивчення ряду ранніх епігеномних змін у пухлинних клітинах за умов блокування синтезу поліамінів специфічними інгібіторами.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні були застосовані високоспецифічний інгібітор орнітиндекарбоксилази (ODC; EC4.1.1.17) диформетилорнітин (ДФМО) (R.M.I., France) та інгібітор S-аденозилметилдекарбоксилази (SAMDC, EC4.1.1.50) метилглюксаль біс-

(гуанілгідразон)-дигідрохлорид (МГБГ) (Janssen, Belgium).

Використовували дорослих, статевозрілих мишей-самців лінії CDF₁ розведення експериментальної бази ІЕПОР НАН України, досліди з якими проводили у відповідності з Міжнародними правилами проведення робіт із лабораторними тваринами [39]. Клітини експериментальної лейкемії L1210 пересаджували шляхом введення в черевну порожнину $5 \cdot 10^5$ клітин в об'ємі 0,25 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію.

Для досліджень *in vitro* із суспензії клітин L1210 відбирали проби ($20 \cdot 10^6$ клітин), які вміщували у живильне середовище 199, куди додавали досліджувані інгібітори синтезу поліамінів. Проби були розділені таким чином: 1 — контроль; 2 — ДФМО (360 мкМ); 3 — МГБГ (34 мкМ); 4 — ДФМО + МГБГ (відповідно 360 та 34 мкМ). Клітинні суспензії інкубували при температурі 37 °C протягом 60 хв або 4 год, після чого осаджували низькошвидкісним центрифугуванням (1500 об./хв, 5 хв). З осаду клітин екстрагували відповідними буферними розчинами (для визначення активності ферментів, відповідно до рекомендацій виробника) HDAC та РНКази або виділяли ДНК для оцінки рівня її метилювання.

У дослідах *in vivo* на 5-ту добу розвитку лейкозу тваринам вводили ДФМО (800 мг/кг), МГБГ (75 мг/кг) або поєднання цих інгібіторів синтезу поліамінів у зазначених дозах. Через 24 год введення повторювали. Контрольним тваринам вводили по 0,25 мл ізотонічного розчину хлориду натрію. Через 4 год після останнього введення інгібіторів синтезу поліамінів усіх тварин забивали під легким ефірним наркозом, асцитну рідину вимивали з черевної порожнини, підраховували кількість лейкоцитів клітин. Із загального об'єму суспензії відбирали проби так, щоб у кожній було $5 \cdot 10^6$ клітин. Клітини осаджували низькошвидкісним центрифугуванням, промивали один раз охолодженням 0,14 М розчином NaCl і проводили екстракцію ферментів або виділяли ДНК.

При кількісному визначенні активності HDAC був використаний флуорогенний субстрат «HDAC Assay Kit Fluorimetric» (SIGMA-ALDRICH); рівень флуоресценції визначали при $\lambda = 450$ нм за умов збудження при $\lambda = 360$ нм у планшетах Nunclon TM.

Вивчаючи активність РНКази, здійснювали їх екстракцію 8М забуференим розчином сечовини. Визначення активності проводили із застосуванням електрофорезу в блоках поліакриламідного гелю. Клітинний екстракт доводили до 1% додецилсульфатом натрію, розділяли в блоці 12% поліакриламідного гелю за Laemmly [40]. До складу розділяючого гелю як субстрат вводили поліуридилову кислоту (400 мкг/мл). Після проведення електрофорезу протягом 4 год при градієнті напруги 20 В/см гелі виймали з камери; після видалення додецилсульфату натрію інкубували в 0,05М ацетатному буфері (рН 5,5) протягом 60 хв та забарвлювали 0,1%

розчином толуїдинового синього упродовж 30 хв. Гелі фотографували на цифрову камеру і обробляли на комп'ютері за допомогою програми Totallab. Результати представлено у вигляді гістограм.

Для визначення рівня загального метилування ДНК клітинний осад двічі промивали холодним 0,14М розчином NaCl, після чого з кожної проби ($5 \cdot 10^6$ клітин) проводили виділення ДНК стандартним методом хлороформної депротеїнізації або за процедурою MiniPrep. Після визначення концентрації ДНК рівень загального метилування досліджували імуоферментним методом ELISA (розчин ДНК із концентрацією 100 нг/мл вносили по 50 мкл у кожну лунку планшетів) за допомогою стандартного набору Epigentek (США) згідно з процедурою, рекомендованою виробником, шляхом вимірювання поглинання при $\lambda = 450$ нм на рідері Synergy.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Завданням першої серії досліджень було вивчення активності HDAC у клітинах L1210 на різних етапах блокування *in vitro* синтезу поліамінів (рис. 1). Уже при короткочасній (60 хв) дії на клітини L1210 інгібітора ODC — ДФМО в них знижується ($p = 0,05$) активність HDAC; ще більше зниження ($p < 0,05$) відмічено при дії інгібітора SAMDC — МГБГ. Найбільш виражене зниження ($p < 0,01$) активності HDAC спостерігали при поєднаній дії обох інгібіторів (див. рис. 1 а). Таким чином, зміни активності HDAC можуть бути віднесені до найбільш ранніх проявів, пов'язаних з інгібуванням метаболізму поліамінів. При більш тривалій дії інгібіторів (4 год) активність HDAC у клітинах L1210 продовжує знижуватися і утримується на низькому рівні (порівняно з контролем $p < 0,05$ у всіх варіантах досліджу) (див. рис. 1 б). Одержані дані узгоджуються з результатами багатьох дослідників [9, 10], якими показана пряма кореляція між рівнем пригнічення активності HDAC і протипухлинною дією інгібіторів синтезу поліамінів.

У наступній серії досліджень вивчали зміни активності HDAC в умовах *in vivo*, коли інгібітори вводили тваринам з експериментальним лейкозом L1210 (рис. 2). Одержані дані підтвердили результати досліджень *in vitro*, згідно з якими блокування синтезу поліамінів як на рівні декарбоксилювання орнітину, так і на рівні пригнічення активності S-аденозилметіоніндекарбоксилази призводить до тривалого зниження активності HDAC.

Дослідження метилування ДНК на ранніх етапах блокування синтезу поліамінів *in vitro* показало, що при короткочасній (60 хв) дії ДФМО та ДФМО у поєднанні з МГБГ на клітини L1210 рівень метилованої ДНК значно знижується; найбільш виражене зниження спостерігається при поєднаній дії обох інгібіторів. Водночас вплив МГБГ не змінює рівня метилування (який навіть

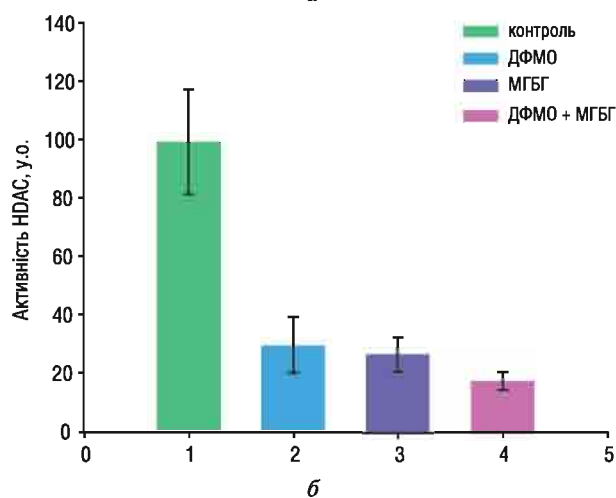
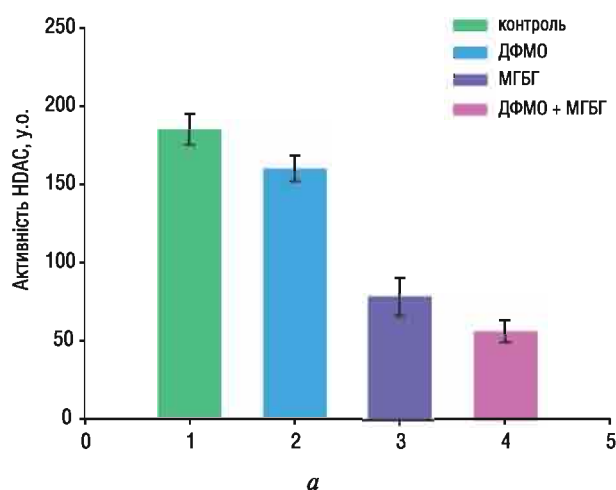


Рис. 1. Вплив ДФМО, МГБГ та їх поєднання на активність HDAC у клітинах експериментального лейкозу L1210 при впливі *in vitro* протягом 60 хв (а) і 4 год (б)

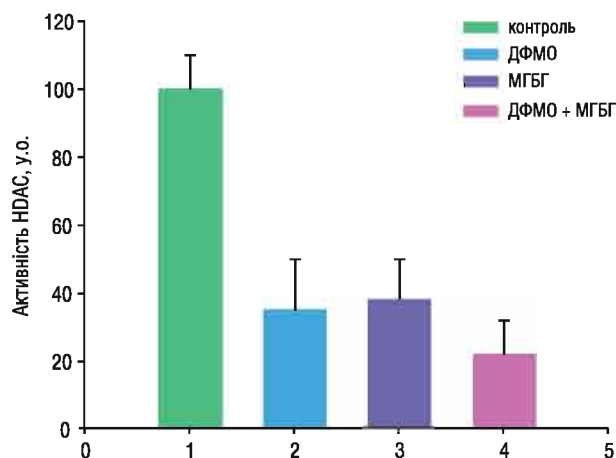


Рис. 2. Вплив ДФМО, МГБГ та їх поєднання на активність HDAC у клітинах експериментального лейкозу L1210 при дії *in vivo* протягом 28 год

стає незначно вищим, ніж у контролі) (рис. 3 а). При більш тривалій (4 год) дії ДФМО у поєднанні з МГБГ рівень метилування ДНК у клітинах L1210 продовжує знижуватися і стійко утримується на низькому рівні. Водночас зміни метилування ДНК при ізольованій дії кожного з інгібіторів мають протилежний (порівняно з описаним

вище) напрямом: при тривалій дії ДФМО рівень метилювання підвищився до такого у контролі; при дії МГБГ — достовірно ($p < 0,05$) знизився при зіставленні як із контролем, так і з даними короткочасної (60 хв) інкубації (рис. 3 б). У досліді *in vivo*, коли інгібітори синтезу поліамінів вводили тваринам із перещепленим лейкозом, рівень загального метилювання ДНК у лейкозних клітинах був нижчим, ніж у контролі, як за дії кожного з інгібіторів, так і їх комбінації (рис. 4).

Наступним етапом дослідження було вивчення активності внутрішньоклітинних РНКаз при дії інгібіторів синтезу поліамінів. При короткочасному (60 хв) блокуванні синтезу поліамінів у клітинах L1210 *in vitro* відмічають помітне (практично в 2 рази) зростання активності РНКаз, особливо при поєднаній дії двох інгібіторів — ДФМО та МГБГ (рис. 5 а). Збільшення тривалості впливу інгібіторів до 4 год супроводжувалося ще інтенсивнішим підвищенням активності внутрішньоклітинних РНКаз (рис. 5 б). Подібні результати одержані *in vivo* (рис. 6): помітне зростання активності РНКаз у клітинах лейкомії L1210 при дії ДФМО + МГБГ, ДФМО і значно меншою мірою МГБГ.

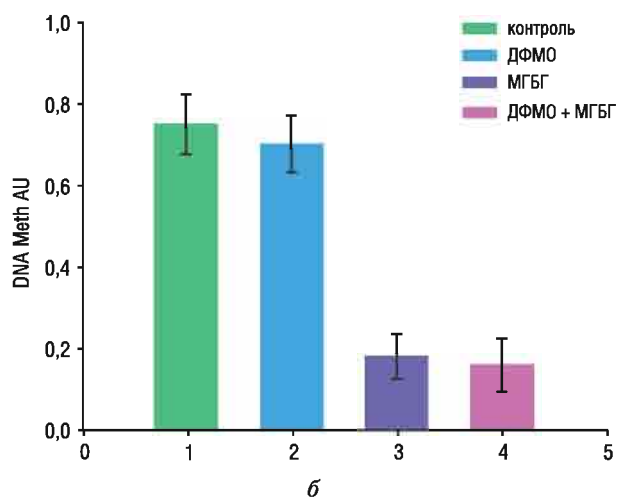
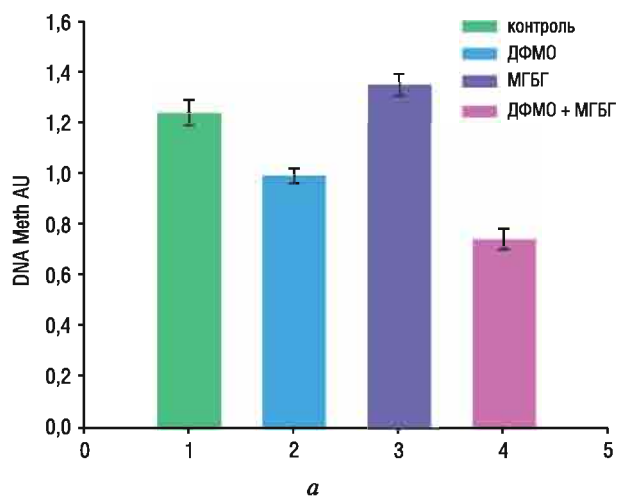


Рис. 3. Вплив ДФМО, МГБГ та їх поєднання на рівень метилювання ДНК, виділеної з клітин експериментального лейкозу L1210, при дії *in vitro* протягом 60 хв (а) і 4 год (б)

Механізм підвищення активності РНКаз при блокуванні синтезу поліамінів невідомий. Зростання ферментної активності не може бути пояснено руйнуванням або блокуванням дії природного інгібітора фермента, оскільки останній має значно більшу молекулярну масу і рухається при електрофорезі в поліакриламідному гелі набагато повільніше,

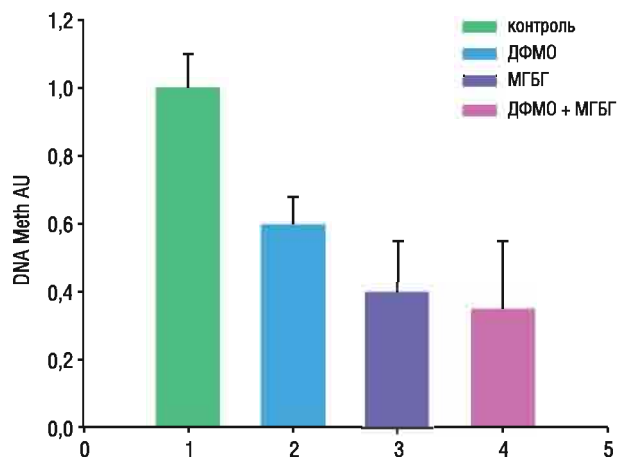


Рис. 4. Вплив інгібіторів синтезу поліамінів у дослідженні *in vivo* протягом 28 год на рівень загального метилювання ДНК у клітинах лейкозу L1210

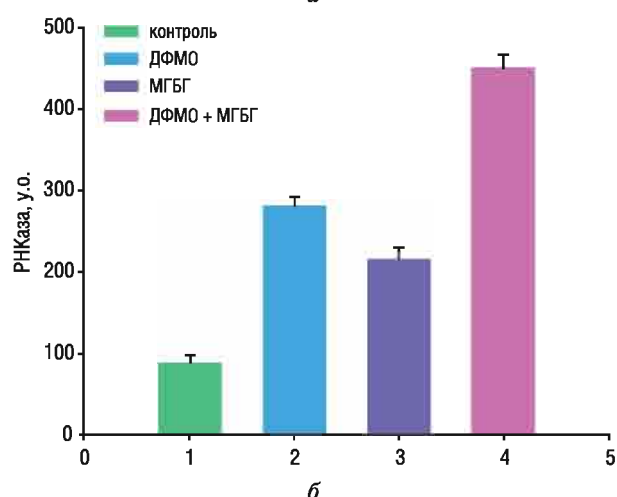
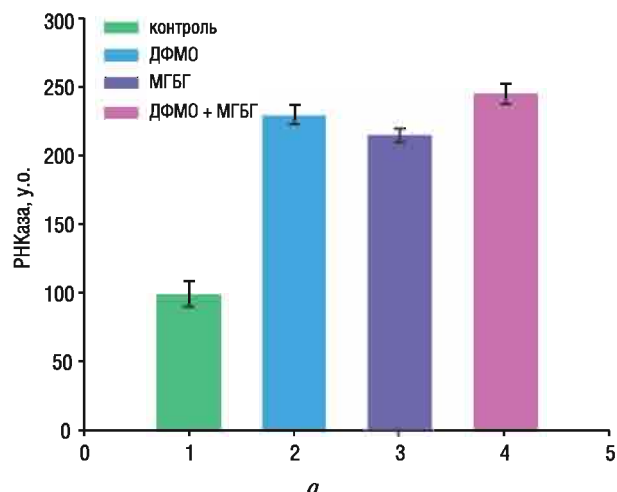


Рис. 5. Вплив ДФМО, МГБГ та їх поєднання на рівень активності РНКаз у клітинах L1210 при дії *in vitro* протягом 60 хв (а) і 4 год (б)

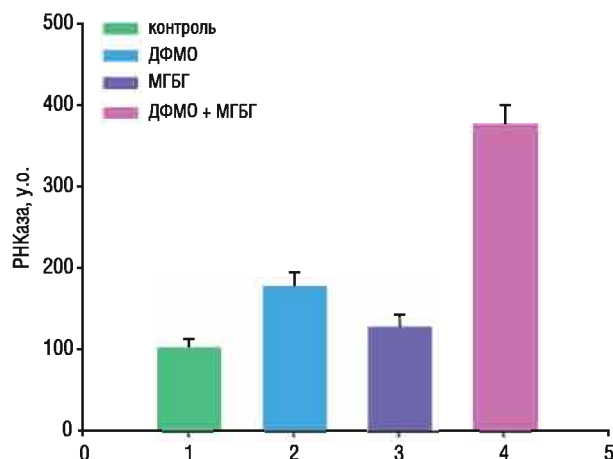


Рис. 6. Вплив інгібіторів синтезу поліамінів *in vivo* протягом 28 год на активність РНКаз у клітинах лейкемії L1210

ніж фермент. Тому підвищення активності РНКаз може бути пов'язане із синтезом фермента *de novo* або з переходом фермента з неактивної (латентної) форми у фізіологічно активну. У будь-якому разі зростання активності ферментів, що руйнують різні види внутрішньоклітинних РНК, може свідчити про значні порушення внутрішньоклітинного метаболізму лейкозних клітин. Відомо, що у багатьох випадках дія цитостатиків супроводжується підвищенням активності гідролітичних ферментів у клітинах пухлин [31, 32].

ВИСНОВКИ

Результати дослідів свідчать, що блокування синтезу поліамінів активізує дію внутрішньоклітинних факторів, які різко змінюють процеси транскрипції, трансляції та структури хроматину в пухлинних клітинах. Такі зміни у більшості випадків призводять до апоптозу, аутофагії чи інших форм клітинної смерті [23].

Застосування інгібіторів синтезу поліамінів із різним механізмом дії та їх обґрунтоване поєднання є важливим напрямом у розробці цілеспрямованого впливу на пухлинний ріст.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Herranz M, Esteller M. DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol* 2007; **361**: 25–62.
- Epigenetic Regulation and Epigenomics / Ed.: RA Meyers. Wiley-Blackwell, Ramtech Ltd, Larkspur CA USA, 2012, 1213 p.
- Эпигенетика / Под ред.: С Эллис, Т Дженювейн, Д Рейнберг. М: Техносфера, 2013. 496 с.
- Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9700–04.
- Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995; **1**: 686–92.
- Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 2005; **17** (1): 55–60.
- Greger V, Passarge E, Höpping W, et al. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Human Genet* 1989; **83** (2): 155–8.

8. McGarvey KM, Greene E, Fahrner JA, et al. DNA Methylation and Complete Transcriptional Silencing of Cancer Genes Persist after Depletion of EZH2. *Cancer Res* 2007; **67** (11): 5097–102.

9. Sawan C, Herceq Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet* 2010; **70**: 57–85.

10. Santini V, Gozzini A, Ferrari G. Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application. *Current Drug Met* 2007; **12**: 383–94.

11. Moreira J, Scheipers P, Sorensen P. The histone deacetylase inhibitor Tricho statin A modulates CD4+T-cell responses. *BMC Cancer* 2003; **3**: 30.

12. Stacy W, Remiszewski L, Sambucetti C, et al. Inhibitors of human histone deacetylase: synthesis and enzyme and cellular activity of straight chain hydroxamates. *J Med Chem* 2002; **4**: 753–7.

13. Drummond D, Noble C, Kirpotin, et al. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; **45**: 495–528.

14. Catley L, Weisberg E, Yu-Tzu Tai, et al. NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood* 2003; **7**: 2615–22.

15. Inone S, Macfarlane M, Harper N, et al. Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies. *Cell Death Differ* 2004; **2**: 193–206.

16. Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 2005; **11** (1): 71–6.

17. Bouchain G, Leit S, Frechette S, et al. Development of potential antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of a new set of sulfonamide derivatives as histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003; **46**: 820–30.

18. Mai A, Massa S, Cerbara I, et al. 3-(4-Aroyl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-propenamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 2. Effect of Pyrrole-C₂ and/or -C₄ substitutions on biological activity. *J Med Chem* 2004; **47**: 1098–110.

19. Byrd J, Marcucci G, Parthun M, et al. A phase 1 and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; **105**: 959–67.

20. Macrae I, Zhou K, Li F, et al. One molecule of the Dicer protein from *Giardia intestinalis*, which catalyzes the cleavage of dsRNA to siRNAs. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 2006; **311** (5758): 195–8.

21. Cenik ES, Zamore PD. Phosphate and R2D2 restrict the substrate specificity of Dicer-2, an ATP-driven ribonuclease. *Mol Cell* 2011; **42** (2): 172–84.

22. Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNA in cancer prognosis. *J Med* 2008; **359** (25): 2720–22.

23. Costanzi J, Sydransky D, Navon A, et al. Ribonucleases as a novel proapoptotic anticancer strategy: review of the pre-clinical and clinical data for ranpirinase. *Cancer Invest* 2005; **23** (7): 643–50.

24. Naskalski J, Kapusta M. Ribonuclease in human serum and urine expressed in arbitrary standard units of activity. *Folia Med, Kraków* 1994; **35** (1–4): 31–8.

25. Naskalski J. Proteinuria and excretion of ribonuclease in patients with chronic granulocytic leukemia. *Hematologia (Budapest)* 1987; **20** (2): 89–99.

26. Lee J, Raines R. Ribonucleases as novel chemotherapeutics: the ranpirinase example. *BioDrugs* 2008; **22**: 53–8.

27. Altomare D, Rybak S, Pei J, et al. Onconase responsive genes in human mesothelioma cells: implications for an RNA damaging therapeutic agent. *BMC Cancer* 2010; **10**: 34.

28. Trifonova E, Sapotsky M, Komarova M, et al. Protection of transgenic tobacco plant expressing bovine pancreatic

ribonuclease against tobacco mosaic virus. *Plant Cell Rep* 2007; **26** (7): 1121–6.

29. Lee J, Shogen K. Mechanisms of enhanced tumoricidal activity of multiple small dosages of ranpirnase, the novel cytotoxic ribonuclease, on lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; **62**: 337–46.

30. Lee J, Kalota A, Gewirtz A, *et al.* Antitumor efficacy of the cytotoxic RNase, ranpirnase on A549 human lung cancer xenografts of nude mice. *Anticancer Res* 2007; **27**: 299–307.

31. D'Alessio G. New and cryptic biological messages from RNases. *Trends in Cell Biol* 1993; **3** (4): 106–9.

32. Shlyakhovenko VA. Ribonuclease activity in tumors. *Exp Oncol* 2009; **31** (3): 127–133.

33. Reddi KK, Holland JF. Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; **73** (7): 2308–10.

34. Zytko J, Cantero A. Serum ribonuclease during the process of DAB carcinogenesis and tumor growth. *Canad J Biochem Physiol* 1963; **41** (12): 2391–96.

35. Leland PA, Staniszewski KE. Endowing human pancreatic ribonuclease with toxicity for cancer cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 43095–102.

36. Igarashi K, Watanabe Y, Kumagai H, *et al.* Studies on the restoration of the activities of ribonucleases by polyamines in the presence of various ribonuclease inhibitors. *J Biochem* 1977; **81** (3): 579–85.

37. Karpetsky TP, Hieter PA, Frank J J, *et al.* Polyamines, ribonucleases, and the stability of RNA. *Physiol Plantarum* 1977; **17** (2): 89–99.

38. Schmukler M, Jewett PB, Levy CC. The effects of polyamines on a residue-specific human plasma ribonuclease. *J Biol Chem* 1975; **250** (6): 2206–12.

39. Корнацький ВМ, Сілантьєва ОВ. Етичні аспекти досліджень лікарських засобів в Україні. Київ, 2010. 264 с.

40. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–4.

41. Blank A, Dekker Ch. Differential activity staining: Its use in characterization of guanylyl-specific ribonuclease in the genus *Ustilago*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1975; **72** (12): 4914–17.

EPIGENETIC CHANGES IN CELLS OF EXPERIMENTAL LEUKEMIA UNDER THE BLOCKING OF POLYAMINE SYNTHESIS

V.O. Shlyakhovenko, A.V. Verbinenko, V.O. Milinevska

Summary. Objective: the early changes of histone deacetylase and ribonuclease activity and the level of total DNA methylation in cells of experimental leukemia L1210 under the blocking of polyamine synthesis has been studied. **Objects and methods:** experimental leukemia L1210 cells, methods of global DNA methylation, evaluation of histone deacetylase activity, enzymogram method of RNase activity. **Results:** it was found that the blocking of polyamine synthesis at both the ornithine decarboxylation step (synthesis of putrescine) and the S-adenosyl methionine decarboxylation step spermidine and spermine synthesis) results in inhibition of histone deacetylase and growth of RNase activity even during the first 2–4 hours of experiment. The level of total DNA methylation in leukemic cells varied mostly downward. **Conclusions:** utilization of inhibitors of polyamine synthesis with different mechanisms of action is a promising direction in the development of targeting tumor growth.

Key Words: epigenetic changes, DNA methylation, histone acetylation, RNases, leukemia, cancer treatment.

Адреса для листування:

Шляховенко В.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: fialka@onconet.kiev.ua

Одержано: 6.12.2013