

А. Л. МНДЖОЯՆ, Б. Т. ГАРИБДЖАՆՅԱՆ, Р. А. ЗАХАРՅԱՆ, Д. К. ДЕМИРՇՅԱՆ

ИЗМЕНЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА РНК И ДНК В ТКАНЯХ ОПУХОЛЕНОСЯЩИХ КРЫС ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ ТИО-ТЭФ-ОМ

В настоящее время большинство авторов канцеростатическую активность производных этиленимина связывают с преимущественным алкилированием ДНК и РНК опухолевых клеток [5, 13, 20, 27 и др.]. В то же время исследования по влиянию алкилирующих соединений на обмен нуклеиновых кислот ограничены изучением количественных изменений РНК и ДНК [2, 3, 9, 12, 14, 26, 29 и др.] или в лучшем случае изучен основной продукт алкилирования нуклеиновых кислот—алкилированный по N₇ гуанин [10, 18, 19, 21, 25, 28, 30 и др.].

При выполнении настоящей работы нас интересовали следующие вопросы: имеются ли отличия в нуклеотидном составе РНК и ДНК между опухолью С-45 и быстро пролиферирующими тканями (селезенка, семенники) интактных животных; изменяются ли нуклеотидные составы РНК и ДНК в быстро пролиферирующих нормальных тканях животных при развитии в организме опухолевого процесса; изменяются ли нуклеотидные составы РНК и ДНК в быстро пролиферирующих тканях животных под воздействием активного противоопухолевого препарата Тио-ТЭФ-а.

Материал и методы. Проведены 2 серии опытов. В первой—определяли нуклеотидный состав НК в селезенке, семенниках интактных (без опухоли) крыс, а также в селезенке, семенниках и в саркоме 45 опухолевых крыс. В опыт брали 60 белых беспородных крыс-самцов весом 110—130 г, 30 из которых служили контролем, а 30-ти перевивали опухоль саркомы 45. Крыс держали на смешанной диете. Через 15 дней, когда опухоль достигала значительных размеров (10—15 г), животных забивали, быстро удаляли селезенку, семенники и опухоль, в которых определяли нуклеотидный состав НК. Во второй серии опытов аналогичное исследование проводили в условиях химиотерапевтического опыта с применением Тио-ТЭФ. В опыт брали 80 крыс-самцов весом 110—130 г. 40 животных перевивали С-45, на 6-е сутки крыс взвешивали, а перевитых после определения исходных размеров опухоли разделяли на подопытную и контрольную группы по 20 животных в каждой. Подопытным животным и интактным 40 крысам вводили Тио-ТЭФ (внутрибрюшинно, 1 раз в день) в дозе 2,5 мг/кг. После 10 инъекций животных повторно взвешивали и декапитировали. В удаленных органах и в опухоли, как и в предыдущей серии, определяли нуклеотидный состав НК.

С целью определения противоопухолевой активности и общетоксического действия препарата у забитых опухоленосителей определяли вес саркомы, семенника и селезенки. Процент торможения роста опухоли и общетоксического действия Тио-ТЭФ-а вычисляли по формулам Чернова [8]. Изучение нуклеотидного состава нуклеиновых

кислот у половины животных производили по методу Ванюшина [1], а у другой—после экстракции НК фенольным методом Керби [16]. Очистку нуклеиновых кислот от белка и полисахаридов производили цетавлоном [4]. Полученные нуклеотиды разделяли бумажной хроматографией, а в одном опыте для воспроизведения результатов пользовались колоночной хроматографией. При определении молярных процентов оснований были использованы расчетные коэффициенты Уайта [7].

Результаты опытов и их обсуждение. В табл. 1 и 2 отражены результаты изучения нуклеотидного состава РНК и ДНК в опухоли С-45 и в быстро пролиферирующих тканях животных до и после воздействия Тио-ТЭФ-ом. Данные показывают, что РНК селезенки, семенников безопухолевых крыс и животных с С-45, а также РНК самой опухоли по нуклеотидному составу в основном идентичны. Соотношение пар нуклеотидов комплементарных друг к другу—коэффициент специфичности $(Г+Ц/А+У)$ —во всех случаях составляет 1,3 и характеризует суммарную РНК указанных тканей как РНК типа ГЦ. Однако в нуклеотидном составе селезенки, семенников и С-45 имеются и некоторые отличия. Так, в нуклеотидном составе РНК селезенки интактных крыс и опухолевых животных преобладающим является цитозин, а РНК семенников—гуанин. Отношение пуринов к пиримидинам в первом случае в среднем составляет 0,85, а во втором—ближе к единице. РНК саркомы 45 по нуклеотидному составу почти не отличается от РНК семенников. Анализ данных, представленных в табл. 2, показывает, что по нуклеотидному составу ДНК селезенки и семенников крыс с С-45 также ничем не отличается от ДНК указанных органов интактных животных, т. е. развитие в организме опухолевого процесса не сопровождается изменением нуклеотидного состава ДНК быстро пролиферирующих тканей. Соотношение пуринов к пиримидинам, а также комплементарных друг к другу оснований $(Г/Ц, А/Т)$, во всех случаях ближе к единице, а коэффициент специфичности $(Г+Ц/А+Т)$ в среднем составляет 0,73. Следует отметить, однако, что количество тимина в ДНК саркомы 45 несколько больше, чем в ДНК селезенки и семенников интактных (без опухоли) и опухолевых крыс.

Тиофосфамид при десятикратном применении в максимально переносимой дозе у интактных животных и крыс с саркомой 45 вызывает уменьшение размеров селезенки и семенников (в среднем на 62 и 23% соответственно), а также существенное торможение роста (на 84%) саркомы 45 (рис. 1). Кроме этого, отмечаются глубокие изменения в нуклеотидном составе нуклеиновых кислот. Так, в РНК селезенки интактных крыс отмечается снижение количества гуанина (на 14%) и увеличение урацила (на 25%), а в РНК селезенки крыс с саркомой 45—снижение количества гуанина (на 13%), цитозина (на 27%) и увеличение урацила (на 43%). Аналогичные, но более выраженные изменения препарат вызывает в нуклеотидном составе РНК семенников как интактных, так и опухолевых животных. Здесь отмечается снижение количества гуанина (на 28 и 26%) и увеличение урацила (на 60 и 35%, соответственно). В результате увеличения количества пиримидинов изменяется соотношение пуринов к пиримидинам и, в частности, снижается коэффициент специ-

Таблица 2

Нуклеотидный состав ДНК селезенки, семенников и опухоли С-45 крыс до и после воздействия Тно-ТЭФ-а

| Ткань | Количество оснований в ДНК, мол. % | | | | Пурины пиримидины | Г/Ц | А/Т | $\frac{Г+Ц}{А+Т}$ |
|--------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|-------|--------|-------------------|
| | Г | А | Ц | Т | | | | |
| Селезенка интактных крыс | $21,6 \pm 0,1$ | $29,0 \pm 0,3$ | $20,4 \pm 0,4$ | $28,6 \pm 0,2$ | $1,0$ | $1,0$ | $1,0$ | $0,72$ |
| | $22,1 \pm 0,6$ | $28,0 \pm 0,5$ | $18,8 \pm 0,9$ | $30,8 \pm 0,4$ | $1,0$ | $1,1$ | $0,9$ | $0,69$ |
| Селезенка крыс с С-45 | $21,3 \pm 0,3$ | $29,0 \pm 0,4$ | $20,9 \pm 0,4$ | $28,4 \pm 0,3$ | $1,0$ | $1,0$ | $1,0$ | $0,76$ |
| | $22,0 \pm 0,4$ | $27,4 \pm 0,7$ | $19,1 \pm 0,6$ | $31,1 \pm 0,5$ | $0,98$ | $1,1$ | $0,88$ | $0,69$ |
| Семенники интактных крыс | $21,7 \pm 0,1$ | $28,7 \pm 0,1$ | $21,1 \pm 0,2$ | $28,1 \pm 0,1$ | $1,0$ | $1,0$ | $1,0$ | $0,79$ |
| | $22,9 \pm 0,3$ | $27,2 \pm 0,6$ | $19,1 \pm 0,5$ | $30,3 \pm 0,5$ | $1,0$ | $1,1$ | $0,89$ | $0,7$ |
| Семенники крыс с С-45 | $20,9 \pm 0,1$ | $29,2 \pm 0,1$ | $21,0 \pm 0,1$ | $28,6 \pm 0,2$ | $1,0$ | $1,1$ | $1,0$ | $0,76$ |
| | $21,5 \pm 0,3$ | $28,5 \pm 0,7$ | $20,0 \pm 0,2$ | $30,0 \pm 0,2$ | $1,0$ | $1,0$ | $0,9$ | $0,7$ |
| Саркома 45 | $21,0 \pm 0,4$ | $28,0 \pm 0,2$ | $20,0 \pm 0,3$ | $31,0 \pm 0,2$ | $0,96$ | $1,0$ | $0,9$ | $0,68$ |
| | $19,0 \pm 0,5$ | $28,3 \pm 0,1$ | $17,4 \pm 0,4$ | $34,8 \pm 0,9$ | $0,9$ | $1,0$ | $0,8$ | $0,57$ |

Таблица 1

Нуклеотидный состав РНК селезенки семенников и опухоли С-45 до и после воздействия Тно-ТЭФ-а

| Ткань | Количество оснований в РНК, мол. % | | | | Пурины пиримидины | $\frac{\Gamma+\Psi}{\Lambda+\Upsilon}$ | $\frac{\Gamma+\Upsilon}{\Lambda+\Psi}$ |
|---|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|--|--|
| | Г | А | Ц | У | | | |
| Селезенка интактных (без опухоли) крыс | $27,2 \pm 0,4$ | $18,8 \pm 0,1$ | $30,3 \pm 0,2$ | $23,6 \pm 0,5$ | 0,83 | $\frac{1,3}{1,0}$ | $\frac{1,0}{1,2}$ |
| | $26,7 \pm 1,0$ | $17,5 \pm 0,2$ | $29,0 \pm 1,0$ | $29,5 \pm 0,6$ | 0,79 | $\frac{1,0}{1,0}$ | $\frac{1,2}{1,2}$ |
| Селезенка крыс с С-45 | $28,2 \pm 0,2$ | $18,7 \pm 0,1$ | $30,8 \pm 0,2$ | $21,8 \pm 0,5$ | 0,88 | $\frac{1,3}{1,0}$ | $\frac{1,3}{1,3}$ |
| | $24,8 \pm 1,5$ | $20,8 \pm 1,0$ | $22,7 \pm 1,2$ | $31,3 \pm 1,0$ | 0,84 | $\frac{0,9}{0,9}$ | $\frac{1,2}{1,2}$ |
| Семенники интактных крыс | $30,5 \pm 1,2$ | $20,5 \pm 0,3$ | $27,4 \pm 1,1$ | $20,8 \pm 0,7$ | 1,0 | $\frac{1,3}{1,0}$ | $\frac{1,0}{1,0}$ |
| | $21,8 \pm 1,4$ | $18,8 \pm 0,8$ | $25,7 \pm 0,5$ | $33,3 \pm 1,8$ | 0,69 | $\frac{0,9}{0,9}$ | $\frac{1,1}{1,1}$ |
| Семенники крыс с С-45 | $31,7 \pm 0,3$ | $21,1 \pm 0,2$ | $24,2 \pm 0,2$ | $22,7 \pm 0,4$ | 1,1 | $\frac{1,2}{1,2}$ | $\frac{1,1}{1,1}$ |
| | $23,7 \pm 0,6$ | $22,5 \pm 0,9$ | $22,8 \pm 1,3$ | $30,7 \pm 1,4$ | 0,86 | $\frac{0,87}{0,87}$ | $\frac{1,1}{1,1}$ |
| Саркома 45 | $31,4 \pm 0,6$ | $19,0 \pm 0,6$ | $28,0 \pm 0,3$ | $21,3 \pm 0,5$ | 1,0 | $\frac{1,4}{1,4}$ | $\frac{1,0}{1,0}$ |
| | $29,6 \pm 0,6$ | $19,0 \pm 0,6$ | $29,9 \pm 0,4$ | $21,0 \pm 0,8$ | 0,93 | $\frac{1,4}{1,4}$ | $\frac{1,0}{1,0}$ |

Примечание: в таблицах представлены средние данные 5 проведенных опытов.

В числителе — данные до воздействия, а в знаменателе — после воздействия препарата.

фичности ($G + C/A + U$). Нетрудно заметить, что в селезенке и семенниках интактных и опухолевых крыс под воздействием тиофосфамида нуклеотидный состав РНК отклоняется от ГЦ типа в сторону АУ типа. Результаты, полученные при изучении нуклеотидного состава РНК саркомы 45, на первый взгляд кажутся «парадоксальными». Тиофосфамид, обладающий выраженной противоопухолевой активностью и способный вызывать заметные сдвиги в нуклеотидном составе РНК селезенки и семенников интактных и опухолевых животных, существенно не изменяет нуклеотидный состав РНК самой опухоли. Причиной этого, вероятно, является то обстоятельство, что Тио-ТЭФ в максимально переносимых дозах вызывает уменьшение размеров (обратное развитие) селезенки и семенников, а в саркоме 45 наблюдается лишь угнетение роста, по сравнению с контролем (рис. 1).

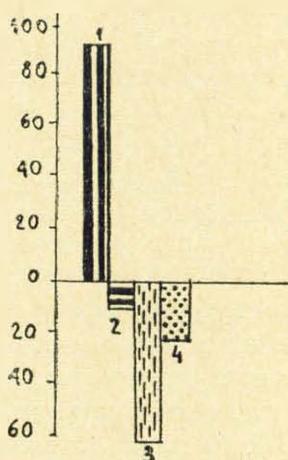


Рис. 1. Процент торможения роста опухоли (1) и изменение общего веса (2), размеров селезенки (3), семенников (4) подопытных крыс по сравнению с контролем при десятикратном внутрибрюшинном применении МПД Тио-ТЭФ-а.

Данные табл. 2 показывают, что основные сдвиги в составе оснований ДНК изученных тканей под воздействием препарата происходят за счет снижения количества цитозина и увеличения тимина, и выражены в ДНК саркомы 45. Количественные изменения гуанина и аденина незначительны, но тем не менее отмечается тенденция к повышению первого и снижению второго. Указанные сдвиги в составе ДНК приводят к повышению соотношений Г/Ц (в среднем на 6%) и снижению А/Т (на 13%). Коэффициент специфичности снижается (в среднем на 9%). Полученные результаты почти полностью были воспроизведены при применении метода Керби с использованием хроматографии на колонке Дауэкс 50 Н⁺ (табл. 3 и рис. 2).

Таким образом, тиофосфамид, широко применяющийся в клиниках для лечения различных онкологических больных, у экспериментальных животных вызывает изменения в нуклеотидном составе как РНК, так и ДНК в быстро пролиферирующих тканях организма, что указывает на

Таблица 3
Нуклеотидный состав ДНК в селезенке, семенниках и опухоли С-45 крыс после применения тиофосфамида (метод хроматографии на колонке)

| Ткань | Количество оснований в ДНК, мол. % | | | | Пурин Пуримидины | Г/Ц | А/Ц | Г+Ц А+Т |
|------------|------------------------------------|----------|----------|----------|---------------------|-----|------|------------|
| | Г | А | Ц | Т | | | | |
| Селезенка | 23,1±0,3 | 30,0±0,8 | 18,3±0,3 | 29,3±0,2 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 0,69 |
| Семенники | 20,8±0,5 | 27,4±0,6 | 20,8±0,1 | 30,7±0,8 | 0,93 | 1,0 | 0,89 | 0,7 |
| Саркома 45 | 19,0±0,4 | 25,3±0,3 | 21,0±0,7 | 34,0±0,9 | 0,8 | 0,9 | 0,74 | 0,7 |

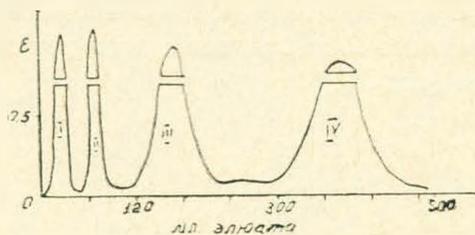


Рис. 2. Профиль разделения кислотного (НСЮ₄) гидролизата ДНК: I—тимин; II—цитозин; III—гуанин; IV—аденин. Фракции собраны по 10 мл. Тимин и цитозин на катионите даже в кислых условиях удерживаются очень слабо и выходят соответственно в I и II пике. Гуанин снимается в III пике, в IV—элюируется аденин.

глубокие извращения в обмене генетического материала клетки. Алкилирование НК *in vitro*, так же как и *in vivo*, идет по N₇ гуанина, и многие авторы как канцерогенную, так и канцеростатическую активность алкилирующих агентов связывают с преимущественным алкилированием гуанина [10, 18, 19, 21, 25, 28, 30]. Введение алкильной группы в N₇ гуанина вызывает непосредственные изменения электронной структуры оснований: при pH 7 индуцируется отрицательный заряд у N₁ [17]. Недостаток протона N₁ у алкилированного гуанина ликвидирует одну водородную связь в комплементарной паре Уотсона-Крика Г-Ц и делает возможной образование аномальной пары гуанина с тиминном в ДНК и с урацилом в РНК [6, 17]. Полученные нами данные с большой осторожностью можно интерпретировать в пользу подобного механизма. Однако, с другой стороны, апуринизация ДНК в результате отщепления алкилированного гуанина ферментативным путем [11, 23, 24] или элиминирование гуанина за счет ослабления N₃ гликозидной связи из-за протонирования имидазольного кольца [15] могут также резко нарушить матричную активность ДНК, сказавшись на нуклеотидном составе РНК. Если к этому добавить роль ферментов, избирательно гидролизующих алкилированные ДНК с выщеплением остатков основания, и роль ферментов, репарирующих разрывы в цепи ДНК [11, 15, 22, 24, 31, 32], то становится понятной сложная картина изменений в обмене нуклеиновых кислот от алкилирования, трудно поддающаяся однозначному толкованию.

Ա. Լ. ՄՆՋՈՅԱՆ, Բ. Տ. ՎԱՐԻՔՋԱՆՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Զ. Կ. ԴԵՄԻՐՃՅԱՆ

ՈՒՌՈՒՑՔԱԿԻՐ ԱՌՆՏՆՆԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ԴՆԹ-Ի ԵՎ ԴՆԹ-Ի
ՆՈՒԿԼԵՈՏԻԿԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՏԻՈ-ՏԷՖ-ՈՎ
ԱՆՑԿԱՅՐԱԾ ՔԻՄԻՈԹԵՐԱՊԻԱՅԻՑ ՀԵՏՈ

Ա մ փ ո փ ու մ

Վանյուշինի ձևափոխված մեթոդով, ինչպես նաև Կերբիի նուկլեինաթթուների ֆենոլային էկստրակցիայի եղանակով առողջ և սարկոմա 45 պատվաստած առնետների մոտ ուսումնասիրված է փայծաղի, ամորձիների և սարկոմա 45-ի ԴՆԹ-ի և ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմը տիո-տէֆ-ով անցկացրած քիմիոթերապիայի պայմաններում:

Հաստատված է, որ առողջ և ուռուցքային կենդանիների փայծաղի ամորձիների, ինչպես նաև սարկոմա 45-ի ԴՆԹ-երը իրենց նուկլեոտիդային կազմով միատեսակ են և պատկանում են ԳՅ-տիպի ԴՆԹ-երին:

Սարկոմա 45-ը իր ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմով նույնպես չի տարբերվում առողջ և ուռուցքային կենդանիների փայծաղի և ամորձիների ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմից: Տիո-տէֆ-ով անցկացրած քիմիոթերապևտիկ փորձի պայմաններում նկատվում են փայծաղի ու ամորձիների ԴՆԹ-երի նուկլեոտիդային կազմի խորը փոփոխություններ, ինչպես առողջ, այնպես էլ ուռուցքային կենդանիների մոտ, որը պատճառ է դառնում ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմի թեքման ԳՅ տիպից դեպի ԱՈՒ տիպը:

Վերը նշված հյուսվածքների և հատկապես սարկոմա 45-ի ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմում նկատվում է ցիտոզինի քանակի պակասում և թիմինի ավելացում, որի հետևանքով փոփոխվում են Գ/Յ, Ա/Թ փոխհարաբերությունները և իջնում է Գ + Յ/Ա + Թ սպեցիֆիկության գործակիցը: Տիո-տէֆ-ը, չնայած ցուցաբերած բարձր հակաուռուցքային ակտիվությանը, սարկոմա 45-ի ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմը համարյա չի փոփոխվում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ванюшин В. Б. В сб.: Современные методы в биохимии, 1, 236, М., 1964.
2. Горбачева Л. Б., Кукушкина Г. В., Соколова Н. С. В кн.: Современное состояние химиотерапии злокачественных опухолей. 191, Рига, 1968.
3. Давыдова С. Я. В кн.: Вопросы химиотерапии злокачественных опухолей, 326, М., 1960.
4. Захарян Р. А., Баев А. А. Биологический журнал Армении, XIX, 2, 1968.
5. Карузина Н. П., Тимофеевская Е. А. ДАН СССР. 178, 2, 468, 1968.
6. Росс У. Биологические алкилирующие вещества, М., 1964.
7. Уайт Г. В. В кн.: Нуклеиновые кислоты под. ред. Чаргаффа А. и Девидсона Д. Ж. И.Т., 448, 1957.
8. Чернов В. А. В кн.: Методы экспериментальной химиотерапии. 294, 1959.
9. Чернов В. А. Цитостатические вещества в химиотерапии злокачественных новообразований, М., 1964.
10. Brookes P., Lawley P. Bloch, J. 80, 496, 1961.
11. Crathorn A. R., Roberts J. J. Nature, 211, 150, 1966.
12. Davidson J. N., Freeman B. Cancer Res. 15, 1, 31, 1955.

13. Davison J. N., Cohn E. G. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology Ch. Lawley P. D. Acad. Press. New-York, 5, 89, 1966.
14. Heidelberger Ch., Keller R. Cancer Res. 3, 106, 1955.
15. Heins J. A. Reese C. B., Todd L. J. Chem. Soc. 5, 281, 1962.
16. Kirby K. S. Bioch. J. 64, 405, 1956.
17. Lawley P. D., Brookes P. Nature 192, 1081, 1961.
18. Lawley P. D., Brookes P., Magee P. N., Graddock V. U., Swann P. F. Bioch. Bioph. Acta 157, 3, 646, 1968.
19. Lee K. Y., Roe C. S. Abstr. Internat. Congr. Bioch. 4, 652, 1967.
20. Magee P. N., Valda M. Bioch. J. 104, 2, 435, 1967.
21. Magee P. N., Barness J. M. Advans. in cancer Res, 10, 164, 1967.
22. Mitsuooki M., Ichiro H. Z., Kenshi S. J. Radiat. Res. 9, 1, 19, 1968.
23. Reiter H., Strauss B., Robins M., Marone K. Bacteriol. 93, 1056, 1967.
24. Robins M., Strauss B. Federat Proc. 26, 866, 1967.
25. Schoental R. Bioch J. 102, 5, 1967.
26. Skipper H. E., Mitchell J. N., Bennet L. L., Newton M. A., Simpson L., Edison M. Cancer Res. 11, 145, 1951.
27. Smith D. W. E. Science 152, 1273, 1967.
28. Swan P. F. Nature 214, 918, 1967.
29. Ultman J. E., Hirschberg E., Gellhorn A. Cancer Res. 15, 1, 31, 1955.
30. Valda M., Graddock V. U. Bioch J. 107, 179, 1968.
31. Weiss B., Live T. K., Richardson C. C. Federat Proc. 26, 395, 1967.
32. Werly W. G., Deschamps V., Barbason H., Brakier L. Bioch. Bioph. Acta, 161, 2, 548, 1966.