

## Исследование противоопухолевой активности модифицированных тиотэфом нуклеиновых кислот и нуклеотидов в опытах *in vivo*

Т. П. Волощук, Ю. В. Пацковский, А. И. Потопальский, И. И. Воробьева

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

E-mail: potopalsky@imbg.org.ua

---

*В экспериментах на мышах с перевивной карциномой Эрлиха установлено противоопухолевое действие алкилированных тиотэфом препаратов ДНК разного происхождения (селезенки крупного рогатого скота, спермы лосося, эритроцитов цыплят), дрожжевой РНК и мононуклеотидов — АТР и ГТР. Терапевтические дозы (100—300 мг/кг массы) указанных препаратов обеспечивают торможение роста опухолей на 90—100 % при токсической дозе ЛД<sub>50</sub> порядка 1,5—2 г/кг. Препараты ДНК, модифицированные монофункциональными алкилирующими агентами (этиленмином и моноэтиленминдиэтилфосфатом), выраженным противоопухолевым действием не обладают.*

---

**Введение.** Ранее при алкилировании оснований нуклеиновых кислот трифункциональным алкилирующим агентом — тиотэфом — нами установлено образование как минимум четырех типов алкильных радикалов [1]. Если реакции алкилирования проводить в слабокислых (рН 5—5,5) и нейтральных средах, то модифицированные тиотэфом препараты содержат преимущественно радикал R1, образующийся в результате размыкания одного азиридинового цикла тиотэфа. В кислых средах, применяемых для увеличения выхода продуктов модификации, происходит размыкание всех трех циклов тиотэфа и гидролиз его Р-N связей с образованием радикала R (см. схему). Последний является также единственным радикалом при алкилировании этиленмином (ЭИ). В нашей предыдущей работе [2] представлены данные по изучению влияния этих двух «крайних» радикалов на метаболизм раковой клетки.

Показано, что наиболее эффективными в плане биологического действия на опухолевую клетку являются препараты, несущие радикал R1. Такие препараты оказываются не только алкилированными, как препараты с радикалом R, но и сами

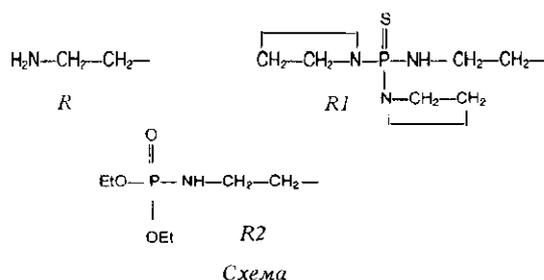
обладают способностью алкилировать, т. е. подобно тиотэфу являются алкилирующими агентами.

В настоящей работе для изучения противоопухолевого действия алкилированных нуклеиновых кислот (НК) и некоторых отдельных их компонентов в опытах *in vivo* использованы препараты ДНК, содержащие радикалы R, R1 и R2. Последний присутствует в препаратах ДНК, алкилированных моноэтиленминдиэтилфосфатом (МЭФ), и имеет, как и тиотэф, в своем составе фосфор и один (аналогично этиленмину) азиридиновый цикл.

**Материалы и методы.** Алкилирующие агенты — тиотэф и МЭФ — получены по известным методикам [3, 4]. Методы получения препаратов алкилированных нуклеотидов и ДНК приведены в работах [5, 6]. ЭИ (Ереванский завод химреактивов, Армения) применяли после перегонки и хранения над NaOH.

В работе использованы АТР, ГТР, УТР (5'-нуклеотиды), препараты ДНК из эритроцитов цыплят фирмы «Reanal» (Венгрия), ДНК из спермы лосося, селезенки крупного рогатого скота и дрожжевая РНК (Олайнский 3-д химреактивов, Литва).

Опухоли перевивали внутрибрюшинно 2—2,5-месячным мышам-самцам линии BALB/c массой



20—25 г. Линии животных взяты в питомнике АМН «Столбовая» (РФ). Для заражения животных использовали хорошо перевиваемую (100 %-я приживаемость) асцитную форму карциномы Эрлиха с латентным периодом 4—5 дней и гибелью животных на 10—16-й день. На 7—8-й день после перевивки асцитную жидкость со взвешенными в ней опухолевыми клетками извлекали при помощи шприца из брюшной полости больных животных и вводили подопытным по 0,2 мл внутривенно. Спустя несколько дней (обычно на 4-й день) после перевивки, когда опухоль начинала прорастать, вводили исследуемые противоопухолевые препараты, растворенные в воде. Введение производили 5 раз с интервалом в 24 ч. Забивали животных под эфирным наркозом через сутки после последнего введения препаратов.

Противоопухолевую активность изучаемых препаратов оценивали по проценту торможения ( $T$ ) роста опухоли, который определяли по разнице массы опухолей контрольной и опытной групп животных [7]:

$$T = (M_x - M_0) \cdot M_x^{-1} \cdot 100 \%^{-1},$$

где  $M_x$  и  $M_0$  — средняя масса опухолей животных контрольной и опытной групп.

**Результаты и обсуждение.** Введение животным алкилированных ДНК на ранних стадиях развития опухоли (обычно на 4-й день) приводило к заметному торможению ее роста, дифференциации клеток и активации апоптоза.

На более поздних стадиях (8-й день) замедление роста опухоли сопровождалось повышенной гибелью опухолевых клеток, что приводило к сильной интоксикации животных и, как следствие, противоопухолевый эффект препарата практически не проявлялся. Спонтанного излечения подопытных животных не наблюдалось.

Все алкилированные тиотэфом ДНК независимо от их происхождения (ДНК селезенки крупного рогатого скота, спермы лосося, эритроцитов цыплят) в терапевтических дозах (100—300 мг/кг массы животного) вызывали торможение роста опухолей на 90—100 % (при токсической дозе ЛД<sub>50</sub>

порядка 1,5—2 г/кг), тогда как исходные нативные кислоты не проявляли эффекта торможения, а некоторые из них при дозе 300 мг/кг даже несколько стимулировали рост опухоли (таблица). Меньший эффект давало алкилирование дрожжевой РНК, которая до модификации угнетала рост опухоли на ~ 48 %. Алкилирование усиливало этот процесс, но 100 %-го торможения роста не наблюдалось даже при более высокой терапевтической дозе (500 мг/кг).

Менее эффективными, чем ДНК, оказались и алкилированные тиотэфом 5'-нуклеотиды (АТР, ГТР), а влияние алкилированного препарата УТР практически не отличалось от такового немодифицированного нуклеотида. Последнее объясняется, на наш взгляд, различной реакционной способностью исследуемых нуклеотидов. Как показано нами ранее [5], АМР и ГМР алкилируются как по фосфатной группе, так и (что более важно) по основанию пуринового гетероцикла, когда имеет значение даже сайт алкилирования [2]. Низкоректионноспособное пиримидиновое основание в УМР практически не модифицируется, а алкилирование только фосфатной группы нуклеотида никак не сказывается на его биологической активности. Обладая изначально значительным ингибирующим эффектом (83 % торможения роста опухоли), УТР после алкилирования почти не изменяет своей активности (86 %).

Нативные АТР и ГТР по-разному влияют на опухолевые клетки, и если ГТР тормозит их рост более чем на 50 %, то АТР, как это видно из таблицы, даже несколько стимулирует его. Алкилирование нуклеотидов усиливает их ингибирующее действие, но в более высоких по сравнению с ДНК терапевтических дозах, а торможение роста опухоли не достигает 100 %, наблюдаемых для ДНТ при более низких концентрациях. Более того, дальнейшее увеличение дозы алкилированного нуклеотида, как это показано на примере АТР, не прибавляет препарату эффективности — высокий процент торможения роста опухоли при терапевтической дозе 400 мг/кг ( $\approx 97$  %) снижается с увеличением концентрации препарата ( $\approx 88$  и 78 % при концентрации 500 и 800 мг/кг соответственно).

Еще менее эффективными оказались ДНК, модифицированные монофункциональными алкилирующими агентами — МЭФ и ЭИ, сдерживающими рост опухоли в среднем на 44 и 36 % соответственно. Одной из причин, объясняющих этот факт, может быть то, что модифицированные радикалом R1 ДНТ обладают большей гидрофобностью, чем препараты с радикалом R, и поэтому

*Противоопухолевая активность нативных и алкилированных тиотэфом нуклеиновых кислот и мононуклеотидов на модели карциномы Эрлиха*

Препарат	Количество животных (контроль/опыт)	Доза, мг/кг (разовая/курсовая)	Торможение роста опухоли, %
Тиотэф	8/7	3/15	53,5±3,2
ДНК1	10/10	300/1500	-24,3±18,7
ДНТ1-R1	10/8	100/500	92,4±5,1***
	10/10	300/1500	100***
ДНК2	9/7	300/1500	-26,3±19,4
ДНТ2-R1	6/10	300/1500	100***
ДНК3	10/8	200/1000	12,7±10,4
ДНТ3-R1	10/10	200/1000	100***
РНК дрожжей	10/8	200/1000	47,7±10,2
РНТ-R1 дрожжей	10/7	200/1000	91,3±5,0**
	10/7	500/2500	99,8***
АТР	6/10	200/1000	-18,2±14,4
АТР-R1	8/10	200/1000	79,4±11,2***
	10/10	400/1000	97,3±2,2***
	5/8	500/2500	88,3±6,7***
	7/9	800/4000	78,5±9,2***
GTP	8/10	500/2500	56,4±18,7
GTP-R1	8/10	250/1250	93,2±5,4
	5/8	500/2500	98,5±1,2*
УТР	7/10	200/1000	82,7±10,2
УТР-R1	7/10	200/1000	86,4±8,5
ДНК1-R (ЭИ)	8/10	300/1500	35,9±12,1
ДНК1-R2 (МЭФ)	8/10	300/1500	44,3±11,8

Примечание. ДНК1 — препарат ДНК селезенки крупного рогатого скота; ДНК2 — препарат ДНК спермы лосося; ДНК3 — ДНК эритроцитов цыплят. Препараты вводили внутривенно, начиная с 4-х сут после перевивки, с интервалом в 24 ч. Различия между модифицированными препаратами и их немодифицированными аналогами статистически достоверны: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

легче адсорбируются на клеточной мембране и проникают через нее. Тем не менее, эффект торможения роста опухоли присутствует и здесь, поскольку немодифицированные ДНК могут проявлять пусть и слабый, но стимулирующий эффект ( $\approx 25$  % для ДНК селезенки крупного рогатого скота и спермы лосося).

Таким образом, приведенные данные показывают перспективность использования в качестве противоопухолевых средств алкилированных препаратов ДНК разного происхождения, модифицированных полифункциональными алкилирующими агентами, и соответственно низкую эффективность применения препаратов алкилированных ДНК монофункциональными алкилирующими агентами.

Менее действенными в сравнении с препаратами ДНК выступают и их алкилированные компо-

ненты, в данном случае — нуклеотиды. Очевидно, это объясняется тем, что транспорт олигонуклеотидов (коими оказываются алкилированные ДНК в результате их апуринизации и фрагментации) в клетки опосредован специфической системой переноса через клеточную мембрану [8], тогда как для мономерных алкилированных компонентов НК этот путь затруднен.

*T. P. Voloshchuk, Yu. V. Patskovskii, A. I. Potopalskii, I. I. Vorobyeva*

Research of antitumor activity of thioTEPA alkylated nucleic acid and nucleotides *in vivo*

Summary

*The antitumor activity of the thioTEPA alkylated DNA preparations of various origin (cattle spleen, salmon sperm, chicken erythrocytes), yeast RNA and mononucleotides — ATP and GTP has*

been established in the experiments in vivo on mice with interweave Ehrlich carcinoma. The therapeutic doses (100–300 mg/kg of the weight) of these preparations insured the tumor growth inhibition by 90–100 % at the toxic dose  $LD_{50}$  between 1.5 and 2 g/kg. The DNA preparations, modified by monofunctional alkylating agents (ethylenimine and monoaziridinediethylphosphate), have no noticeable antitumor effect.

Т. П. Волошук, Ю. В. Пацковский, А. И. Потопальский,  
І. І. Воробйова

Дослідження протипухлинної активності модифікованих тіоетфом нуклеїнових кислот і нуклеотидів у дослідях *in vivo*

#### Резюме

В експериментах на мишах з перевитою карциномою Ерліха встановлено протипухлинну дію алкілованих тіоетфом препаратів ДНК різного походження (селезінки великого рогатого скоту, сперми лосося, еритроцитів курчат), дріжджової РНК та мононуклеотидів — АТР і ГТР. Терапевтичні дози (100–300 мг/кг маси) згаданих препаратів забезпечують гальмування росту пухлин на 90–100 % при токсичній дозі  $LD_{50}$  у межах 1,5–2 г/кг. Препарати ДНК, модифіковані монофункціональними алкідувальними агентами (етиленіміном і моноетиленіміндіетилфосфатом), не мають вираженої протипухлинної дії.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волошук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленimina. 1. Алкилирование оснований // Биоорг. химия.—1990.—16, № 7.—С. 981–990.
2. Волошук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И.,

Воробьева И. И. Влияние модифицированных тиоетфом ДНК и их мономерных компонентов разной степени алкилирования на синтез нуклеиновых кислот опухолевых клеток // Биополімери і клітина.—2003.—19, № 6.—С. 513–519.

3. Лидак М. Ш., Гиллер С. А., Медис А. Я. К синтезу тиоетфа // ТиоТЭФА.—Рига: Изд-во АН Латв.ССР, 1961.—С. 5–8.
4. Гречкин Н. П. Фосфорорганические производные этиленimina. Сообщ. 1. Взаимодействие этиленimina с хлорангидридами диалкилфосфорных кислот // Изв. АН СССР. Сер. Хим.—1956.—№ 5.—С. 538–543.
5. Волошук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленimina. 3. Алкилирование нуклеотидов // Биоорг. химия.—1993.—19, № 5.—С. 562–569.
6. Волошук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленimina. 4. Алкилирование гомополинуклеотидов и ДНК // Биоорг. химия.—1999.—25, № 6.—С. 464–473.
7. Жданов Г. Л. Методы изучения соединений с предполагаемым противоопухолевым действием // Модели и методы экспериментальной онкологии.—М., 1960.—С. 201–243.
8. Loke S. L., Stein C. A., Zhang H. H. Characterization of oligonucleotide transport into living cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86, N 11.—P. 3474–3478.

УДК 577.123.5 + 615.277  
Надійшла до редакції 05.06.03