

УДК 577.323.2 : 547.963.32

## МОДИФИКАЦИЯ ДНК АЛКИЛИРУЮЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

*Круглякова К. Е.*

Представлены результаты исследования физико-химических свойств алкилирующих соединений — нитрозоалкилмочевин (НАМ), обладающих широким спектром биологического действия — мутагенного, канцерогенного и противоопухолевого за счет алкилирования и карбамоилирования ДНК, а также других компонентов клетки. Приведены идентифицированные химические продукты взаимодействия НАМ с ДНК и ее компонентами. Рассмотрены структурные превращения макромолекулы ДНК вследствие ее химической модификации. Обсуждены возможные биологические последствия модификации ДНК с помощью НАМ.

Библиография — 148 ссылок.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	1527
II. Химические и физико-химические свойства НАМ . . . . .	1527
III. Химические продукты реакции НАМ с ДНК и ее компонентами . . . . .	1529
IV. Структурные изменения ДНК, модифицированной НАМ . . . . .	1531
V. Биологические последствия химической модификации ДНК . . . . .	1534

## I. ВВЕДЕНИЕ

Алкилирующие соединения, обладающие широким спектром биологического действия, давно привлекают внимание исследователей. Знание механизмов действия этих соединений на важнейшие биополимеры клетки позволит направлению использовать эти вещества для получения желаемого эффекта. Среди алкилирующих соединений наибольший интерес представляют нитрозоалкилмочевины (НАМ), которые в последние годы интенсивно изучаются как химические мутагены [1—10], канцерогены [11—17] и противоопухолевые вещества [18—21].

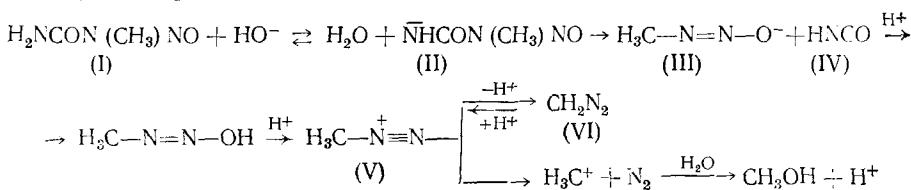
Академик Н. М. Эмануэль и его ученики многие годы широко использовали методы физической химии и химической кинетики для изучения ряда важнейших биологических систем [22—26], биохимических реакций [27—29], различных патологических процессов [30—33]. Открытые ими противоопухолевые свойства НАМ и внедрение в клиническую практику N-нитрозо-N-метилмочевины (НММ) как средства для лечения недифференцированного рака легкого и лимфогранулематоза [18] стимулировали в последние годы широкий синтез новых производных НАМ, изучение физико-химических свойств и молекулярных механизмов действия этих соединений с целью выявления НАМ, наиболее эффективных для практического использования.

Одной из основных (и, может быть, главных) причин биологического действия НАМ могут быть реакции, связанные с нарушением функционирования генома клетки за счет модификации ДНК, в результате алкилирования и карбамоилирования макромолекулы.

## II. ХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАМ

На примере одного из изученных представителей нитрозоалкилмочевин — НММ — можно проанализировать некоторые реакции НАМ. Установлено, что НАМ легко гидролизуются в водных растворах, причем скорость гидролиза существенно изменяется в зависимости от состава среды, pH, температуры и других факторов. Общая схема превращений НММ в водном растворе может быть представлена следующим об-

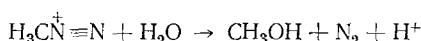
разом [34—41]:



Под действием гидроксил-ионов происходит отрыв протона от атома азота молекулы НММ (I) с образованием аниона мочевины (II), который превращается в анион диазотата (III) и изоциановую кислоту (IV).

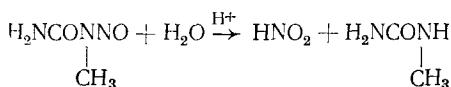
Первая стадия распада НММ является в этом случае лимитирующей и протекает по псевдопервому порядку. Это служит основой для метода титрования НММ щелочью [37], который применяется наряду с другими химическими методами изучения кинетики этой реакции [38, 39]. Образовавшийся анион (III) под действием протонов превращается в метилдиазоний-катион (V). В сильно щелочной среде образуется диазометан (VI), являющийся алкилирующим агентом [40].

В нейтральной среде диазоалканы обычно не образуются, и метилирующие свойства в этом случае обусловлены метилдиазоний-катионом [41], при присоединении которого к нуклеофильным агентам выделяется азот. В водной среде происходит гидролиз с образованием метилового спирта:



Скорость превращения НММ в водном растворе особенно зависит от pH раствора, причем установлено, что в буфере Бриттон-Робинсона период полупревращения НММ уменьшается с увеличением pH среды. На превращения НММ в водных растворах влияет состав среды. В присутствии буферных смесей (фосфатный, фосфатно-цитратный буфер) наблюдается увеличение скорости превращения НММ за счет действия нуклеофилов [42].

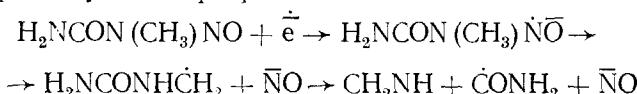
В кислой среде одним из продуктов превращения НММ является азотистая кислота [38, 39], способная, как известно, быть дезаминирующим агентом [43].



Таким образом, видно, что в зависимости от условий превращения НММ в различных средах могут образовываться продукты нескольких типов: диазометан ( $\text{pH} > 7$ ), метилдиазоний-катион и изоциановая кислота ( $\text{pH} \sim 7$ ), а также азотистая кислота ( $\text{pH} < 7$ ). Эти продукты в реакциях с нуклеиновыми кислотами и их компонентами могут проявлять свои характерные свойства и модифицировать биомакромолекулы.

Анализ химической природы и электронной структуры НММ позволил установить, что НММ обладает донорно-акцепторными свойствами, которые могут быть ответственными за разнообразные проявления биологической активности НММ.

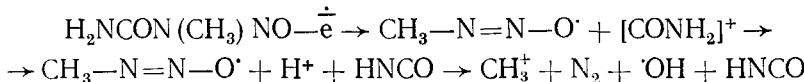
Методами квантовой химии и ЭПР показано, что  $\text{NO}$ -группа молекулы НММ может выступать как в качестве акцептора, так и в качестве донора электрона [44—46]. При захвате электрона  $\text{NO}$ -группой возможны, например, следующие превращения:



Радикал  $\dot{\text{C}}\text{ONH}_2$  может выступать как карбамоилирующий агент.

Донорные свойства НММ обусловлены отрывом электрона от атома азота  $\text{NO}$ -группы с образованием катион-радикала, который, распада-

ясь, по-видимому, может образовывать следующие продукты:



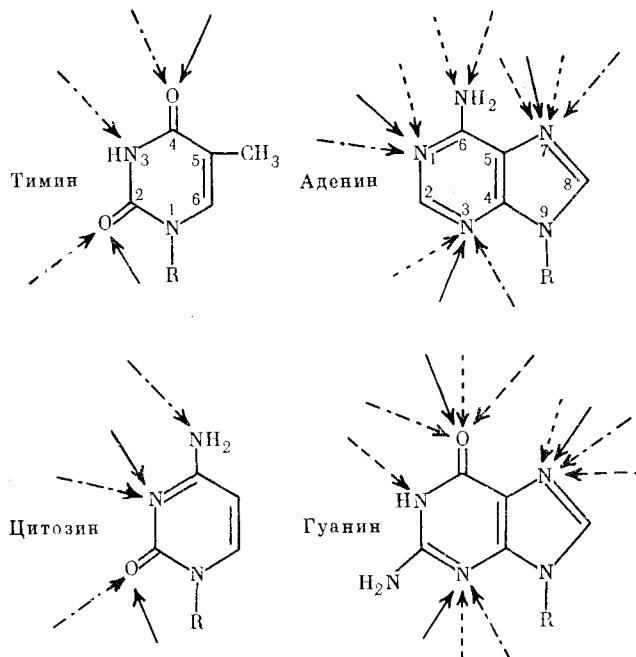
В этом случае химическая активность НММ определяется в основном радикалом  $\text{CH}_3\text{N}=\text{NO}^\cdot$ , взаимодействие которого с биомакромолекулами может приводить к метилированию. Карбамоилирование осуществляется за счёт  $\text{HNCO}$ .

Экспериментально, в условиях фотосенсибилизированного переноса электрона, в присутствии акцептора (донора) электрона в замороженном растворе НММ методом ЭПР были зафиксированы радикалы  $\text{CONH}_2$ ,  $\text{CH}_3-\text{N}=\text{NO}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{NCON}(\text{H})\dot{\text{C}}\text{H}_2$  [45].

### III. ХИМИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ РЕАКЦИИ НАМ С ДНК И ЕЕ КОМПОНЕНТАМИ

Для выяснения молекулярного механизма биологического действия НАМ важно было определить основные участки биомакромолекул, которые могут модифицироваться под действием НАМ. Первые исследования механизма действия производных НАМ были направлены на изучение их алкилирующих свойств.

Объектами изучения были нуклеозиды [40, 47], нуклеотиды [48, 49], полинуклеотиды [50], нуклеиновые кислоты [7]. Установленные места алкилирования оснований нуклеиновых кислот схематично могут быть представлены следующим образом ( $\text{R}$  — остаток рибозы или дезоксирибозы):



Стрелками указаны направления алкилирования оснований, в составе:

нуклеозидов —→  
нуклеотидов (полинуклеотидов) - - - →      однотяжевой ДНК —→  
двутяжевой ДНК - - - →

Алкилирование трифосфатных групп с образованием моноэтилового эфира АТФ (11% от общего количества алкильных групп) показано в модельных экспериментах с АТФ и нитрозоэтилмочевиной (НЭМ) [49].

Возможность алкилирования ДНК впервые была установлена по образованию 7-метилгуанина в реакции ДНК с НММ [51]. Позже были идентифицированы девять метилированных производных в реакции

ДНК с НММ *in vitro*: 1-метиладенозин, 3-метиладенин, 7-метиладенин, 3-метилгуанин, 6-O-метилдезоксигуанозин, 7-метилгуанин, 3-метилдезоксицитидин, 3-метилтимидин, 4-O-метилтимидин. С наибольшим выходом образуются 3-метиладенин (11,2%  $^{14}\text{C}$ ) и 7-метилгуанин (75,7%  $^{14}\text{C}$ ), с наименьшим 4-O-метилтимидин (0,1%  $^{14}\text{C}$ ). Количество алкилированных фосфатных групп составляло 18% от общей радиоактивности, приходящейся на ДНК [52, 53].

Следует отметить, что в тех случаях, когда реакция НММ протекает с полинуклеотидами, не содержащими остатка гуанина, доля алкилирования фосфатных групп резко возрастает. Так, например, по данным работы [54], для ДНК, модифицированной НММ, этот выход составляет 18%, а согласно данным работы [55], при действии  $^{14}\text{CH}_3\text{-НММ}$  на полиадениловую кислоту 23% выхода обусловлены алкилированием оснований, а остальные 77% связаны с образованием фосфотриэфиров. Разница в выходах алкилированных фосфатных групп часто объясняется различными условиями проведения экспериментов, а также нестабильностью продуктов в щелочных средах [56].

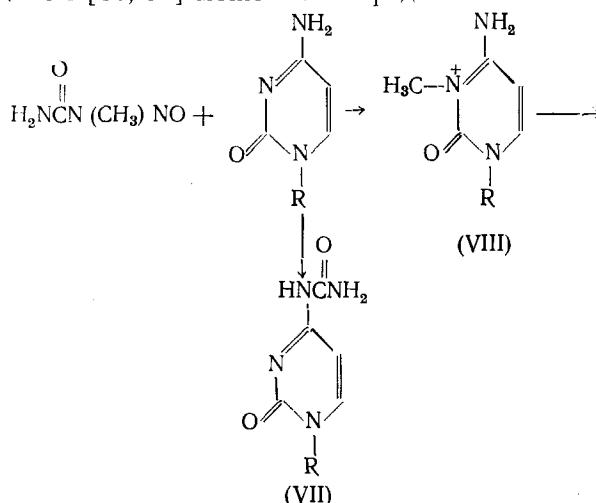
Метильные и этильные фосфотриэфиры образуются в ДНК при действии большинства алкилирующих канцерогенов и достаточно продолжительное время в ней удерживаются [54, 57]. Динуклеотид, содержащий алкилированные фосфатные группы, был выделен при гидролизе ДНК, модифицированной НММ [57].

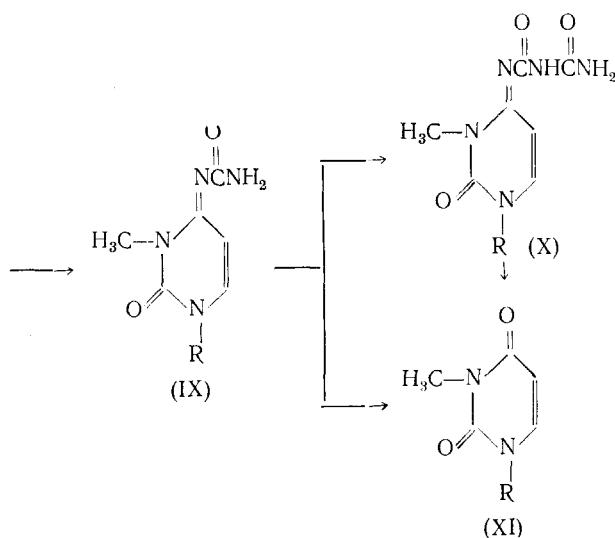
Сравнительное изучение реакционной способности различных алкилирующих соединений: диметилсульфата, диэтилсульфата, НЭМ и НММ по отношению к фосфодиэфирной связи ДНК позволило установить, что эффективность взаимодействия была наименьшей у диметилсульфата и наибольшей у НММ. Это, по-видимому, может быть объяснено тем, что в случае НММ и НЭМ промежуточным продуктом реакции является алкилдиазониевый катион, электростатически взаимодействующий с ДНК [58].

Впервые возможность карбамоилирования молекулы ДНК в реакции с НММ была показана в работе [59] с помощью меченых атомов. Раствор ДНК в течение 72 ч обрабатывали меченой по карбонильному углероду НММ с последующим отделением избытка НММ (соотношение концентрации НММ к фосфору ДНК составляло 100 : 1).

Гидролиз модифицированной  $^{14}\text{C}$ -ДНК до апуриновой кислоты с последующим разделением продуктов реакции на эктеола-целлюлозе показал наличие метки в апуриновом фрагменте. Было сделано предположение, что метка находится в фосфатном фрагменте ДНК и (или) в цитозине.

В параллельных экспериментах с нуклеозидами, полинуклеотидами, РНК и ДНК [60—67] была подтверждена возможность карбамоилирования фосфатных групп и  $\text{NH}_2$ -группы цитозина. Общая схема реакции НММ с цитидином [60, 61] может быть представлена в следующем виде:

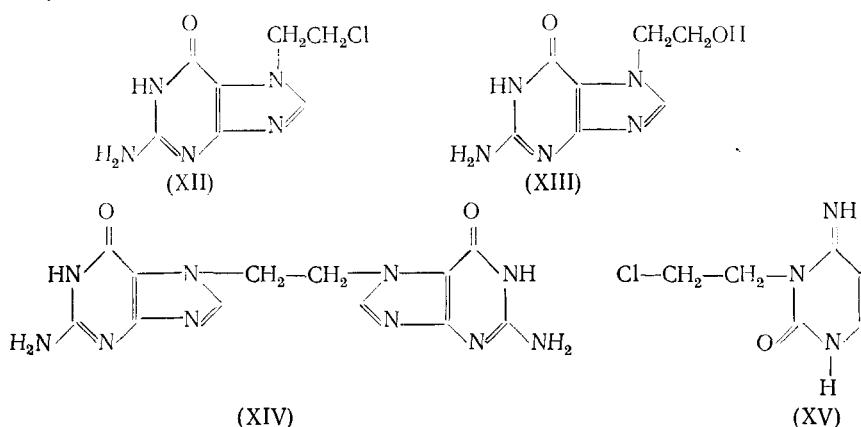




где  $\text{R}$  — остаток рибозы, (VII) — 4-N-карбамоилцитидин, (VIII) — 3-метилцитидин, (IX) — 3-метил-4-N-карбамоилцитидин (X) — 3-метил-4-N-дикарбамоилцитидин, (XI) — 3-метилуридин. Видно, что реакция цитидина с НММ идет по двум путям — только карбамоилирование (VII), либо алкилирование с последующим карбамоилированием (VIII), (IX), (X). Продукты карбамоилирования легко гидролизуются с образованием соединения (XI). Аденозин и гуанозин в реакции с НММ образуют продукты карбамоилирования — 6-N-карбамоиладенозин, 1-метил-6-N-карбамоиладенозин, 2-N-карбамоилгуанозин [62].

Широко изучаются также хлоралкилпроизводные нитрозомочевин [68—71]. Как и НММ, эти соединения разлагаются с образованием дигидроксидов, алкилирующих основания и фосфатные группы нуклеиновых кислот, а также изоцианатов, карбамоилирующих белки, ферменты и анииды [72]. Идентифицированы такие продукты взаимодействия НАМ с нуклеозидами и основаниями ДНК, как 7-хлорэтилгуанин (XII), 7-оксиэтилгуанин (XIII), 1,2-дигуанилэтан (XIV), 3-хлорэтилцитозин (XV) и другие [73—76].

Установлено, что в реакциях хроматина с галогенэтильными нитрозомочевинами возможно образование сшивок ДНК — белок и ДНК — ДНК, существенно влияющих на метаболизм клетки [71, 76].



#### IV. СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДНК, МОДИФИЦИРОВАННОЙ НАМ

Химическая модификация ДНК (алкилирование, карбамоилирование и др.) может приводить к существенным изменениям в структуре ДНК. Часть повреждений может ликвидироваться за счет работы фер-

ментов системы reparации. Нерепарируемые нарушения структуры изменяют нормальное функционирование генома клетки.

Структурные изменения в молекуле ДНК (однотяжевые, двутяжевые разрывы и др.) наблюдали *in vitro* и *in vivo* многие исследователи при действии на ДНК обычных алкилирующих соединений [77—79]. Алкилирование оснований может приводить к деградации цепей ДНК за счет депуринизации, которая в результате последовательных превращений в цепи ДНК ведет к разрыву сахаро-фосфатных связей молекулы [80—82]. Алкилированные фосфатные группы ДНК—фосфотриэфиры—образуются под действием большинства алкилирующих соединений, они неустойчивы в щелочной среде, но достаточно термостабильны [83].

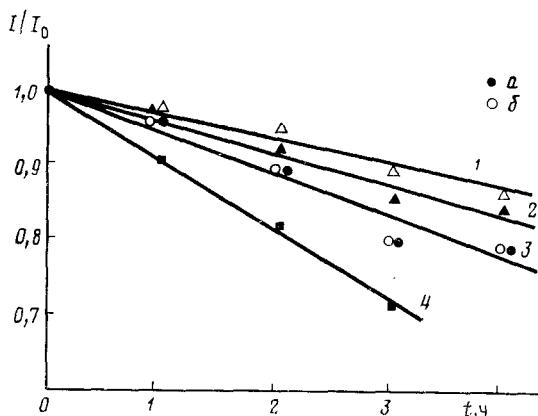


Рис. 1. Зависимость отношения интенсивности ряда полос ИК-спектра модифицированной ДНК к интенсивности полос ИК-спектра нативной ДНК от времени взаимодействия ДНК с НММ: 1 — 960  $\text{см}^{-1}$  (колебания сахаро-фосфатных связей), 2 — 1605  $\text{см}^{-1}$  (колебания аминогрупп оснований), 3 — 3350  $\text{см}^{-1}$  (а), 3200  $\text{см}^{-1}$  (б) (колебания аминогрупп оснований), 4 — 1580  $\text{см}^{-1}$  (колебания сопряженных двойных связей оснований) [30].

Для обнаружения химической модификации ДНК можно использовать метод ИК-спектроскопии, применение которого к нуклеиновым кислотам и их компонентам широко обсуждается в обзорах и монографиях [84–87]. Было установлено, что в ИК-спектре пленок ДНК, модифицированной НММ наблюдается изменение интенсивности ряда полос, хотя в целом вид спектра меняется незначительно [30, 88]. На рис. 1 представлено изменение интенсивности ряда полос ИК-спектра ДНК в зависимости от времени взаимодействия с НММ. Видно, что поглощение ряда групп и связей ДНК (аминогрупп и сопряженных двойных связей оснований, а также сахарофосфатных связей) уменьшается в ходе реакции. Это указывает на то, что в течение первых трех часов реакции НММ с ДНК может происходить дезаминирование, разрыв двойных связей оснований и цепей ДНК скорее всего, как последствие метилирования и карбамоилирования оснований.

Сочетание различных методов физико-химического и биохимического анализа [88—95] позволило идентифицировать и количественно оценить основные типы структурных нарушений ДНК под действием НММ. Суммарное повреждение структуры макромолекулы, определяемое методом вискозиметрии после термической денатурации ДНК ( $10,4 \pm 1,0$ ) и кинетическим формальдегидным методом (КФ-метод) [88] ( $11,0 \pm 1,0$ ), хорошо согласуются между собой. Применение методов нейтрального и щелочного электрофореза в агарозных гелях и ферментативной обработки модифицированной ДНК эндонуклеазой  $S_1$  [92, 96], специфичной к однотяжевым участкам ДНК [93, 94], позволило определить соотношение между количеством двутяжевых разрывов (ДР), однотяжевых разрывов (ОР), щелочелабильных участков (ЩЛУ) и термолабильных участков (ТЛУ) [89].

В соответствии с этим находятся данные, полученные методом импульсной полярографии [91]. Было показано, что в ДНК, обработанной НММ, после термической денатурации образуется значительно больше ОР, чем при непродолжительном действии щелочи. Термолабильные участки, по-видимому, содержат алкилированные нуклеотиды, глюкозидная и фосфоэфирная связи которых ослабляются при повышении температуры [97].

Оценка суммарного нарушения водородных связей в модифицированной ДНК может быть проведена двумя независимыми методами: по снижению температуры «плавления» ДНК  $T_{\text{пл}}$  (температура перехода ДНК от спиральной к беспорядочной структуре, соответствующая точке перегиба на кривой зависимости оптической плотности растворов

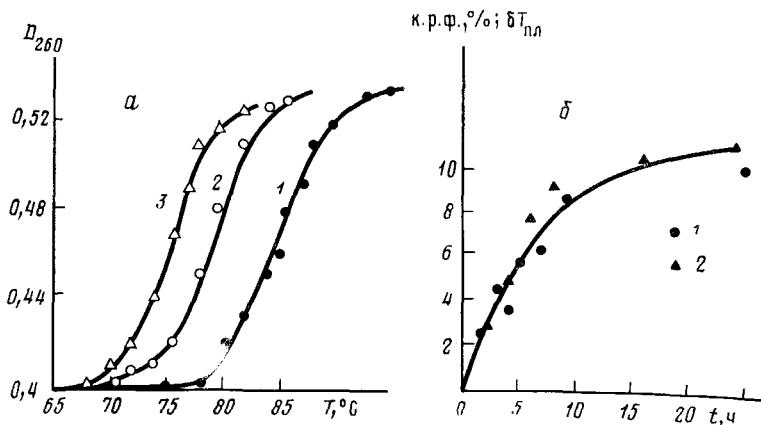


Рис. 2. *а* — Кривые зависимости оптической плотности растворов ДНК от температуры: 1 — для нативной ДНК, 2 — после 4 часов реакции с НММ, 3 — после 16 часов реакции с НММ; *б* — кинетическая кривая роста процентного содержания кислоторастворимых фрагментов (к. р. ф., кривая 1) и разности  $T_{\text{пл}}$  ДНК до и после взаимодействия с НММ ( $\delta T_{\text{пл}}$ , кривая 2) в реакции ДНК с НММ [90]

ДНК от температуры) и по количеству кислоторастворимых фрагментов (к. р. ф.), выщепляемых нуклеазой S, из модифицированной ДНК [90].

На рис. 2, *а* представлены кривые зависимости оптической плотности растворов ДНК от температуры для контрольной ДНК (кривая 1) и после воздействия НММ в течение 4 ч (кривая 2) и 16 ч (кривая 3). Видно, что  $T_{\text{пл}}$  снижается в ходе реакции ДНК с НММ, что свидетельствует об увеличении количества повреждаемых водородных связей в модифицированной ДНК. На это указывает также увеличение к. р. ф. (рис. 2, *б*, кривая 1) в реакции ДНК с НММ. Симбатное увеличение относительной величины к. р. ф. с увеличением разности  $T_{\text{пл}}$  ДНК до и после взаимодействия с НММ ( $\delta T_{\text{пл}}$ ) (рис. 2, *б*, кривая 2) свидетельствует о соответствии между суммарным количеством участков с нарушенным спариванием оснований (которые переводятся нуклеазой S, в кислоторастворимую фракцию) и снижением  $T_{\text{пл}}$ , причем количественное соотношение (снижение  $T_{\text{пл}}$  на 1° соответствует в среднем 1% нарушенных водородных связей) согласуется с данными работы [98].

Следует отметить, что число нарушенных Н-связей больше числа образующихся алкилированных оснований и разрывов. Так, за 1 ч реакции НММ с ДНК суммарное повреждение Н-связей составляет 2,5% [90], а по данным работ [53, 99] количество алкилированных оснований ДНК за это же время в идентичных условиях составляет 0,2—0,5%. С учетом этих данных образование обнаруженных повреждений можно представить следующим образом [100]. Алкилирование различных оснований в макромолекуле ДНК приводит к разрыву водородных связей. Последующее образование апуриновых участков также повреждает Н-связи. Это далее ведет к образованию ОР, которые в результате статистического накопления могут дать ДР при их близком расположении.

нии. Этот путь образования ОР может быть ускорен обработкой модифицированной ДНК щелочью или нагреванием. По данным [95], для практически полного удаления алкилированных пуринов достаточно 90-минутного нагревания при 100° С.

Определить количество участков локальной деспирализации ДНК за счет алкилирования (и других модификаций) можно с помощью КФ-метода [101, 102], в основе которого лежит взаимодействие формальдегида с амино- и имино-группами оснований ДНК (не участвующими в образовании водородных связей) при температурах ниже температуры «плавления» ДНК. Этот метод успешно использовался для обнаружения нарушений вторичной структуры ДНК, вызванных действием нуклеаз [103], ионизирующей радиации [104], термической денатурации [105], а также для выявления дефектов вторичной структуры ДНК опухолевых клеток [106—108]. Использование КФ-метода для анализа нарушений вторичной структуры ДНК в реакции с НММ позволило установить, что в модифицированной ДНК происходит образование участков локальной деспирализации ДНК, причем количество их хорошо согласуется с количеством ОР, определяемых другими методами [89].

Было установлено, что реакция НММ с ДНК опухолевых клеток проекает с большей скоростью [88, 89] за счет наличия участков локальной деспирализации в структуре ДНК опухолевых клеток [106—108].

## V. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ДНК

Большинство алкилированных продуктов, обнаруженных в реакции ДНК с НММ в условиях *in vitro*, находят и в условиях *in vivo* [109—111]. Среди алкилированных продуктов, как было показано выше, основную массу (до 80% от общего количества) составляет 7-алкилгуанин; зафиксированы также производные аденина, гуанина, цитозина, тимины. Однако наибольший интерес с точки зрения мутагенеза и канцерогенеза представляют 6-О-алкилгуанин и другие алкилированные по кислороду продукты [110, 112—114]. В процессе превращения алкилированных продуктов в условиях *in vitro* и *in vivo* могут образовываться различные интермедиаты. Это приводит к существенному изменению мутагенной и канцерогенной активности НАМ, что следует учитывать при использовании НАМ в экспериментах на живых системах [115, 116]. Мутации за счет алкилирования оснований ДНК могут возникать в результате ошибочного спаривания оснований. Например, в случае возникновения 6-О-алкилгуанина, последний может спариваться с тимином (тогда, как в нормальных условиях тимин образует пару с аденином, А-Т) [7, 9, 117—119].

В последние годы благодаря появлению новых методов идентификации алкилированных продуктов можно анализировать связь между образованием этих продуктов и различными проявлениями их биологических свойств [120, 121]. Для многих алкилирующих соединений установлена связь между способностью алкилировать гуанин по кислороду у атома С(6) и канцерогенной активностью соединений [122]; однако связь между общей степенью алкилирования и канцерогенной активностью была мала или вообще отсутствовала [123]. Алкилирующие агенты —N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) и метилметансульфонат (MMC) производят сходные типы повреждений ДНК. При использовании комбинации НГ и MMC для исследования типов повреждений, приводящих к мутациям, трансформации и токсичности, было показано, что частота мутаций коррелирует с числом метилированных аддуктов 6-О-алкил гуанинов, но цитотоксичность не коррелирует ни с количеством отдельных аддуктов, ни с общим уровнем алкилирования ДНК (НГ более чем в 100 раз токсичнее, чем MMC) [124].

Сравнение канцерогенной активности алкилирующих соединений (N-нитрозо-N-метилуретана, НММ, НЭМ, НГ, MMC и др.) в экспериментах на грызунах с мутагенным эффектом этих веществ на бактериях позволило установить, что алкилирующая активность полностью коррелирует

с мутагенным эффектом, однако между каждым из этих эффектов и канцерогенностью корреляции не было. Обнаружена связь между начальным уровнем соотношения 7-Н- и 6-О-алкилгуанина, образующихся в результате реакции алкилирующего соединения с ДНК *in vitro* и его канцерогенностью *in vivo*. Это является доказательством того, что алкилирование гуанина по 6-О-положению играет ключевую роль в повреждении ДНК и обуславливает канцерогенность алкилирующих соединений в эксперименте [4, 114].

Злокачественная трансформация клеток зависит от длительности существования модифицированного основания в ДНК, которая в случае 6-О-метилгуанина оказалась наибольшей для клеток головного мозга, наиболее чувствительных к НММ. В то же время выведение его из ДНК печени происходит значительно быстрее, и печень оказывается резистентной к малигнизирующему действию НММ [125—127]. Таким образом, алкилирование ДНК может быть одной из основных реакций при канцерогенезе и мутагенном действии химических соединений, которые сами (или посредством продуктов превращения) могут присоединяться по ее нуклеофильным центрам [128, 129].

Реакция карбамоилирования, характерная для НАМ, позволяет в ряде случаев объяснить их высокий мутагенный и противоопухолевый эффект образованием карбамоильных производных. Так, возникновение мутаций может происходить за счет продуктов карбамоилирования оснований изоциановой кислотой, поскольку доказано, что ее соль (изоцианат калия) позволяет получить мутантные формы при обработке ею ряда растений [130]. Следует, однако, отметить, что не наблюдали четкой корреляции между степенью карбамоилирования нуклеиновых кислот и противоопухолевой активностью НАМ, хотя подобная корреляция прослеживается для алкилирующей активности (при одинаковой степени карбамоилирования) и противоопухолевой активности [131].

Было показано, что реакции карбамоилирования существенным образом могут ингибировать процессы репарации в клетке. Ферменты, принимающие участие в репарации и репликации ДНК, могут инактивироваться за счет карбамоилирования изоцианатами, возникающими в процессе превращения НАМ [70, 71, 132].

Определенное значение приобретает реакция карбамоилирования белков, как одно из возможных объяснений противоопухолевых свойств НАМ [133, 134].

На проявление биологической активности НАМ существенное влияние могут оказывать реакции превращения алкилированных продуктов с нарушением структурной целостности ДНК (ОР, ДР, ЩЛУ, ТЛУ) и карбамоилированных продуктов (модификация белков), а также образование сшивок ДНК — белок и ДНК — ДНК, которые были обнаружены при обработке клеток млекопитающих хлорприводными НАМ [135, 136]. В экспериментах с бактериальными клетками была установлена корреляция между количеством ДР, индуцированных в ДНК под действием НММ и выживаемостью клеток [137]. Причиной гибели клеток при действии НАМ может быть также образование значительного количества ЩЛУ, как это имеет место при облучении клеток ионизирующей радиацией [138].

В ряде случаев *in vivo* выявлена определенная связь между индуцированием разрывов в ДНК и канцерогенной активностью для определенного класса веществ. Однако следует иметь в виду, что однотяжевые разрывы в ДНК клеток дополнительны могут возникать за счет действия ферментов эксцизионной репарации, способных, например, к выщеплению 3-алкиладенина, 6-О-метилгуанина с образованием апуринового участка, который в дальнейшем дает ОР [131, 139].

Реакции алкилирования и карбамоилирования, сопровождаемые существенным нарушением структуры ДНК, могут изменять ее матричные свойства, ответственные за процессы репликации и транскрипции [140].

Весьма чувствительным тестом для проверки матричных свойств модифицированной ДНК может служить РНК-полимеразные системы с

очищенными ядрами и с растворимой РНК-полимеразой [141—143]. Было исследовано нарушение синтеза РНК при использовании в качестве матрицы ДНК, модифицированную НММ [144, 145]. Матричную активность определяли по количеству включенного  $^{14}\text{C}$ -ЦМФ в РНК-продукт по отношению к контролю (рис. 3, кривая 1). В качестве контроля использовали систему с необработанной ДНК. Видно, что уже в первые часы реакции матричная активность экспоненциально уменьшается. Степень нарушения матричной активности была тем сильнее, чем более длительно протекала реакция НММ с ДНК. Через 10 ч синтез РНК уже практически не идет. Сопоставление этих результатов с появлением ОР и ДР в молекуле ДНК под действием НММ (рис. 3, кривые 2, 3) показывает большую чувствительность РНК-полимеразной системы к повреждениям структуры ДНК, чем другие методы. Прекращение матричного

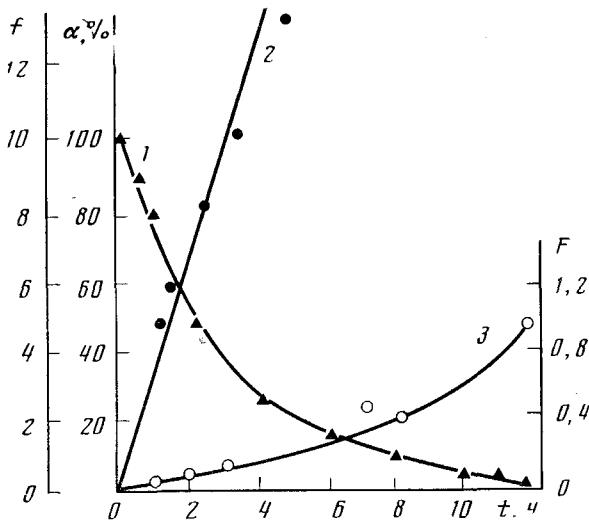


Рис. 3. Изменение матричной активности ДНК в РНК-полимеразной системе (1) (определенной по величине  $\alpha$  — включения  $^{14}\text{C}$ -ЦМФ в РНК-продукт), количество ОР ( $f$ , кривая 2) и ДР ( $F$ , кривая 3) в зависимости от времени взаимодействия ДНК с НММ [143]

синтеза через 10 ч свидетельствует о существенных нарушениях матрицы ДНК, ведущих к ингибированию транскрипции.

Изменение матричных свойств хроматина под действием НММ и хлорэтильных производных нитрозомочевин установлено в работе [146], причем в ряде случаев степень ингибирования матричной активности коррелировала с противоопухолевым эффектом НАМ.

Установлено, что НАМ обладают противоопухолевой активностью в отношении злокачественных новообразований различного происхождения и индуцированных канцерогенами у животных. Однако в настоящее время пока не ясен вопрос о том, какая из реакций модификации ДНК является определяющей в проявлении противоопухолевой активности НАМ. Считается, что при этом существенную роль играет большая степень ингибирования синтеза ДНК в опухолевых клетках за счет уменьшения матричной активности хроматина (в результате алкилирования и карбамоилирования), а также ингибирования процессов reparации опухолевых клеток (в результате карбамоилирования ферментов) [70]. Не исключено, что в основе избирательности действия НАМ на опухолевые клетки лежат реакции взаимодействия их с ДНК, структура которой отличается от ДНК нормальных клеток наличием участков локальной деспирализации молекулы [106—108], что обусловливает большую чувствительность ДНК опухолей к действию химических [100, 147] и физических [148] агентов.

Таким образом, анализ возможных путей модификации ДНК алкилирующими соединениями, в частности НАМ, позволяет связать наблюдавшиеся биологические эффекты с различными типами нарушения первичной и вторичной структуры ДНК, а также оценить возможность направленного синтеза и использования новых биологически активных препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рапопорт И. А. В сб.: Супермутагены. М.: Наука, 1966, с. 9.
2. Панфилова З. И., Салганик Р. И. Микробиология, 1983, т. 52, с. 974.
3. Murota T., Shibusawa T. Japan. J. Genet., 1983, v. 58, p. 263.
4. Bartsch H., Terracini B., Malaveille Ch., Tomatis L., Wahrendorf J., Brun G., Donet B. Mutat. Res., 1983, v. 110, p. 181.
5. Lovelles A., Hampton C. L. Ibid., 1969, v. 7, p. 1.
6. Larimer F. W., Hardigree A. A., Fillenwarth M., Foote R. S., Mitra S. Environ. Mutagenes, 1983, v. 5, p. 455.
7. Singer B. Proc. Symp. Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis (Gatlinburg, 1981), N. Y.—London: Plenum Press, 1982, p. 1.
8. Салганик Р. И. Вестн. АН СССР, 1983, т. 11, с. 58.
9. Бреслер С. Е., Калинин В. Л., Кузнецова Л. В. Генетика, 1984, т. 20, с. 933.
10. Сальникова Т. В., Григорьева Н. В., Лапутин Д. Л., Шустова Л. Л., Зазимко В. В., Шустов Г. В., Костяновский Е. Г. Там же, 1984, т. 20, с. 646.
11. Grubbs C. J., Hill D. L., McDonough K. C., Peckham J. C. J. Natl. Cancer Inst., 1983, v. 71, p. 625.
12. Elespuru R. K. Environ. Mutagenes, 1983, v. 5, p. 442.
13. Smuckler E. A. West J. Med., 1983, v. 139, № 1, p. 55.
14. Ames B. N., Hopper K. Nature, 1978, v. 274, p. 19.
15. Likhachev A. J., Alexandron V. A., Anisimov V. N., Bespalov V. G., Korsakov M. V., Ovsyanikov A. I., Popovic J. G., Napalkov N. P., Tomatis L. Int. J. Cancer, 1983, v. 31, p. 779.
16. O'Connor P. J. In: Chromosome Damage and Repair. Proc. NATO Adv. Study Inst. EMBO Lect. Course (Godoy Sund Fjord Hotel, 1980), N. Y.—London: Plenum Press, 1981, p. 585.
17. Marushige K., Marushige Y. Chem.-Biol. Interact., 1983, v. 46, p. 165.
18. Эмануэль Н. М., Корман Д. Б., Островская Л. А., Горбачева Л. Б., Дементьева Н. П. Нитрозоалкилмочевины — новый класс противоопухолевых препаратов. М.: Наука, 1978.
19. Эмануэль Н. М. Эксперим. онкология, 1979, т. 1, № 1, с. 13.
20. Эмануэль Н. М. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей, т. 1. Черноголовка: ОИХФ АН СССР, 1980, с. 7.
21. Эмануэль Н. М. В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии, т. 1. Черноголовка: ОИХФ АН СССР, 1982, с. 5.
22. Сапежинский И. И. Докл. АН СССР, 1981, т. 257, с. 155.
23. Гендель Л. Я., Круглякова К. Е., Панасенко О. М. Там же, 1981, т. 257, с. 1014.
24. Burlakova E. B. In: Membrane Transport Processes, v. 2/Ed. by Tosteson D. C., Ovchinnikov Yu. A., Latorre R. N. Y.: Raven Press, 1978, p. 31.
25. Эмануэль Н. М. Успехи химии, 1981, т. 50, с. 1721.
26. Эмануэль Н. М. В сб.: Советская химическая физика. Черноголовка, ОИХФ АН СССР, 1981, с. 36.
27. Вартанян Л. С., Козаченко А. И., Эмануэль Н. М. Studia biophysica, 1981, v. 83, р. 183.
28. Козаченко А. И., Раиба Ю. Э., Вартанян Л. С. Хим.-фарм. журн. 1982, т. 6, с. 650.
29. Авдеева О. С., Пулатова М. К., Ванин А. Ф., Эмануэль Н. М. Докл. АН СССР, 1979, т. 249, с. 224.
30. Эмануэль Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. М.: Наука, 1977.
31. Эмануэль Н. М. Эксперим. онкология, 1982, т. 4, № 6, с. 63.
32. Бурлакова Е. Б. Кардиология, 1980, т. 8, с. 48.
33. Эмануэль Н. М. Эксперим. онкология, 1979, т. 1, № 2, с. 46.
34. Kirmse W., Wachterschauser. Liebigs Ann. Chem., 1967, B. 707, S. 44.
35. Montgomery J. A. Cancer Treatment Repts., 1976, v. 60, p. 651.
36. Andersen T., McMenamin M. G., Shein P. S. Cancer Res., 1975, v. 35, p. 781.
37. Yancik F., Kakac B., Vanicek V., Vrublovská M. Chem. Listy, 1958, v. 52, p. 909.
38. Loo T. Y., Dion R. J. Pharmac. Sci., 1965, v. 54, p. 809.
39. Feigl F., Heto C. C., Oesper R. E. Analyt. Chem., 1956, v. 28, p. 1311.
40. Farmer P. B., Foster A. B., Jarman M. J. Biochem. J., 1973, v. 135, p. 203.
41. Lawley P. D. Nature, 1968, v. 218, p. 580.
42. Veleminsky J., Gichner J. Mutat. Res., 1970, v. 10, p. 43.
43. Freese E. B., Freese E. Virology, 1961, v. 13, p. 19.
44. Куроптева З. В., Лужков В. Б., Довгяло Е. И., Пулатова М. К., Смотряева М. А. Биофизика, 1979, т. 24, с. 944.
45. Куроптева З. В., Пулатова М. К., Смотряева М. А., Круглякова К. Е. В кн.: Успехи квантовой химии и квантовой биологии. Киев: Наукова думка, 1980, с. 211.

46. *Kuropleva Z. V., Pusatova M. K., Smotryaeva M. A., Kruglyakova K. E.* Int. J. Quant. Chem., 1980, v. 17, p. 1221.
47. *Lavelles A.* Naturc, 1969, v. 223, p. 206.
48. *Бедняк А. Е., Гуськов В. Ф.* Докл. АН СССР, 1973, т. 212, с. 1451.
49. *Sthal K. W., Schlime E., Koster F. E.* Naturwiss., 1974, B. 61, S. 38.
50. *Lawley P. D., Shan S. A.* Biochem. J., 1972, v. 128, p. 117.
51. *Серебряный А. М., Смотряева М. А., Круглякова К. Е.* Изв. АН СССР, Сер. биол., 1969, с. 607.
52. *Lawley P. D., Orr D. J., Shan S. A.* Chem.-Biol. Interact., 1972, v. 4, p. 431.
53. *Lawley P. D., Shan S. A.* Ibid., 1973, v. 7, p. 115.
54. *Shooter K. V., Venitt S.* Mutat. Res., 1977, v. 64, p. 106.
55. *Серебряный А. М., Тутлите В. С., Славенас И. Ю.* Биоорганич. химия, 1976, т. 2, с. 912.
56. *Bannon P., Verley W.* Europ. J. Biochem., 1972, v. 31, p. 103.
57. *Lawley P. D.* Chem.-Biol. Interact., 1973, v. 7, p. 127.
58. *Swenson D. H., Lawley P. D.* Biochem. J., 1978, v. 171, p. 575.
59. *Серебряный А. М., Смотряева М. А., Круглякова К. Е., Костяновский Р. Г.* Докл. АН СССР, 1969, т. 185, с. 847.
60. *Serebryanyi A. M., Mnatsakanyan R. M.* FEBS Letters, 1972, v. 28, p. 191.
61. *Серебряный А. М., Мнацаканян Р. М.* Докл. АН СССР, 1971, т. 199, с. 657.
62. *Серебряный А. М.* В сб.: Молекулярные механизмы генетических процессов. М.: Наука, 1972, с. 135.
63. *Серебряный А. М.* В сб.: Канцерогенные N-нитрозосоединения — действие, образование, определение. Таллин, 1978, с. 107.
64. *Серебряный А. М., Рандалу К. Х. А.* Биоорганич. химия, 1977, т. 3, с. 633.
65. *Серебряный А. М., Тутлите В. С., Славенас И. Ю.* Изв. АН СССР. Сер. биол., 1973, с. 1190.
66. *Cheng C. J., Fujimura S., Gunberger D., Weinstein I. B.* Cancer Res., 1972, v. 32, p. 22.
67. *Connors T. A., Hare J. R.* Brit. J. Cancer, 1974, v. 30, p. 477.
68. *Carter S. K., Shabel F. M., Broder L. E., Johnston T. P.* Adv. Cancer Res., 1972, v. 16, p. 273.
69. *Wheeler G. P.* In: *Handbook of Experimental Pharmacology Antineoplastic and Immunosuppressive Agents*. Berlin: Springer Verlag, 1975, S. 65.
70. *Горбачева Л. Б., Кукушкина Г. В.* Эксперим. онкология, 1981, т. 3, с. 21.
71. *Горбачева Л. Б., Горьков В. А., Чернов В. А., Шиятая О. К.* Итоги науки и техники. Сер. онкология. М.: Изд-во ВИНИТИ, 1982, с. 320.
72. *Montgomery J. A., Tames R., McCaleb G. S., Johnston T. P.* J. Med. Chem., 1967, v. 10, p. 668.
73. *Tong W. P., Ludlum D. B.* Biochem. Pharmac., 1978, v. 27, p. 77.
74. *Ludlum D. B., Tong W. P.* Ibid., 1978, v. 27, p. 2391.
75. *Tong W. P., Ludlum D. B.* Ibid., 1979, v. 28, p. 1175.
76. *Ludlum D. B., Tong W. P.* In: *Nitrosoureas in Cancer Treatment*. Amsterdam — N. Y.—Oxford: North Holland Biomedical Press, 1981, p. 21.
77. *Palecek E.* In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, v. 18, N. Y.: Acad. Press, 1976, p. 151.
78. *Verly W. G., Gossert F., Crine P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 2273.
79. *Круглякова К. Е.* Успехи химии, 1975, т. 44, с. 1887.
80. *Margison G. P., O'Connor F. J.* Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 331, p. 349.
81. *Lindahl T., Anderson A.* Biochemistry, 1972, v. 11, p. 3618.
82. *Strauss B., Hill T.* Biochim. Biophys. Acta, 1970, v. 213, p. 14.
83. *Schooter K. V.* Chem.-Biol. Interact., 1976, v. 13, p. 151.
84. *Жижина Г. П., Олейник Э. Ф.* Успехи химии, 1972, т. 41, с. 474.
85. *Бирнштейн Т. М., Птицын О. Б.* Конформация макромолекул. М.: Наука, 1964.
86. *Fritzsche H.* Biochim. Biophys. Acta, 1966, v. 119, p. 645.
87. *Збиндон Р.* Инфракрасная спектроскопия высокополимеров. М.: Мир, 1966.
88. *Smotryaeva M. A., Zhizhina G. P., Kruglyakova K. E., Emanuel N. M.* Studia biophysica, 1976, B. 57, S. 59.
89. *Круглякова К. Е., Жижина Г. П., Смотряева М. А.* Ibid., 1981, B. 85, S. 11.
90. *Смотряева М. А., Блохтерова Н. В., Жижина Г. П., Круглякова К. Е.* Изв. АН СССР. Сер. биол., 1981, с. 455.
91. *Lukásová E., Palecek E., Kruglyakova K. E., Zhizhina G. P., Smotryaeva M. A.* Rad. and Environ. Biophys., 1977, v. 14, p. 231.
92. *Germond J. E., Godson G. N., Vogt V. M., Hirt B.* Europ. J. Biochem., 1974, v. 43, p. 591.
93. *Fuchs R. P.* Nature, 1975, v. 257, p. 151.
94. *Bartok K., Denhardt D. T.* J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 530.
95. *Verly W. G., Crine P., Bannet P., Forgst A.* Biochem. Biophys. Acta, 1974, v. 349, p. 204.
96. *Гоницберг Э. М.* Биохимия, 1978, т. 43, с. 1285.
97. *Lindahl T., Nyberg B.* Biochemistry, 1972, v. 11, p. 3610.
98. *Pritchard A. E., Eichinger B. E.* Biopolymers, 1975, v. 14, p. 1357.
99. *Lawley P. D., Warren W.* Chem.-Biol. Interact., 1975, v. 11, p. 55.
100. *Круглякова К. Е., Жижина Г. П., Смотряева М. А.* В сб.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей, т. 1. Черноголовка: ОИХФ АН СССР, 1980, с. 129.

101. Трифонов Э. Н., Шафрановская Н. И., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. Молек. биол., 1968, т. 2, с. 887.
102. Frank-Kamenetskii M. D., Lazurkin Yu. S. In: Ann. Rev. Biophys. and Bioeng., v. 3. Palo Alto, 1974, p. 127.
103. Банников Ю. А., Трифонов Э. Н. Молек. биол., 1970, т. 4, с. 734.
104. Гамов Ю. И., Иванник Б. П., Симонов В. В., Яскевич А. Г., Алейникова Т. Л., Поверенный А. М., Рябченко Н. И. Радиобиология, 1972, т. 12, с. 336.
105. Баев А. С., Любченко Ю. Л., Лазуркин Ю. С., Трифонов Э. Н., Франк-Каменецкий М. Д. Молек. биол., 1972, т. 6, с. 760.
106. Жижина Г. П., Бобович С. И., Петров О. Е., Круглякова К. Е. Докл. АН СССР, 1974, т. 217, с. 722.
107. Жижина Г. П., Бобович С. И., Авакян К. А., Петров О. Е. Там же, 1977, т. 235, с. 703.
108. Авакян К. А., Жижина Г. П., Смотряева М. А., Круглякова К. Е. Там же, 1980, т. 251, с. 732.
109. Rajewsky M. F. Modified Nucleosides and Cancer, Berlin: Springer, 1983, p. 63.
110. Lawley P. D. In: Chromosome Damage and Repair. Proc. NATO Adv. Study Inst. EMBO Lect. Course (Godoysund Fjord Hotel, 1980) N. Y.—London: Plenum Press, 1981, p. 19.
111. Frei J. V., Swenson D. H., Warren W., Lawley P. D. Biochem. J., 1978, v. 174, № 3, p. 1031.
112. De Kok A. J., Tates A. D., Simons J. W. I. M., den Engelse L. Mutat. Res., 1984, v. 130, p. 182.
113. Goth R., Rajewsky M. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, p. 631.
114. Margison G. P., Kleinhues P. Biochem. J., 1975, v. 148, p. 521.
115. Ashby J., Styles J. A. Nature, 1978, v. 271, p. 452.
116. Ashby J., Styles J. A. Ibid., 1978, v. 274, p. 20.
117. Newbold R. F., Warren W., Medzalf A. S. C., Amos J. Ibid., 1980, v. 283, p. 596.
118. Vogel E., Natarajan A. T. In: Chemical Mutagens/Ed. by de Serres F. J., Hollaender A. N. Y.: Plenum Press, 1982, p. 295.
119. Singer B. In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, N. Y.: Acad. Press, v. 15, 1975, p. 219.
120. Institóris E., Tamás F. Chem.-Biol. Interact., 1983, v. 47, p. 133.
121. Saffhill R. Carcinogenesis, 1984, v. 5, p. 621.
122. Pegg A. E. J. Natl. Cancer Inst., 1977, v. 58, p. 681.
123. Виленчик М. М. Закономерности молекулярно-генетического действия химических канцерогенов. М.: Наука, 1977.
124. Smith G. J., Grisham J. W. Mutat. Res., 1983, v. 111, p. 405.
125. Kleinhues P., Bucheler J. Nature, 1977, v. 269, p. 625.
126. Müller R., Rajewsky M. Cancer Res., 1983, v. 43, p. 2897.
127. Müller R., Rajewsky M. Z. Naturforsch., 1983, B, 38, S. 1023.
128. Абакумова О. Ю., Куценко Н. Г., Лерман М. И. Биохимия, 1978, т. 4, с. 2092.
129. Hill D. L., Kirk M. C., Struck R. F. Cancer Res., 1975, v. 35, p. 296.
130. Матвиенко Л. И., Серебряный А. М. Докл. АН СССР, 1969, т. 187, с. 1169.
131. Panasci L. C., Fox P. A., Schein P. S. Cancer Res., 1977, v. 37, p. 3321.
132. Sariban E., Erickson L., Kohn K. W. Ibid., 1984, v. 4, p. 1352.
133. Wheeler G. P., Bowdon B. J., Struck R. F. Ibid., 1975, v. 35, p. 2974.
134. Wolley P. V., Dion P. L., Kohn K. W., Bono V. W. Ibid., 1976, v. 36, p. 1470.
135. Ewing R. A. G., Kohn K. W. Ibid., 1978, v. 38, p. 3197.
136. Thomas C. B., Osieka R., Kohn K. W. Ibid., 1978, v. 38, p. 2448.
137. Cox R., Irring Ch. G. Ibid., 1976, v. 36, p. 4114.
138. Lefleur M. V. M., Woldhmis J., Loman H. Int. J. Rad. Biol., 1979, v. 36, p. 241.
139. Ather A., Ahmed Z., Riazuddin S. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, p. 2111.
140. May H. E., Roose R., Reed D. J. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 4723.
141. Gorbacheva L. B., Kukushkina G. V. Biochem. Pharmacol., 1970, v. 19, p. 1561.
142. Абакумова О. Ю., Угарова Т. Ю., Куценко Н. Г., Лерман М. И., Горбачева Л. Б., Соколова И. Т. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1973, т. 10, с. 51.
143. Stender W., Stütz A. A., Scheit K. N. Eur. J. Biochem., 1975, v. 56, p. 129.
144. Круглякова К. Е., Смотряева М. А., Дедерер Л. Ю., Эмануэль Н. М. В кн.: Труды III Всесоюзного биохимического съезда, т. 1. Рига: Зинатне, 1974, т. 34.
145. Дедерер Л. Ю., Кукушкина Г. В., Горбачева Л. Б. Докл. АН СССР, 1975, т. 221, с. 736.
146. Веровский В. Н., Горбачева Л. Б. Хим.-фарм. журнал, 1979, № 10, с. 24.
147. Жижина Г. П., Скалацкая С. И., Бунина Е. Ф. Докл. АН СССР, 1981, т. 257, с. 497.
148. Жижина Г. П., Бунина Е. Ф., Скалацкая С. И. Радиобиология, 1983, т. 23, № 6, с. 87.

Институт химической физики  
АН СССР, Москва