

Влияние модифицированных тиотэфом ДНК и их мономерных компонентов разной степени алкилирования на синтез нуклеиновых кислот опухолевых клеток

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 опытах in vitro исследовано влияние алкилированных тиотэфом препаратов нуклеиновой кислоты (НК) и ее мономерных компонентов на транспорт и включение в состав клеточных НК меченых предшественников НК — тимидина и уридина в зависимости от строения алкильного радикала. Установлено, что алкилированные препараты преимущественно тормозят синтез ДНК опухолевых клеток карциномы Эрлиха и гепатомы Зайдела и гораздо меньше влияют на синтез РНК. Более эффективными оказались препараты, несущие нераскрытые азиридиновые циклы. Заметных различий в ингибирующем действии гомо- и гетерологичных алкилированных ДНК не наблюдалось. Мономерные алкилированные компоненты НК (основания, нуклеозиды и нуклеотиды) обладают менее выраженным, чем алкилированная тиотэфом ДНК (ДНТ), эффектом.

Введение. В одной из наших предыдущих работ [1], посвященных алкилированию компонентов ДНК производными азиридина (этиленimina), методом масс-спектрологии установлено, что модификация молекул осуществляется посредством присоединения к ним в зависимости от условий (рН, времени и температуры реакции) различных алкильных радикалов (схема). Это не учитывалось ранее при проведении реакций алкилирования [2—4] и при изучении противоопухолевого эффекта алкилированных нуклеиновых кислот (НК) на различных биологических объектах (растениях, животных, вирусах [5—7]).

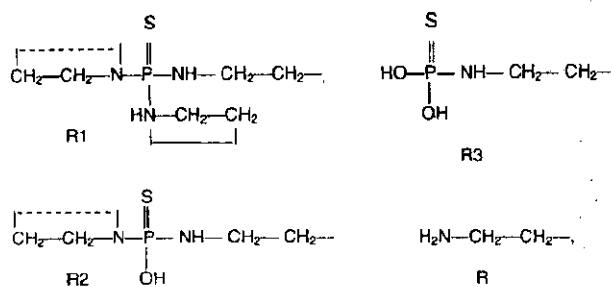
В настоящей работе биологический эффект алкилированных тиотэфом молекул ДНК и ее мономерных компонентов исследован с учетом строения двух «крайних» (R1 и R) из четырех радикалов, образующихся в результате размыкания азиридиновых циклов и гидролиза Р-Н-связей тиотэфа в ходе реакции алкилирования.

Предположив, что противоопухолевое действие алкилированных препаратов может быть связано с нарушением нуклеинового обмена в клетках, мы изучили влияние алкилированных препаратов на синтез клеточных РНК и ДНК через включение опухолевыми клетками соответствующих меченых предшественников этих кислот — уридина и тимидина.

Материалы и методы. Методы получения тиотэфа и препаратов алкилированных оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и ДНК приведены в работах [1, 8—10]. Этиленимин (Ереванский завод химреактивов, Армения) применяли после перегонки и хранения над NaOH.

В работе использованы GMP, AMP, ДНКазы I, диметилсульфоксид (ДМСО), актиномицин D («Sevga», Германия), аденин, аденозин, гуанозин, цитидин, дезоксицитидин («Reanal», Венгрия), ³⁵S-тиотэф (ПО «Изотоп», Россия), а также ДНК, выделенная из опухолей.

В опытах *in vitro* использованы клетки асцитной формы карциномы Эрлиха у мышей и гепатомы Зайдела у крыс (АКЭ и АГЗ соответственно).



Поскольку при длительном пассировании клетки утрачивают некоторые свои свойства и в процессе адаптации к среде приобретают новые, в качестве адекватных моделей исходных опухолей нами использованы первичные культуры клеток.

Опухоли перевивали внутрибрюшинно 2—2,5-месячным мышам-самцам линии BALB/c массой 20—25 г (карцинома Эрлиха) и 3-месячным беспородным белым крысам-самцам линии Вистар массой 100—150 г (гепатома Зайдела). Линии животных взяты в питомнике АМН «Столбовая» (Россия). Опухолевые клетки отбирали на 6—10-й день после перевивки, дважды отмывали центрифугированием (1000 g, 1 мин) в среде Игла, а затем инкубировали в той же среде, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят, в присутствии анализируемых препаратов, а также меченых предшественников ДНК и РНК при температуре 37 °С. Предварительные опыты показали, что в течение 3—3,5 ч инкубации клеток в среде не наблюдается их заметной гибели, а кинетика включения меченого тимидина в ДНК имеет линейный характер, свидетельствующий о жизнеспособности клеток. Рабочая концентрация клеток в среде составляла 0,3—0,6 млн в 1 мл.

В качестве предшественников клеточных НК использованы ³Н-тимидин и ³Н-уридин с удельной активностью 948 и 1080 ГБк/моль соответственно (ПО «Изотоп», Россия). Предшественники вносили в содержащие исследуемые вещества инкубационные пробы объемом 110 мкл в количестве 0,2—0,6 МБк. Инкубацию клеток с ³Н-уридином проводили в течение 20—60 мин, с ³Н-тимидином — от 1 до 3 ч (именно в таком промежутке времени для каждого из них наблюдается пропорциональная зависимость уровня включения от количества внесенной метки и времени инкубации). По окончании инкубации пробы осаждали 5 %-й ТХУ на фильтры GF/C («Whatman», Великобритания) и подсушивали на воздухе.

Радиоактивность полученных образцов измеряли в толуольном сцинтилляторе ЖС-109 (Харьковский 3-д химреактивов, Украина) по каналу ³Н на

счетчике радиоактивности «Intertechnique» (Франция).

Для изучения транспорта тимидина внутрь клетки и влияния на этот процесс различных препаратов клетки АРЭ инкубировали при температуре 37 °С в среде, содержащей анализируемый препарат и около 0,4 МБк ³Н-тимидина на пробу объемом 200 мкл. Концентрация клеток составляла 0,3 млн/мл. По истечении времени инкубации пробы быстро охлаждали до температуры 2—4 °С и центрифугировали при 1000 g в течение 20 мин. Для сравнения эффективности транспорта тимидина и его включения в ДНК определяли радиоактивность экстраклеточной среды и кислотонерастворимой фракции.

Выделение ДНК из опухолевых клеток асцитного рака Эрлиха и асцитной гепатомы Зайдела проводили по методу Кея и Даунса [11]. Качество выделенной ДНК проверяли электрофорезом в агарозном геле.

Получение радиоактивно меченных ДНК. Для получения меченой ³⁵S-тиотэфом ДНК в водные растворы последней (1 мг/мл) вносили ³⁵S-тиотэф в количестве ≈ 0,4 МБк (удельная активность препарата 190 ГБк/моль) на общий объем пробы 75 мкл. Пробы инкубировали при 37 °С и через определенные промежутки времени аликвоты по 10 или 15 мкл разделяли на колонке (6 × 75 мм) с сефадексом G-75 («Pharmacia», Швеция). В качестве элюента применяли водный раствор аммонийбикарбоната (0,1 M, pH 8) при скорости элюирования 2 мл/мин. Фракцию полинуклеотида собирали в свободном объеме колонки. Концентрацию препаратов определяли спектрофотометрически и выражали в молях нуклеотида. Для определения включения ³⁵S-тиотэфа пробы наносили на фильтры GF/C («Whatman»), подсушивали на воздухе и измеряли радиоактивность по каналу ¹⁴C, как описано выше. Удельная радиоактивность составляла примерно 16000 имп·мин⁻¹·мкг⁻¹.

Для получения радиоактивно меченой ³Н-ДНК клетки АРЭ (0,1 млн/мл) помещали в 20 мл среды Игла, туда же вносили 80 МБк ³Н-тимидина и выдерживали в течение 24 ч при 37 °С. После инкубации клетки отмывали центрифугированием и выделяли из них ДНК, как описано выше. Радиоактивность полученной ДНК составила около 26000 имп·мин⁻¹·мкг⁻¹.

Для исследования проникновения радиоактивно меченных ДНК внутрь клеток АРЭ последние в концентрации 0,3—0,6 млн/мл инкубировали в течение 20—60 мин при температуре 37 °С в среде, содержащей 50 мкг/мл соответствующего препарата ДНК. Далее их дважды отмывали центрифуги-

рованием в 5 мл свежей порции среды, суспендировали в 100—200 мкл среды и обрабатывали ДНКазой I (100 мкг/мл, 5 мин) и S1-нуклеазой (2 ед./акт., 5 мин). Одну из аликвот оставляли без обработки для определения количества адсорбированной фракции ДНК. Остальные пробы осаждали 5 %-й ТХУ на фильтры GF/C, подсушивали на воздухе и измеряли радиоактивность по каналам ^3H или ^{14}C счетчика радиоактивности. По полученным данным определяли количество адсорбированной и проникшей в клетки (нуклеазорезистентной) фракции препаратов.

Результаты и обсуждение. В опытах *in vitro* на клетках карциномы Эрлиха препарат алкилированной тиотэфом ДНК (ДНТ) более чем на 50 % ингибировал включение экзогенного тимидина в ДНК опухолевых клеток и гораздо меньше влиял на включение уридина (таблица). Последнее, на первый взгляд, можно объяснить меньшим, чем для тимидина, временем инкубации нуклеозида с клетками, но последующие опыты на клетках АГЗ показали, что время здесь не является решающим фактором. Препараты нативной ДНК и тиотэф (в концентрации до 0,5 мМ) указанным эффектом не обладали. Увеличение концентрации тиотэфа до 1,5 мМ подавляло процесс включения экзогенного тимидина в ДНК опухолевых клеток, однако такая концентрация алкилирующего агента была на два порядка выше терапевтической. Более того, в опыте с использованием теста на окрашивание трипановым синим установлено, что тиотэф в концентрации до 5 мМ не имеет выраженного цитотоксического действия при инкубации с ним клеток АКЭ в течение 4 ч. Однако препараты ДНТ к этому времени уже оказывают цитотоксическое действие в концентрациях, близких к терапевтическим, и этот эффект не коррелирует с угнетением включения тимидина, который наблюдается через 15—30 мин инкубации.

О том, что тимидин включается в основном в ДНК клеток, свидетельствует факт стабильности полимерного продукта в щелочной среде. Экзогенный уридин включается в основном (на 95 %) в щелочлабильную фракцию, то есть в РНК клеток, и этот процесс подавляется внесением в среду актиномина D — ингибитора РНК-полимераз. Такой же эффект, подтверждающий определенную направленность включения нуклеозидов, вызывает и внесение в среду дезоксицитидина и цитидина — соответствующих предшественников клеточных ДНК и РНК (таблица).

Большинство модифицированных мономерных компонентов НК обладают сходным с ДНТ, но менее выраженным биологическим эффектом. Со-

Влияние биологически активных препаратов на включение меченых нуклеозидов в нуклеиновые кислоты клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в условиях *in vitro*

Препарат	Включение нуклеозидов, % к контролю	
	^3H -тимидин	^3H -уридин
1. ДНК АКЭ (50 мкг/мл)	105,1 ± 11,7	102,0 ± 7,3
2. ДНТ АКЭ (50 мкг/мл)	46,0 ± 4,0***	70,7 ± 21,1
3. Тиотэф (1,5 мМ)	57,0 ± 16,4*	80,1 ± 3,7
4. Актиномицин D (18 мкг/мл)	95,4 ± 8,2	37,5 ± 9,1
5. 6-Азауридин	74,0 ± 5,0*	139,9 ± 14,5*
6. Цитидин	92,1 ± 10,3	3,0 ± 0,5***
7. Дезоксицитидин	18,7 ± 8,3***	—
8. 1-R-аденин	97,1 ± 3,6	87,4 ± 9,6
9. 1-R1-аденин	39,4 ± 4,2***	78,6 ± 11,7
10. 3-R-аденин	96,3 ± 4,5	92,5 ± 5,7
11. 3-R1-аденин	56,4 ± 7,7**	83,4 ± 6,5
12. 9-R-аденин	93,6 ± 4,8	98,6 ± 8,4
13. 9-R1-аденин	74,0 ± 4,9*	101,8 ± 9,1
14. 1-R1-аденозин	37,3 ± 10,7	55,7 ± 7,8
15. AMP	96,0 ± 1,3	48,6 ± 5,2***
16. 1-R1-AMP	76,5 ± 4,6*	101,5 ± 8,5
17. Гуанозин	84,0 ± 6,3	118,0 ± 4,3
18. 7-R1-гуанозин	52,2 ± 6,8***	86,6 ± 7,3
19. GMP	203,5 ± 15,7***	123,0 ± 16,5
20. 7-R1-GMP	57,9 ± 4,7**	74,5 ± 3,2**

П р и м е ч а н и е. Время инкубации клеток с препаратами №№ 1—7 составляет 30 мин; с остальными — 90 мин; время инкубации с мечеными нуклеозидами: тимидином — 105 мин, уридином — 20 мин (см. «Материалы и методы»); R — аминотимидин, R1 — фосфоаминотимидин радикалы (см. схему); концентрация препаратов (за исключением указанной) — 1 мМ; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

поставимый с ДНТ эффект достигается ими при увеличенном почти втрое времени инкубации. Наиболее полно изучено влияние аденина, алкилированного по трем положениям гетероцикла радикалами R и R1. Радикал R в аденине во всех трех положениях (N1, N3 и N9) практически не влиял на процесс включения нуклеозидов в НК клеток (87—97 % включения). Для радикала R1, напротив, выявлена значительная степень угнетения включения, причем сайт алкилирования здесь также важен: эффективность алкилированных оснований увеличивается в ряду замещения по N9 < N3 < N1 положениям (соответственно ≈ 74, 56 и 40 % включения тимидина). Не менее действенным в отношении угнетения включения опухолевыми

клетками обоих нуклеозидов оказался и соответствующий нуклеозид — N1 замещенный аденозин (37 и 56 % включения тимидина и уридина соответственно).

На этом фоне неожиданным оказалось влияние аденинового нуклеотида. Незамещенный АМР, изначально обладающий ингибирующим действием (около 50 %) на включение уридина, после алкилирования теряет эту способность. В то же время немодифицированный GMP, наоборот, будучи стимулятором синтеза обеих НК опухолевых клеток, после алкилирования изменяет направленность своего действия, значительно снижая процент включения нуклеозидов. Если учесть, что ДНК алкилируется в основном по N7 гуанина ($\approx 95\%$ [9]), то остается непонятной ее несколько повышенная (в сравнении с активностью мономерных гуаниновых компонентов) противоопухолевая активность (≈ 46 и 58% включения тимидина). Вероятно, в повышение эффективности ДНТ вносят свой вклад присутствующие в ней, хотя и в небольших количествах, наиболее активные среди мономеров, алкилированные по N1 и N3 положениям аденины и 1-R1-аденозин. Все изложенное выше подтверждает решающую роль алкилирования в изменении биологических свойств ДНК и ее компонентов, модифицированных по основанию пуринового гетероцикла.

Результаты экспериментов на клетках другой опухоли — гепатомы Зайдела — оказались аналогичными опытам на АКЭ. Процесс включения уридина, как видно из рис. 1, а, мало зависит от природы воздействующего агента, будь то тиотэф, нативная ДНК или ДНТ различного происхождения, и практически не отличается от контроля. Включение тимидина, напротив, в значительной степени ингибируется как ауто-, так и гетерологичными ДНТ, причем проявляется это через 1 ч инкубации, когда для уридина кривая включения выходит на плато. Скорость включения тимидина в контроле и в присутствии тиотэфа такая же, как и уридина, но для клеток, обработанных разными ДНК, она также варьирует: нативные ДНК оказывают слабый стимулирующий эффект, а ДНТ — достаточно выраженный ингибирующий. То есть на клетках АГЗ просматривается тот же эффект преимущественного торможения синтеза ДНК опухолевых клеток.

Одним из факторов, влияющих на включение экзогенных нуклеозидов в НК клеток, является скорость их транспорта при участии пермеаз. Ранее показано, что один из препаратов этилениминного ряда — 2,3,5-трис-этилениминобензохион (тренимон), селективно ингибирует транспорт тимидина в

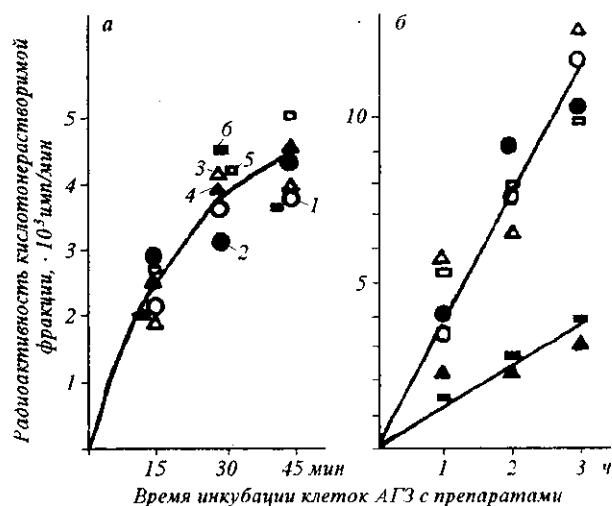


Рис. 1. Кинетика включения ^3H -уридина (а) и ^3H -тимидина (б) в РНК и ДНК клеток асцитной гепатомы Зайдела (АГЗ): 1 — контроль; 2 — тиотэф; 3, 5 — нативные ДНК асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и АГЗ; 4, 6 — алкилированные тиотэфом ДНК АКЭ и АГЗ соответственно. Концентрация препаратов нативных и алкилированных ДНК 50 мкг/мл, тиотэфа — 0,5 мМ. Время инкубации с препаратами 30 мин

опухолевые клетки [12]. Если допустить, что в этом процессе задействованы этилениминные группы, то и тиотэф, и препараты ДНТ должны обладать таким же эффектом. Это подтвердилось в эксперименте на клетках АКЭ. Тиотэф и ДНТ угнетали транспорт тимидина, в результате чего радиоактивность экстраклеточной фракции оставалась выше, чем в контроле, особенно для ДНТ (рис. 2, б). Соответственно и скорость включения нуклеозидов в ДНК клеток для ДНТ самая низкая (рис. 2, а). Это позволяет сделать вывод о влиянии алкилированных препаратов на синтез клеточных НК через алкилирование ферментов, обеспечивающих транспорт предшественников НК.

Сравнивая данные по включению меченого тимидина в ДНК опухолевых клеток АГЗ и АКЭ (рис. 1, б, 2, а) можно видеть, что клетки гепатомы Зайдела почти в 5 раз чувствительнее к действию алкилированных препаратов, чем клетки карциномы Эрлиха. Радиоактивность кислотонерастворимой фракции АГЗ за 1 ч инкубации составила около 1 ед. в сравнении с 4,8 для клеток АКЭ. Очевидно, это обусловлено более высокой активностью «запасного» пути биосинтеза нуклеотидов (использование в синтезе клеточных НК внесклеточных предшественников синтеза в виде нуклеозидов) в клетках АГЗ в отличие от «основного» (биосинтез предшественников *de novo* из цитидина

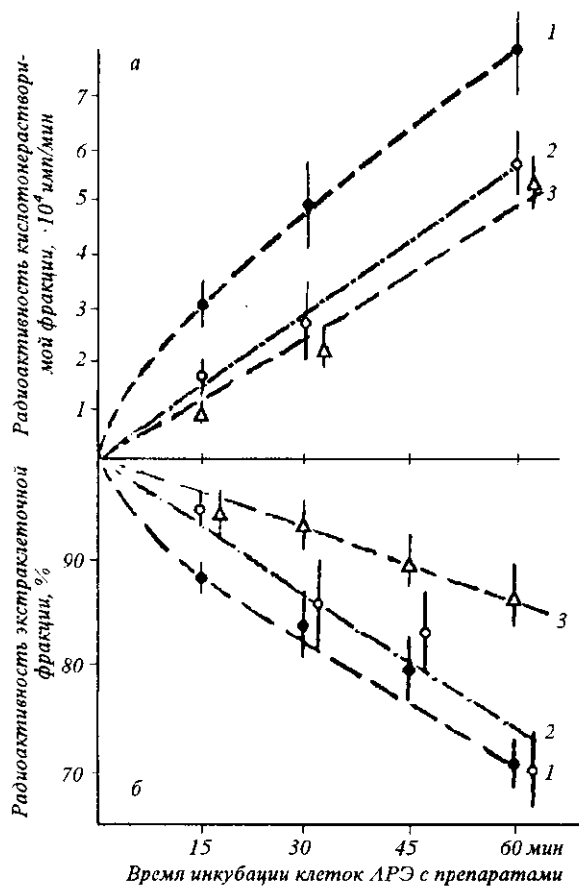


Рис. 2. Включение ^3H -тимидина (а) и транспорт его в клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) (б) в контроле (1), в присутствии 1,5 мМ тиотэфа (2) и 50 мкг/мл ДНТ АКЭ (3)

и дезоксицитидина) для АКЭ и непосредственно связано с высоким количеством пермеазы тимидина в мембранах клеток АКЭ.

Предположив далее, что противоопухолевый эффект препаратов ДНТ вряд ли исчерпывается ингибированием транспорта и включения нуклеозидов в клеточные НК, мы исследовали возможность непосредственного проникновения алкилированных фрагментов ДНК в клетки опухоли.

В опыте, где вместо меченого тимидина для инкубации с клетками АКЭ была взята меченая тиотэфом ДНК, установлено, что за 1 ч инкубации через мембрану проникает около 0,8—1 мкг препарата на 1 млн клеток ($\approx 1\%$ от внесенного количества ДНТ). В последующих экспериментах по изучению связывания клетками АКЭ радиоактивно меченных ДНК и ДНТ обнаружено, что опухолевые клетки адсорбируют обе кислоты, причем большая часть их оказывается резистентной к нуклеазе, что и объясняет приведенный выше низ-

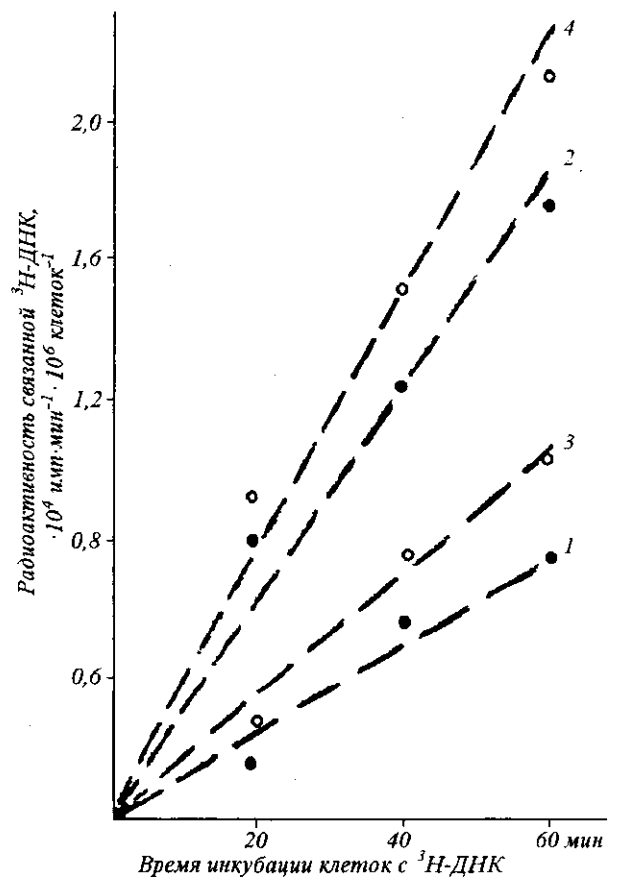


Рис. 3. Поглощение клетками асцитной карциномы Эрлиха меченых экзогенных ДНК и ДНТ: 1 — нативная меченая ДНК; 2 — она же в присутствии 5 % ДМСО; 3 — ДНК, алкилированная меченым тиотэфом; 4 — она же в присутствии 5 % ДМСО

кий процент включения меченой ДНК. В присутствии ДМСО, увеличивающего неспецифическую проницаемость клетки, этот процесс усиливается (рис. 3). Препарат ДНТ и здесь более эффективно, чем ДНК, адсорбируется мембраной опухолевых клеток.

Если предположить, что механизм проникновения молекул ДНК и ДНТ одинаков, то большую адсорбируемость ДНТ можно объяснить уменьшением отрицательного заряда ДНК при ее алкилировании, что приводит к увеличению ее адсорбции отрицательно заряженной опухолевой клеткой.

Поскольку основную роль в связывании препаратов ДНК и ДНТ с мембраной клетки играет ее белковый компонент (а это подтверждается тем, что даже кратковременная обработка клеток АКЭ протеиназой — 1 мин, 50 мкг/мл — приводит к уменьшению адсорбции ДНК и ДНТ на 50—55%, не нарушая при этом жизнеспособности клеток и включения ими экзогенного уридина), становится

понятным, что решающую роль в обеспечении биологического эффекта исследуемых препаратов играет алкилирование ими в первую очередь ферментов нуклеинового обмена клетки.

Следующим важным фактором, объясняющим противоопухолевый эффект ДНТ, является, по-видимому, ее способность непосредственно проникать внутрь клетки, сшивая нераскрытыми азиридиновыми циклами двойные цепи клеточных НК. Это подтверждается сделанным ранее Лавлеем [13] выводом о том, что бифункциональные алкилирующие агенты обладают более сильным цитостатическим эффектом, чем монофункциональные, благодаря их способности сшивать двойные цепи макромолекул ДНК. Именно такими дифункциональными алкилирующими агентами выступают ДНК, модифицированные радикалом R1. Алкилирование самих предшественников нуклеинового синтеза (нуклеозидов) вряд ли имеет большое значение, поскольку модификация пиримидиновых оснований осуществляется крайне незначительно [1, 8].

Учитывая тот факт, что транспорт олигонуклеотидов в клетки опосредован специфической системой переноса через клеточную мембрану [14], можно ожидать, что мономерные алкилированные соединения легче проникают в клетки, только находясь в составе олигонуклеотидов. Этим и объясняется их меньшая противоопухолевая активность в сравнении с активностью ДНТ, представляющей собой алкилированный полинуклеотид, фрагментированный до разного размера олигонуклеотидов в результате спонтанной апуринизации алкилированных оснований и гидролиза гликозидных связей нуклеотидов, т. е. процессов, сопровождающих реакции алкилирования.

И, наконец, модифицированные радикалом R1 ДНТ обладают большей гидрофобностью, чем препараты с радикалом R, и поэтому легче проникают через клеточную мембрану.

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

Effect of thioTEPA modified DNA forms and their monomeric components of varying alkylation degree on synthesis of nucleic acids in tumor cells

Summary

The effect of thioTEPA alkylated DNA preparations and their monomeric components on the transfer and uptake of labeled DNA precursors, thymidine and uridine, dependently on the alkyl radical structure has been studied in vitro. The alkylated preparations were found to inhibit preferentially DNA synthesis in carcinoma Ehrlich and hepatoma Zajdel cells being less effective relative to RNA

synthesis. The preparations bearing unclosed asiridine cycles appeared to be more effective. There was no discernible variation in the effects of homo- and heterologous alkylated DNAs. Monomeric nucleic acids alkylated components (bases, nucleosides and nucleotides) showed less pronounced effect comparing with thioTEPA alkylated DNA.

T. P. Волошук, Ю. В. Пацковский, А. И. Потопальский, I. I. Воробьева

Вплив модифікованих тіотетом ДНК і їхніх мономерних компонентів різного ступеня алкилювання на синтез нуклеїнових кислот пухлинних клітин

Резюме

У дослідях in vitro досліджено вплив алкілованих препаратів нуклеїнових кислот (НК) і їхніх мономерних компонентів на транспорт і включення до складу клітинних НК мічених попередників НК — тимідину і уридину залежно від будови алкільного радикала. Зазначено, що алкіловані препарати переважно гальмують синтез ДНК пухлинних клітин карциноми Ерліха і гепатоми Зайдела і набагато менше впливають на синтез РНК. Ефективнішими виявилися препарати, які містять нерозкриті азиридинові цикли. Помітних розходжень у пригнічуючій дії гомо- і гетерологічних алкілованих ДНК не спостерігалось. Мономерним алкілованим компонентам НК (основи, нуклеозиди і нуклеотиди) притаманний менш виражений, ніж алкілованій ДНК, ефект.

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. Серебряный А. М., Андриевский Г. В., Беккер А. Р., Сибельдина Л. А., Поволоцкая М. И. Направления алкилирования дезоксигуанозина и дезоксигуанозинмонофосфорной кислоты тиотэфом // Биоорг. химия.—1986.—12, № 4.—С. 714—716.
3. Серебряный А. М., Андриевский Г. В., Беккер А. Р., Сибельдина Л. А., Шарова О. Л. Строение продуктов модификации нуклеотидов и ДНК этиленимином и тиотэфом // Биоорг. химия.—1987.—13, № 6.—С. 786—792.
4. Пятигорская Т. Л., Жилкова О. Ю., Шелковский В. С., Косевич М. В., Гризодуб А. И., Тоян В. Н., Суходуб Л. Ф. Изучение продуктов превращения тиофосфамида в водных растворах методами тонкослойной хроматографии и масс-спектропии. // Хим.-фарм. журн.—1985.—№ 10.—С. 1235—1241.
5. Швед А. Д., Соломко А. П., Потопальский А. И., Ивасика С. В., Грищенко А. М., Александров Ю. Н., Ткачук З. Ю., Цегельский А. А., Крылова Э. Л., Ткачук Л. В., Семерникова Л. И. Структурно-функциональные особенности модифицированных нуклеиновых кислот // Молекуляр. биология (Киев).—1980.—Вып. 26.—С. 64—78.
6. Потопальский А. И., Грищенко А. М., Нечаева Л. Н. Влияние препаратов нативных и модифицированных ДНК на синтез ДНК в лейкозных клетках // Распознавание и меры борьбы с лейкозами человека и животных.—М., 1982.—С. 52.
7. Швед А. Д., Сливак Н. Я., Онищук Ф. Д. Изучение антивирусной активности экзогенных нуклеиновых кислот и их химически модифицированных производных // Макромолекулы клеток и вирусов: Сб. науч. трудов.—Киев: Наук. думка, 1986.—С. 47—60.

8. Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленимина. 2. Алкилирование нуклеозидов // Биоорг. химия.—1993.—19, № 4.—С. 484—493.
9. Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленимина. 3. Алкилирование нуклеотидов // Биоорг. химия.—1993.—19, № 5.—С. 562—569.
10. Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленимина. 4. Алкилирование гомополинуклеотидов и ДНК // Биоорг. химия.—1999.—25, № 6.—С. 464—473.
11. Виноградова Р. П., Кучеренко М. С., Литвиненко А. Р., Цудзевич Б. О., Васильев О. М. Біологічна хімія.—Київ: Вища школа, 1977.—384 с.
12. Grunicke H., Hirsch E., Wolf H. Selective inhibition of thymidine transport at low doses of the alkylating agent trisethyleniminobenzoguinone (trenimon) // Exp. Cell Res.—1975.—90, N 1.—P. 357—364.
13. Lawley P. D., Brookes P. Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides // Biochem. J.—1963.—89, N 1.—P. 127—138
14. Loke C. A., Stein H. H., Zhang S. L. 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 01.04.03