

23 03 92

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО НАРОДНОМУ ОБРАЗОВАНИЮ

ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ имени ПАТРИСА ЛУМУМБЫ

На правах рукописи

УДК 616.424—089:612.017.1

ТИХОПОВ Юрий Владимирович

МЕТАБОЛИЗМ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ
СОЕДИНЕНИЙ И ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ

(03.00.04 — биохимия)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва 1991

Работа выполнена в отделе биохимии НИИ 2-го Московского ордена Ленина Медицинского Института им. Н. И. Пирогова.

Официальные оппоненты:

чл.-корр. АМН СССР, доктор медицинских наук,
профессор Б. Ф. КОРОВКИН

доктор биологических наук, профессор Г. А. ЯРОВАЯ
доктор биологических наук, профессор А. А. КОНДРАШИН

Ведущая организация — Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова.

Защита состоится «.....» 1992 года в..... часов на заседании специализированного совета Д 053.22.02 при Университете Дружбы Народов им. Патриса Лумумбы по адресу: Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8. Медицинский корпус.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ордена Дружбы народов Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы по адресу: 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан «.....» 1991 года.

Ученый секретарь специализированного совета,
доктор медицинских наук, профессор
В. Э. ТОРБЕК

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Раскрытие биохимических механизмов взаимодействия организма и опухоли принадлежит к одной из самых актуальных проблем современной биологии и медицины. В первую очередь это связано с тем, что в целостном организме неспластическая трансформация ткани приводит к многочисленным нарушениям метаболических звеньев обмена веществ и энергии в органах и тканях, непосредственно не затронутых опухолевым процессом, что, в свою очередь, обуславливает нарушение тканевого гомеостаза. Необходимо отметить, что советскими учеными принадлежит приоритет в развитии общих подходов и концепций к развитию метаболической депрессии, вызванной системным влиянием опухолевой ткани на организм и его защитных реакций (Р.Е.Кавецкий, 1977, 1982; В.С.Шапот, 1975; В.М.Дильман, 1983; Г.И.Потытсва и В.С.Шапот, 1987).

К настоящему времени получено много данных о разнообразных нарушениях обмена веществ, возникающих под влиянием опухолевого процесса: Эти нарушения затрагивают белковый, углеводный, липидный, водно-электролитный и другие виды обмена (Е.Т.Мауэ, 1971; V.S.Shapot, 1979; Я.Wood et al., 1982). Кроме того, в опухолевом организме наступают специфические изменения в таких системах, как ретикулоэндотелиальная (В.Венесераф & В.Слark, 1961), эндокринная (Е.М.Самуцджан, 1973; В.М.Дильман, 1984), иммунная (Ю.А.Уманский, В.Г.Пигуча, 1982; В.В.Городилова, М.Н.Воева, 1983) и других. Другими словами, метаболическое давление опухоли, оказываемое на функциональное состояние различных систем организма приводит к разнообразным расстройствам гомеостаза, ускоряющим, а во многих случаях и определяющим летальный исход.

Полученные к настоящему времени результаты позволяют обсуждать конкретные биохимические механизмы взаимодействия опухоли и организма, однако, необходимо отметить, что изучение процессов, протекающих в организме-опухоленосителе на молекулярном уровне находится в начале своего пути. Дальнейшие исследования в этом направлении могут иметь большое значение для понимания этиологии и патогенеза "раковой болезни", а также для разработки путей резистентности организма к развитию неоплазмы (Р.Е.Кавецкий, 1982).

В ряду систем, ответственных за сохранение гомеостаза

целостного организма, одно из ключевых мест принадлежит ферментным системам обмена пуриновых и пиримидиновых соединений. Выполняя "замечательное разнообразие функций" (А.Ленниджер), они принимают участие почти во всех видах обмена, являясь предшественниками нуклеиновых кислот (ПНК), промежуточными продуктами биосинтеза углеводов и липидов, компонентами основных коферментов и переносчиками свободной энергии. За последнее десятилетие накоплено много данных о физиологических и регуляторных функциях нуклеотидов и их производных в контроле пролиферативной и функциональной активности клеток (Т.Нови et al., 1977). Особенно пристальное внимание уделяется исследованиям особенностей обмена пуриновых соединений в лимфоидной ткани и иммунокомпетентных клетках, в которых они играют решающую роль в регуляции пролиферации, дифференцировки и осуществления функций (С.Н.Храмцова с соавт., 1984, 1986; Л.И.Филановская с соавт., 1987; G.J.Peters & J.H.Vaer- kamp, 1983; A.Cohen & J.Barakiewicz, 1986).

Известно, что развитие неоплазмы сопровождается перестройкой функционирования ферментных систем обмена ПНК в самих опухолевых клетках, связанной с резкими изменениями потенциальной активности ферментов биосинтеза нуклеотидов de novo, реутилизации нуклеозидов и азотистых оснований, а также ферментов их катаболизма (В.С.Шапот, Г.И.Потапова, 1986; G.Meber, 1977, 1983). С другой стороны, в ряде работ было показано, что в тканях организма-хозяина выявляются нарушения нуклеинового обмена, изменения характера биосинтеза предшественников нуклеиновых кислот, особенностей транспорта через плазматические мембраны различных клеток и дифференциальной чувствительности к нуклеозидам и основаниям (R.Baserga & W.E.Risizoleski, 1961; T.Sirasaki & S.Fujii, 1975). Однако фрагментарность этих исследований не позволяют провести как систематизацию знаний об особенностях содержания и метаболизма нуклеотидов в тканях, так и комплексную оценку нарушений нуклеинового обмена в организме при канцерогенезе.

В то же время, сопоставление особенностей нуклеинового обмена в самой опухоли и тканях организма-опухоланосителя позволит выяснить характер их взаимодействия и определить конкретные механизмы, благодаря которым каждая опухоль преобразует метаболические преимущества для ее роста (В.С.Шапот и Г.И.Потапова, 1986).

Подобный подход нуждается в определении начальных,

промежуточных и конечных субстратов сложных метаболических цепей в различных тканях опухолевого организма, а также транспортных характеристик пуриновых и пиримидиновых производных в сопоставлении с активностью ферментов их метаболизма.

Цель и задачи исследования

Цель работы заключалась в изучении обмена пуриновых и пиримидиновых соединений в органах и тканях организма на разных стадиях развития опухолевого процесса и роли межтканевого сопряжения их метаболизма и транспорта, опосредуемого эритроцитами крови, в системе становления взаимоотношений "опухоль-организм".

Поставленная цель включала в себя решение следующих конкретных задач:

- 1 - разработку и оптимизацию различных методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (анионообменной, обращенно-фазной и ион-парной) для анализа качественного и количественного состава свободных нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований в биологических образцах.
- 2 - выявление основных особенностей формирования пула пуриновых и пиримидиновых соединений в печени и эритроцитах крови мышей, соответствующих начальной, экспоненциальной и стационарной стадиям роста гепатомы 22, а также асцитной опухоли Эрлиха.
- 3 - исследование динамики интенсивности включения меченых пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и их оснований в печень и эритроциты в условиях *in vivo* и *in vitro* с помощью радиоизотопных и хроматографических методов исследования с применением проточного радиоизотопного детектора.
- 4 - изучение тканеспецифичности нуклеотидного состава гепатомы 22 в процессе ее развития с помощью хроматографических и радиоизотопных методов исследования.
- 5 - исследование характера взаимоотношений между различными стадиями роста гепатомы и регенерирующей после операции частичной гепатэктомии печенью на уровне пуринового обмена в сопоставлении с морфологическими характеристиками пролиферации гепатоцитов.
- 6 - изучение основных закономерностей интенсивности транспорта пуриновых соединений в лимфоциты тимуса и селезенки мышей в

процессе роста гепатомы на основе разработанной формулы расчета метаболического потока соединения в системе "эритроциты-тромбоциты" в условиях *in vivo*.

- 7 - анализ изменений в метаболических потоках пуриновых соединений из эритроцитов в лимфоциты *in vitro*, выделенных на разных стадиях роста гепатомы, с помощью проточного радионуклеидного детектирования в высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Научная новизна работы

Впервые предпринято систематическое исследование закономерностей обмена пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, нуклеозидов и их оснований в различных органах и тканях организма с опухолью, а также в ткани солидной гепатомы 22. Для этого были разработаны различные методические подходы к анализу как всего пула ПНК, так и отдельных групп этих соединений в биологических образцах с помощью использования ион-парных реагентов в ВЭЖХ.

Впервые получены детальные качественные и количественные характеристики пулов пуриновых и пиримидиновых производных в печени, эритроцитах, тромбоцитах и лейкоцитах организма-хозяина в условиях возникновения и роста злокачественной гепатомы 22 и асцитного рака Эрлиха. Показано, что различным стадиям развития опухоли сопутствует глубокая перестройка функционирования ферментных систем обмена пуриновых и пиримидиновых соединений в тканях организма, что выражается в резких изменениях состава ПНК и характеристик интенсивности транспорта метаболитов в эти ткани.

В работе впервые обнаружена активация катаболизма пуринов в печени животных в экспоненциальную стадию роста гепатомы, что сопровождается возрастанием концентрации промежуточных пуриновых метаболитов в ткани печени и, одновременно, в эритроцитарной фракции крови, которые активно аккумулируют пуриновые нуклеозиды и основания. Сравнительная кинетика включения меченых пуринов в печень и эритроциты крови в процессе роста гепатомы подтверждает это положение.

Получены новые данные о роли эритроцитов, как транспортной системы переноса ПНК между органами и тканями организма. В период максимального роста опухоли из состава эритроцитов исчезают ключевые метаболиты пуринового ряда. В то же время, на всех стадиях роста как солидной гепатомы, так и асцитного рака Эрлиха в эритроцитах

прослеживается одна и та же закономерность: накопление фосфорилированных форм адениновых и гуанинских нуклеотидов, связанное с активацией пуриновых киназ.

В работе получены новые данные об особенностях метаболического пула пуриновых и пиримидиновых соединений в ткани растущей гепатомы. Показано значительное повышение фонда гуаниновых нуклеотидов с одновременным дефицитом аденилатов, а также активное аккумулярование клетками гепатомы пуриновых оснований из крови.

Впервые была исследована экспериментальная модель регенерирующей печени после операции частичной гепатэктомии, выполненной на фоне роста опухолевой ткани. Это позволило выявить закономерности формирования нуклеотидных пулов, как в ткани печени, так и в эритроцитах крови животных, соответствующее активации и подавлению пролиферативной активности гепатоцитов в экспериментальную и стационарную стадии роста гепатомы в организме-опухолестоходе.

Разработанная формула расчета метаболических потоков соединений из эритроцитов в тимоциты и спленоциты в условиях *in vivo* с помощью импульсного введения меченого соединения позволила получить характеристики транспорта пуриновых нуклеосидов и оснований, включающие в себя обратную пропорциональную зависимость между интенсивностью транспорта гипоксантина в тимоциты и его внутриклеточной концентрацией в экспоненциальную стадию роста гепатомы. Для инозина это соотношение было прямо пропорциональным.

Принципиально новым является разработанный подход к анализу метаболических потоков соединений между различными клетками с помощью применения проточного радионуклеотидного детектирования в ВЭЖХ. Впервые были найдены закономерности обмена пуринов в тимоцитах и эритроцитах крови в условиях опухолевой прогрессии и показано наличие сопряженной системы транспорта и обмена пуриновых соединений между красными клетками крови и лимфоцитами тимуса, поскольку аккумулярованная в эритроцитах метка была зарегистрирована в тимоцитах после их совместной инкубации с эритроцитами, причем в большей степени в виде аденозининофосфорной кислоты.

В результате проведенного анализа особенностей формирования тканеспецифичных пулов свободных ЛНК и их транспортных характеристик сформулировано представление о функциональной системе межтканевой сопряжения метаболизма пуриновых и пиримидиновых производных, которая включает в себя альтернативные пути их биосинтеза (de novo и

salvage), катаболизм транспорта и утилизации и функционирующая в режиме гомеостаза.

Научно-практическая значимость работы

Работа представляет собой экспериментальное исследование закономерностей нарушений нуклеинового обмена в тканях опухолевого организма. Практическое значение имеют разработанные хроматографические методики оптимизации разделения свободных ПНК в биологических образцах с учетом тканевой и клеточной специфичности состава пуриновых и пиримидиновых соединений. Полученные данные раскрывают одно из звеньев метаболических нарушений при канцерогенезе, и могут быть использованы для разработки новых принципов терапии злокачественных новообразований с помощью естественных метаболитов пуринового и пиримидинового ряда и направленных на регуляцию и коррекцию ферментных систем обмена ПНК в тканях организма и, особенно, иммунокомпетентных органах.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Формирование пуринового и пиримидинового пула в печени и гепатоме 22 в процессе ее развития в организме обнаруживает тесную взаимозависимость, опосредованную эритроцитами крови, что приводит к качественному и количественному перераспределению состава свободных предшественников НК в этих тканях, включающему в себя:

- активацию биосинтеза гуаниновых нуклеотидов в клетках гепатомы с одновременным дефицитом аденилатов (особенно АТФ), а также резкое увеличение концентрации пуриновых оснований, связанное с повышенной аккумуляцией опухолевыми клетками аденина, гуанина и гипоксантина из крови организма-хозяина, что указывает на специфический характер обмена пуринов в опухолевой ткани.

- активацию катаболизма пуринов в печени животных в экспоненциальную стадию роста гепатомы с одновременным накоплением инозина, гипоксантина, ксантина и мочевой кислоты к 3-м суткам.

- возрастание концентрации адениновых и гуаниновых нуклеотидов в эритроцитах крови на всех стадиях роста гепатомы.

- резкое увеличение концентрации пуриновых нуклеозидов и оснований в эритроцитах в первые трое суток роста гепатомы.

- истощение эритроцитов пуриновыми нуклеозидами и основаниями к моменту достижения клетками гепатомы максимальной скорости роста

(5-7 сутки после инокуляции опухолевых клеток).

2. экспоненциальная стадия роста гепатомы 22 приводит к подавлению пролиферации гепатоцитов через 42 часа после операции частичной гепатэктомии и вызывает активацию катэбололизма пуриновых нуклеотидов в регенерирующей печени. Стационарная фаза роста гепатомы 22 стимулирует пролиферативные процессы в регенерирующей печени и активирует биосинтез адениновых и гуаниновых нуклеотидов. Частичная гепатэктомия, выполненная на 5-ые сутки роста гепатомы вызывает увеличение концентрации пуриновых нуклеотидов в эритроцитах крови мышей-опухоленосителей. На 12-ые сутки роста опухоли в эритроцитах резко снижаются концентрации гуаниновых нуклеотидов и АМР и возрастают уровни содержания ГМ, инозина и аденозина.

3. Функциональные и пролиферативные изменения в лимфоцитах тимуса и селезенки мышей СЗНА в процессе роста гепатомы 22 сопровождаются значительными изменениями внутриклеточного метаболизма пуринов, характер которого, в свою очередь, зависит от транспортных характеристик *in vivo* нуклеозидов и оснований. Наиболее выраженные изменения транспортных характеристик были найдены в клетках тимуса в 1-5 сутки роста опухоли и включали:

- резкую активацию интенсивности транспорта гипоксантина в тимоциты на 3-5 сутки роста гепатомы.

- обратно пропорциональную зависимость между интенсивностью транспорта гипоксантина в тимоциты и его внутриклеточной концентрацией и прямо пропорциональную зависимость этих показателей для инозина в экспоненциальную стадию роста гепатомы.

4. Метаболические пути гипоксантиниз и его производных в эритроцитах в лимфоцитах тимуса сопряжены с реакциями утилизации пуринов "salvage"-ферментами тимоцитов и имеют выраженную зависимость от стадии роста опухоли в организме.

5. На уровне целостного организма существует система межтканевого сопряжения метаболизма свободных предшественников нуклеиновых кислот, включающая в себя альтернативные пути биосинтеза (*de novo* и "Salvage"), катаболизма, транспорта и утилизации нуклеотидов, нуклеозидов и их оснований, функционирующая в режиме гомеостаза.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на I Всесоюзной конференции "Хроматография в биологии и медицине" (Москва, 1983), III Всесоюзном симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (Рига, 1984), v Всесоюзном биохимическом съезде (Киев, 1985), v Международном Дунайском симпозиуме по хроматографии (Ялта, 1985), Международном симпозиуме "Хроматография в биологии и медицине" (Москва, 1986), iv Всесоюзном симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (Алма-Ата, 1987), X Международном симпозиуме "Биомедицинское применение хроматографии и электрофореза" (Прага, 1988), Международном симпозиуме по гипоксии (Берлин, 1988), Научной конференции Института биохимии Берлинского Университета им. Гумбольдта "Метаболизм нуклеотидов и его применение в биомедицинских исследованиях" (Берлин, 1988), viii Всесоюзном симпозиуме по целенаправленному изысканию лекарственных веществ "Компоненты нуклеиновых кислот" (Рига, 1989), vii Международном Дунайском симпозиуме по хроматографии и электрофорезу (Лейпциг, 1989), xii Международном симпозиуме по структуре и функции эритроцитов (Берлин, 1989), xi Международном симпозиуме "Биомедицинское применение хроматографии и электрофореза" (Таллин, 1990), v Всесоюзном симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (Рига, 1990), 7-м Международном симпозиуме "Пуриновый и пиримидиновый метаболизм у человека" (Боннас, Англия, 1991).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 45 основных работ, в том числе 21 работа на английском языке. Получено 3 авторских свидетельства на изобретения.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы "Материалы и методы исследования", 5 глав экспериментального материала, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 201 странице, включая 23 таблицы и 57 рисунков. Список литературы содержит 54 отечественных и 196 зарубежных источников.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на мышах-самцах линии СЗНА/КУ и 1СЖ массой тела 18-20 г. В качестве экспериментальных моделей опухолевого роста применяли сингенную солидную гепатому 22 и асцитную опухоль Эрлиха. Штабы гепатомы 22 трансплантировали под кожу спины мышей СЗНА по $0,5-1,0 \times 10^7$ клеток в 0,5 мл раствора Хенкса и поддерживали сингенными перевивками. Асцитную опухоль Эрлиха инокулировали в брюшную полость интактных мышей линии 1СЖ. Операцию частичной гепатэктомии проводили на мышах СЗНА по методу Higgins & Anderson (1931).

Все исследования проводили на сроках, соответствующих начальной, экспоненциальной и стационарной стадиям роста опухолей. Забой животных проводили путем декапитации или дислокации шейных позвонков. Материалом для экспериментальных исследований служили печень, эритроциты и плазма крови мышей, а также тимус, селезенка и лимфоциты периферической крови. Суспензии тимоцитов и спленоцитов готовили в непритертом стеклянном корытцеком гомогенизаторе и центрифугировали в градиенте фиколл-верографана ($\rho=1,090$ г/мл) при 400 г в течение 30 мин.

Кислоторастворимые фракции (КРФ) исследованных органов и клеток получали методом однократной экстракции 0,6 M хлорной кислотой с последующей нейтрализацией супернатанта кон или K_2CO_3 и фильтрацией через фильтры 0,45 мкм "миллекс". Полученные КРФ биологических образцов использовали для радиохимических и хроматографических методов исследования.

Хроматографические методы исследования включали в себя разработку и оптимизацию методик высокоэффективной жидкостной колоночной хроматографии, позволивших проводить одновременно разделение всего класса пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований в градиентном режиме элюирования, а также набор изократических методик с использованием ион-парных реагентов для анализа фосфорилированных форм пуринов и разделения оснований, нуклеозидов и их монофосфатов (Р.Т.Тогузов с соавт., 1987, 1988; А.М.Рименев et al., 1986; Р.Т.Тогузов et al., 1989; Yu.V.Tikhonov et al., 1990). Все виды хроматографии проводили на двух модульных хроматографических системах: "waters" (США) и "Pectan" (США) с использованным колонкой "Bondapak C₁₈", "Novapak

C₁₈", "Ultrasphere ODS", "Ultrasphere IP" и "Ultrasphere ODS XL".

Радиоизотопные методы исследования включали в себя подсчет радиоактивности биологических образцов в жидкостном сцинтилляционном счетчике "LS 2800" (Beckman) и применение проточного радионуклидного детектирования в ВЭЖХ.

Для оценки интенсивности включения *in vivo* меченых пуринов в КРФ печени, эритроцитов и плазмы крови, а также тимочитов и спленоцитов в процессе роста гепатомы мышам вводили внутривенно за 5 мин до забоя по 10 мкКи [³H]гипоксантина, [³H]инозина, [¹⁴C]оротовой кислоты и [¹⁴C]уридина. Исследуемые КРФ (0,5 мл) растворяли в 5 мл толуольного сцинтиллятора в пластиковых флаконах. Результаты получали в единицах распад/мин (БРМ), используя программу счета двойной метки (³H и ¹⁴C) и расчетную программу автоматической компенсации гашения.

В экспериментах *in vitro* эритроциты и тимочиты выделяли на 3-и и 7-е сутки после инокуляции опухоли. Эритроциты пересаждали в физрастворе до концентрации $6.4 \cdot 10^8$ кл/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 90 минут с 50 мкКи/мл [¹⁴C]нур для мечення внутривитрицитарного пула пуриновых производных. Затем эритроциты осаждали и дважды отмывали в физрастворе. Тимочиты выделяли в градиенте фиколл-верографина. Клетки дважды отмывали в среде И90 и отбирали необходимый объем клеточной суспензии для последующей совместной инкубации. Тимочиты в концентрации $1.6 \cdot 10^8$ кл/мл инкубировали с эритроцитами, накопившими [¹⁴C]нур, в концентрации $8 \cdot 10^8$ кл/мл (соотношение 1/5) в течение 20 и 60 минут при 37°C при непрерывном перемешивании, затем отделяли их в градиенте фиколл-верографина ($\rho=1,090$, 300 г, $t=30$ мин). Тимочиты и эритроциты дважды отмывали в физрастворе, осаждали и клеточный осадок и среду инкубации обрабатывали холодной 0.6 М HClO₄ для получения КРФ.

Хроматографические разделения проводили на системе GOLD (Beckman). Для управления модулями, сбора, обработки и вывода на печать хроматографических данных использовали персональный компьютер IBM PC AT и программу GOLD Software. Для обработки радиоизотопных хроматографических данных через последовательный вход RS-232 использовали программу "ChromateGraphics".

Весь материал обрабатывали статистически по методу Стьюдента (В.Ю.Урбах, 1964). Достоверными считали различия при $P < 0,05$.

III. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

III.1 Пуриновый и пиримидиновый метаболиты в гепатомах 22 в процессе ее роста.

В гепатомах с различной скоростью роста происходит глубокая биохимическая перестройка активности ферментов пуринового и пиримидинового метаболизма, например, резко увеличивается активность ферментов реутилизации пуриновых оснований и пиримидиновых нуклеозидов (G.Weber, 1977, 1983). По нашим данным, уровни аденина, гуанина и гипоксантина в составе ткани гепатомы 22 резко возрастают, что обеспечивает субстратами "salvage"-ферменты их утилизации (Табл. I). С другой стороны, анализ содержания адениновых нуклеотидов в ткани гепатомы 22, начиная с 7-х суток ее роста показал, что их общий уровень в 1,5 раза ниже, чем в интактной печени мыши 3. В то же время динамика изменений гуаниновых нуклеотидов существенно отличается от таковой аденилатов: концентрации моно-, ди- и трифосфатов гуанозина достоверно превышают значения, характерные для печени, а содержание ГМФ в 3-4 раза возрастает на 11-13 сутки роста гепатомы (Табл. I).

Снижение концентрации АТФ, по-видимому, специфично для неоплазмы и может быть связано с низкой активностью аденилаткиназы и высокой активностью АМР-деаминазы в гепатомах (G.Weber et al., 1987). Поскольку на всех исследованных сроках концентрация ГМФ (ключевого метаболита пуринового ряда) снижается, а уровень инозина возрастает только к 11-м суткам, то это может свидетельствовать о высокой активности ГМР-дегидрогеназы, приводящей к накоплению ГИФ. Действительно, ранее было показано, что в гепатомах с разной скоростью роста повышается активность ГМР-дегидрогеназы и снижается активность 5-нуклеотидазы (Y.Natsumeda et al., 1983). Следовательно, накопление гуаниновых нуклеотидов в клетках гепатомы может указывать на специфический характер обмена пуринов в опухолевой ткани.

Одним из главных факторов обмена пиримидиновых нуклеотидов в опухолевых клетках следует считать значительное изменение соотношения путей биосинтеза *de novo* и "salvage"-пути их биосинтеза (G.Weber, 1983; В.С.Шапог, Г.И.Потемова, 1985). Первый путь включает в себя активность комплекса ферментов синтеза уридинатов через стадии образования оротовой кислоты, а второй заключается в прямой активации фосфорилирования свободных пиримидиновых нуклеозидов, в первую очередь уридина и тимидина.

Таблица I

Содержание пуриновых и пиримидиновых соединений
в КРБ ткани гепатомы 22 в процессе ее развития
(мкмоль/100 г; $n + m$; $n = 3$)

Соединение	Время после инокуляции гепатомы 22 (сутки)			
	I	9	II	13
ATP	94,9 ± 9,8	135,4 ± 12,8	74,0 ± 8,1	57,8 ± 5,4
ADP	58,3 ± 6,2	86,4 ± 8,5	48,2 ± 5,1	45,8 ± 4,9
AMP	55,6 ± 5,8	64,2 ± 6,2	83,9 ± 8,4	106,8 ± 11,2
GTP	48,4 ± 4,6	35,1 ± 3,7	26,5 ± 2,3	28,8 ± 3,1
GDP	20,8 ± 2,3	17,9 ± 1,6	32,4 ± 3,3	17,8 ± 2,1
GMP	18,4 ± 1,5	23,6 ± 2,7	35,5 ± 3,4	43,7 ± 5,3
IMP	20,5 ± 2,2	13,4 ± 1,5	6,8 ± 0,8	8,6 ± 1,0
Ado	7,0 ± 0,8	11,9 ± 1,4	6,9 ± 0,7	8,5 ± 0,9
Gua	9,8 ± 1,1	8,2 ± 0,9	4,6 ± 0,3	5,2 ± 0,4
Ado	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2,9 ± 0,2	5,5 ± 0,6
Ino	8,2 ± 0,7	9,6 ± 1,0	18,1 ± 1,7	9,3 ± 0,8
Hyp	22,5 ± 2,1	28,6 ± 2,3	12,4 ± 1,4	14,8 ± 1,6
Xan	4,3 ± 0,3	5,4 ± 0,5	14,6 ± 1,7	15,3 ± 1,4
Uric A	3,7 ± 0,3	8,6 ± 0,7	11,2 ± 1,3	17,2 ± 1,6
UTP	31,9 ± 3,2	62,5 ± 6,4	44,5 ± 4,2	27,2 ± 2,8
UDP	17,6 ± 1,5	45,7 ± 4,4	56,1 ± 5,8	32,6 ± 4,1
UMP	10,3 ± 1,2	6,6 ± 0,7	14,3 ± 1,3	37,5 ± 3,2
Urd	6,6 ± 0,7	17,1 ± 1,9	8,3 ± 0,7	10,4 ± 1,1
Ura	2,4 ± 0,3	8,4 ± 1,0	13,8 ± 1,8	6,3 ± 0,5
UMP	16,4 ± 1,4	21,2 ± 2,3	12,4 ± 1,3	18,1 ± 2,1
Cyd	12,9 ± 1,1	8,3 ± 0,6	10,4 ± 1,2	11,6 ± 1,3
Cyt	2,9 ± 0,2	6,1 ± 0,5	3,1 ± 0,4	12,4 ± 1,1
IMP	8,5 ± 0,7	16,0 ± 1,4	12,8 ± 1,3	6,1 ± 0,8
dThd	3,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1	7,0 ± 0,6	12,3 ± 1,4

По полученным нами данным в ткани гепатомы 22 на 7-е и 9-е сутки в 2 раза возрастает уровень УТР, а UDP достигает максимальных значений на 9-11 сутки ее роста. 13-е сутки характеризуются высокими значениями IMP и CMP, что может быть связано с распадом rNA, поскольку в эти сроки уже имеются крупные очаги некроза в гепатоме. На терминальных сроках роста гепатомы в составе КРБ были идентифицированы высокие уровни тимидина, урацила и цитозина.

Исследование, проведенное с введением меченых метаболитов мышам с растущей гепатомой показало возрастание включения $[^{14}C]Urd$ и $[^{14}C]Uro$ на 9-11 сутки. При этом концентрация свободного уридина в гепатоме достигала 17 мкмоль/100 г на 9-е сутки. На этих же сроках уровень уридина в печени мышей-опухоленосителей снижался до самых низких значений.

Таким образом, формирование пуринового и пириmidинового пула в гепатоме 22 обнаруживает специфические черты их метаболизма, что связано с двумя факторами: с изменением активности ферментов их обмена в опухолевой ткани и с активацией поглощения клетками гепатомы свободных нуклеозидов и оснований.

III.2 Пуриновые и пириmidиновые нуклеотиды в печени мышей-субстратовосприимчивых.

Известно, что кинетическая кривая роста гепатомы 22 имеет характерную для солидных злокачественных гепатом S -образную форму, точка перегиба на которой, соответствующая максимальной скорости роста, достигается через 6-8 суток после инокуляции опухолевыми клетками (И.П. Садовникова, Л.К. Обухова, 1932). Поэтому в работе были проанализированы метаболические характеристики пуриновых и пириmidиновых производных в печени организма хозяина в течение 3 недель роста гепатомы (Табл.2).

Таблица 2

Содержание пуриновых соединений в КГД печени мышной особи в процессе роста гепатомы 22 (среднее \pm SD; n = 3)

Форма	Время после инокуляции гепатомы 22 (сутки)							
	1	3	5	7	9	11	13	
ATP	162,7 \pm 14,8	197,1 \pm 7,6	22,2 \pm 8,7	69,5 \pm 5,2	136,3 \pm 14,1	139,0 \pm 11,5	130,3 \pm 12,5	79,4 \pm 10,2
ADP	110,5 \pm 17,1	170,4 \pm 15,5	139,2 \pm 14,8	133,8 \pm 12,9	166,7 \pm 9,5	105,1 \pm 9,4	147,3 \pm 12,5	73,8 \pm 10,2
GMP	76,6 \pm 9,2	92,7 \pm 9,2	95,3 \pm 7,4	115,0 \pm 10,2	174,5 \pm 11,6	78,7 \pm 11,5	132,5 \pm 11,5	76,1 \pm 9,2
GDP	23,8 \pm 2,8	30,5 \pm 1,9	19,1 \pm 1,6	8,1 \pm 0,6	17,0 \pm 1,3	21,7 \pm 2,5	13,1 \pm 1,6	14,8 \pm 1,2
UMP	14,6 \pm 1,8	13,7 \pm 1,1	16,4 \pm 1,7	16,7 \pm 2,2	9,4 \pm 0,8	12,2 \pm 1,4	16,3 \pm 2,2	15,7 \pm 0,9
UMP	11,6 \pm 1,2	20,9 \pm 3,2	22,5 \pm 2,5	26,7 \pm 2,1	31,4 \pm 3,6	22,1 \pm 3,1	16,3 \pm 1,9	15,7 \pm 1,3
UMP	26,4 \pm 3,2	20,7 \pm 1,9	13,7 \pm 1,2	15,6 \pm 1,4	17,5 \pm 2,1	26,6 \pm 2,3	12,7 \pm 1,7	23,6 \pm 2,6

Анализ формирования нуклеотидных пулов в ткани печени в процессе роста гепатомы показал, что, начиная с 1-х суток после инокуляции опухолевыми клетками, возрастает дефицит в содержании АТФ и АДФ в печени при одновременной концентрации на 3-5 сутки роста гепатомы. Одновременно

временно возрастают уровни монофосфатов аденозина и гуанозина и снижается к 3-5-м суткам концентрация ключевого метаболита пуринового ряда - инозинмонофосфата (Табл.2).

В то же время, пуриновые нуклеозиды и основания, а также конечный продукт катаболизма пуринов - мочевая кислота - достигают максимальных значений к 3-м суткам роста гепатомы (Рис.1). Подобная динамика изменений пуринового пула свидетельствует об активации катаболизма пуринов в печени мышей-опухоленосителей в экспоненциальную стадию роста гепатомы.

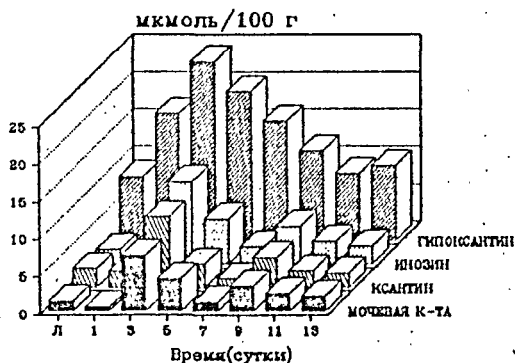


Рис.1 Уровни содержания нуклеозидов и оснований в печени мышей в процессе роста гепатомы 22.

Исследование интенсивности включения меченых инозина и гипоксантина в КРФ печени выявило, что на всех исследованных сроках между интенсивностью включения меченых соединений и уровнями содержания "холодных" субстратов имела место обратно пропорциональная зависимость, особенно выраженная для гипоксантина на 3-5-е сутки роста опухоли (Рис.2).

В стационарную фазу роста (9-13 сутки) в КРФ печени возрастали концентрации макроэргов, ГМР, а также уровни нуклеозидов и оснований. К 11-м суткам уровень мочевой кислоты был также в пределах контроля. Следовательно, в реакции ткани печени на развитие опухолевого процесса можно выделить две фазы: фазу активации катаболизма адениновых и гуаниновых нуклеотидов (экспоненциальная стадия роста опухоли) и фазу активации salvage-реакций реутилизации пуриновых оснований (стационарная фаза роста).

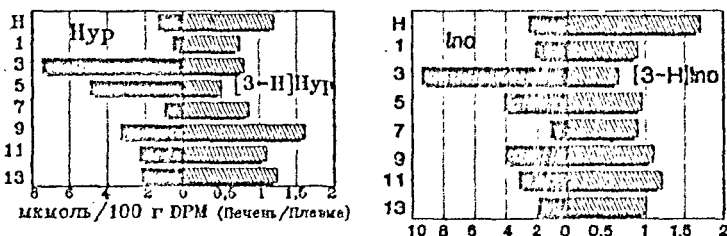


Рис.2. Интенсивность включения $[^3\text{H}]$ тимпксантина и $[^3\text{H}]$ инозина и уровни их содержания в КРЭ печени на разных сроках роста гепатомы.

Динамика изменений уридинового нуклеотидного пула в печени мышей в процессе роста опухоли также позволяет выделить две фазы: фазу катаболизма уридилатов в экспоненциальную стадию и фазу активации биосинтеза пиримидинов в стационарную стадию роста гепатомы (Табл.3).

Таблица 3

Содержание пиримидиновых соединений в КРЭ печени мышей с/на в процессе роста гепатомы 22 (микомоль/100 г; $\bar{m} \pm m; n = 3$)

Норма	Время после инокуляции гепатомы 22 (сутки)							
	1	3	5	7	9	11	13	
UTP	26,6 \pm 2,4	36,0 \pm 3,3	19,8 \pm 1,6	12,3 \pm 0,9	35,6 \pm 3,2	14,0 \pm 1,8	27,4 \pm 2,2	21,4 \pm 2,6
UDP	24,5 \pm 2,6	16,0 \pm 1,8	40,5 \pm 3,8	35,2 \pm 3,2	41,8 \pm 4,2	46,8 \pm 4,0	38,1 \pm 3,6	14,6 \pm 1,2
UMP	22,4 \pm 2,1	34,3 \pm 3,1	56,4 \pm 4,8	52,2 \pm 5,0	41,4 \pm 4,4	37,1 \pm 3,2	32,2 \pm 2,8	33,6 \pm 3,9
UMP	6,4 \pm 0,5	12,0 \pm 1,3	13,6 \pm 1,2	16,3 \pm 1,7	12,3 \pm 1,1	23,5 \pm 2,5	11,2 \pm 1,4	7,9 \pm 0,8
Urd	1,6 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1	9,3 \pm 0,9	3,7 \pm 0,4	0,8 \pm 0,06	2,7 \pm 0,3	5,2 \pm 0,4	2,8 \pm 0,2
Ura	--	--	0,7 \pm 0,05	1,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,02	--	--	--

Так, падение концентрации UTP сопровождается пропорциональным увеличением уровней ди- и монофосфатов уридина. Кроме того, на 3-7-е сутки резко возрастает уровень уридина и снижается появляется урацил.

Известно, что в печени мышей с солидной гепатомой 22 активность уридинкиназы довольно низкая (В.С. Шапот, Г.И. Потапова, 1986). По

Наши данные, интенсивность включения [14 C]уридина в КРФ печени ниже контрольных величин на всех исследованных сроках, с минимальными значениями на 7-е сутки роста гепатомы. С другой стороны, интенсивность включения [14 C]оротовой кислоты в КРФ печени держится на низком уровне в течение всей экспоненциальной стадии роста гепатомы и увеличивается только к 9-м суткам (рис.3).

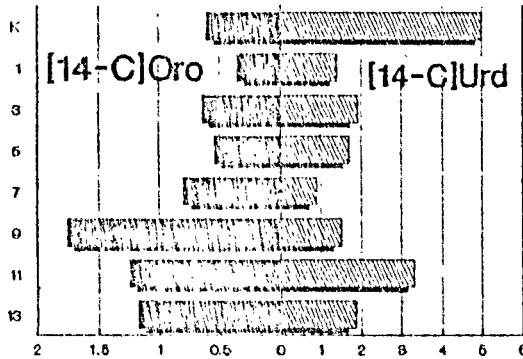


Рис.3. Интенсивность включения [14 C]уридина и оротовой кислоты в КРФ печени на разных сроках роста гепатомы.

Накопление свободного уридина в КРФ печени на 3-и сутки не может быть связано с его повышенной аккумуляцией из крови животных, поскольку включение экзогенного меченого уридина на этом сроке существенно снижено. Следовательно это может быть вызвано активацией катаболизма уридилатов, т.е. повышением активности пиридиновой 5-нуклеотидазы. С другой стороны, активное накопление печеночной тканью экзогенного меченого оротата может быть вызвано только активацией синтеза пиридинов *de novo*. Учитывая высокое содержание смр на этих сроках роста гепатомы, полученные данные коррелируют с выводами В.С.Шапота (1986) о резком увеличении отношения скорости включения оротат/уридин, как предшественников смр РНК по сравнению с тканью здоровых животных.

Таким образом, анализ особенностей формирования нуклеотидных пулов в ткани печени опухолевого организма позволяет выдвинуть положение об ответной реакции организма на рост опухоли, заключающейся в снижении фосфорилированных форм как пуринов, так и

пиримидинов в начальный период роста опухоли, что сопровождается аккумуляцией в печени нуклеозидов и оснований. В стационарную стадию роста гепатомы в печени животных-опухоленосителей активируются реакции анаболизма нуклеотидов и возрастает интенсивность транспорта уридина и оротовой кислоты.

III.3 Метаболизм нуклеотидов в эритроцитах крови мышей-опухоленосителей

Известно, что эритроциты крови млекопитающих выполняют функцию транспорта свободных ПНК в организме, являясь эффективной системой доставки нуклеозидов и их оснований тканям, обладающим ограниченными возможностями биосинтеза нуклеотидов *de novo* (Konishi & Ichihara, 1979). С другой стороны, в зрелых эритроцитах отсутствуют ферменты синтеза пуринов *de novo*, а также фермент ксантиноксидаза, катализирующий конечный этап катаболизма пуриновых соединений (Micheli & Ricci, 1983; Bontemps et al., 1985).

В работе Y. Konishi & A. Ichihara было показано, что эритроциты аккумулируют и переносят пурины, синтезируемые в печени, причем при регенерации печени после частичной гепатэктомии гепатоциты продуцируют в кровяное русло не аденин и гуанин, а гипоксантин, инозин и ксантин, которые накапливаются, соответственно, в эритроцитах.

В наших исследованиях было обнаружено, что на разных стадиях развития двух типов злокачественных опухолей (асцитной опухоли Эрлиха и солитарной гепатомы 22) в эритроцитах крови мышей наблюдается накопление фосфорилированных форм аденозина и гуанозина (Табл. 4, 5). Динамика распределения моно- ди- и трифосфатов пуринов в эритроцитах мышей с гепатомой и, в большей степени, с асцитной опухолью Эрлиха свидетельствует об активации киназных реакций их биосинтеза. Известно, что в ретикулоцитах концентрация пуриновых нуклеотидов значительно выше, чем в зрелых клетках крови (A. Werner et al., 1988). По нашим данным, в процессе развития опухоли Эрлиха выявляется ретикулоцитоз (количество ретикулоцитов в контроле - 1,7% ; на 5-е сутки - 3,4% ; на 12-е сутки - 4,8%), однако его количественные характеристики не могут объяснить существенного возрастания аденилатов и гуанилатов в эритроцитах крови в опухолевом организме. Это может быть связано с активацией киназных реакций фосфорилирования пуринов, направленных на синтез соответствующих нуклеотидов.

Таблица 4

Содержание пуриновых соединений в эритроцитах мышей 1С8 с трансплантированной асцитной опухолью Эрлиха (нмоль/мл, $M \pm m$)

Соединение	Контроль n = 3	Время после инокуляции опухоли	
		5 день n = 3	12 день n = 4
ATP	1278,4±186,2	2017,0±163,8	2020,8±110,4
ADP	149,0±4,5	165,2±15,1	421,8±76,2
AMP	20,5±1,2	62,2±9,3	174,2±62,2
GTP	126,2±15,1	158,2±21,3	485,9±85,4
GDP	18,5±4,7	28,3±3,5	44,7±4,9
GMP + IMP	14,1±1,5	22,0±6,2	92,8±17,9
Adc	0,8±0,1	0,7±0,1	1,5±0,3
Ado	0,8±0,2	0,8±0,1	6,1±1,9
Ino	2,2±0,3	0,6±0,1	2,6±1,4

Таблица 5

Содержание пуриновых соединений в эритроцитах мышей СЗНА с трансплантированной солидной гепатомой 22 (нмоль/мл, $M \pm m$)

Соединение	Контроль n = 3	Время после инокуляции опухоли	
		5 день n = 3	12 день n = 4
ATP	632,6±87,4	686,8±92,8	773,9±81,4
ADP	105,9±11,4	90,2±10,4	105,9±11,4
AMP	15,5±2,2	19,5±2,6	25,6±5,1
GTP	37,6±5,4	62,2±8,8	43,6±6,2
GDP	17,0±2,9	22,3±4,4	19,3±3,1
GMP	3,8±0,5	2,7±0,4	2,9±0,3
Adc	1,6±0,2	—	2,7±0,3
Ado	1,0±0,3	0,2±0,01	—
Hyp	2,8±0,4	—	2,1±0,4
Ino	2,6±0,4	0,4±0,05	2,2±0,5

В экспоненциальной фазе роста гепатомы 22 в эритроцитах резко возросло содержания основных пуриновых метаболитов, при этом к 5-м

суткам из состава КРФ исчезали аденин и гипоксантин, а аденозин и инозин были идентифицированы в следовых количествах (Табл.3). Поскольку эритроциты являются переносчиками указанных соединений, а одним из основных их источников в крови животных служит печень [B.Lowy & M.Lerner, 1974; Y.Konishi & A.Ichihara, 1979]. Их накопление в эритроцитах может быть прямо связано с катаболизмом пуринов в печени на ранних сроках роста гепатомы. Кроме того, интенсивность включения [14 C]инозина на всех исследованных сроках не превышала контрольные величины, а включение [14 C]гипоксантина имело два выраженных максимума - на 3-и и 9-е сутки роста опухоли, при этом уровень "холодного" гипоксантина на 5-9 сутки снижался до следовых количеств.

Обнаруженное накопление пуриновых нуклеотидов в эритроцитах крови опухолевого организма на разных стадиях развития асцитной опухоли Эрлиха и солидной гепатомы 22 может быть связано с увеличением "буферной емкости" эритроцитов для пуриновых соединений в условиях прогрессии неоплазмы. Вероятно, срабатывают защитные механизмы "удержания" пуриновых соединений в эритроцитах за счет накопления фосфорилированных форм нуклеозидов, которые, как известно, не проходят через плазматическую мембрану. В пользу этого предположения говорит и факт истощения эритроцитов пуриновыми нуклеозидами и азотистыми основаниями (особенно у мышей с солидной гепатомой 22) в экспоненциальную фазу роста опухолей, что может быть вызвано активным захватом предшественников нуклеиновых кислот из эритроцитов крови животных не только опухолевыми, но и другими клетками организма, например, иммунокомпетентными, в которых на ранних стадиях роста гепатомы происходят резкие изменения пуринового метаболизма [С.Н.Храмцова с соавт., 1986].

III.4 Метаболический путь пуриновых соединений в регенерирующей печени и эритроцитах крови мышей в процессе роста гепатомы 22

Регенерирующая после операции ЧЭ печень грызунов представляет собой удобную для исследования модель импульсно индуцированного процесса размножения дифференцированных клеток (Н.А.Мальотина с соавт., 1966; А.М.Полышук, 1983). По данным Н.А.Мальотиной с соавт. (1989) пролиферативный процесс в регенерирующей печени мышей развивается строго закономерно, коррелируя со сроком после операции.

Авторы работы показали, что вариабельность синтеза ДНК определяется величиной клеточных популяций, последовательно вступающих в S-фазу и значительно различающихся у разных мышей. Что касается таких характеристик пролиферативного процесса в регенерирующей печени, как время активации синтеза ДНК в популяции гепатоцитов, скорость продвижения клеток по митотическому циклу, то они достаточно стабильны.

Нами была предпринята попытка оценить формирование нуклеотидного пула в КРФ паренхимы регенерирующей печени и эритроцитах крови животных-опухоленосителей в сопоставлении с морфологическими характеристиками развития пролиферативного процесса в печени.

III.4.1 Морфологические характеристики регенерирующей печени мышей в процессе опухолевого роста

На 5-е и 12-е сутки роста опухоли проводили операцию частичной гепатэктомии (ЧГЭ), соответственно, на этих же сроках операции ЧГЭ проводилась параллельно у двух групп интактных мышей. Проллиферативные процессы в печени у контрольных мышей через 42 часа после ЧГЭ развиваются на высоком уровне (около 200% митозов). Митотическая активность составляет 35% и 160% индекс меченых ядер. Часть гепатоцитов представлена в состоянии постмитотической реконструкции (67%). У мышей с гепатомой в стадии экспоненциального роста уровень пролиферации гепатоцитов значительно снижен по сравнению с контрольными мышами, хотя фазы процесса совпадают.

Во второй серии эксперимента у контрольных мышей после ЧГЭ уровень пролиферативной активности гораздо ниже чем в первой серии (индекс меченых ядер - 36%, митозов - 8%, постмитозов - 18%). В то же время, в стационарной фазе роста опухоли в печени мышей-опухоленосителей через 42 часа после ЧГЭ наблюдается значительная активация пролиферации гепатоцитов по сравнению с контрольными мышами (индекс меченых ядер - 212%, митотический индекс - 37%, индекс постмитозов - 106%).

Таким образом, ЧГЭ, выполненная на животных в экспоненциальной стадии роста гепатомы, сопровождается подавлением уровня пролиферативных процессов в печени. В то же время, ЧГЭ у мышей с гепатомой в стационарной стадии роста гепатомы приводит к резкой стимуляции размножения гепатоцитов.

III.4.2* Регенерирующая печень

Анализ полученных данных позволяет заключить, что подавление пролиферативной активности гепатоцитов после ЧЭ в экспоненциальную стадию роста гепатомы (5-7 сутки) сопровождается накоплением в ткани печени как адениновых, так и гуаниновых нуклеотидов. Причем возрастают концентрации всех фосфорилированных форм.

Противоположная картина наблюдается в регенерирующей печени в стационарную фазу роста опухолевой ткани: снижение концентрации всех нуклеотидов аденинового и гуанинового ряда. Уровни содержания нуклеозидов и оснований (за исключением инозина) снижаются и падает концентрация мочевины.

В работе *В. Barbironi et al (1973)* был изучен синтез ДНК в гепатоме Морриса 7618а на фоне регенерирующей печени крыс после ЧЭ, а также в самой регенерирующей печени. Авторами был показан транзиторный эффект подавления включения меченого тимидина в ДНК гепатомы в первые 27 часов после ЧЭ с последующей стимуляцией синтеза ДНК. Поскольку в ряде работ было выявлено стимулирующее влияние повышенного уровня в кровяном русле гормона роста и глукгона на регенерацию печени (*Moatlen et al., 1970*) авторами приходит к выводу, что опухолевой процесс в организме можно рассматривать как состояние стресса, приводящее к стимуляции процесса регенерации (*Barbironi et al., 1973*).

В нашем исследовании стимуляция регенерации печени была выявлена только на поздних сроках роста опухолевой ткани, тогда как в экспоненциальную фазу роста гепатомы был зарегистрирован противоположный эффект - подавление пролиферативной активности гепатоцитов. Если принять во внимание вывод о состоянии стресса, то это состояние в большей степени можно отнести к поздним срокам развития опухолевого процесса. В то же время, стадия максимальной скорости роста опухолевых клеток в организме скорее всего связана с усиленной конкурентной неоплазией с тканями организма за жизненно важные метаболиты, в том числе и за пуриновые соединения.

Следовательно, между печенью и растущей гепатомой осуществляется "спряжение" обмена пуриновых соединений, поэтому представлялось необходимым получить ответ не только на вопрос об изменении характера взаимоотношений между различными фазами роста гепатомы и гепатоцитами регенерирующей печени, индуцированными к пролиферации частичной гепатэктомией, но и об особенностях

Формирования пула пуринов в эритроцитах крови в данной экспериментальной модели, осуществляющих транспорт этих соединений.

III.4.3 Эритроциты крови животных в условиях регенерации печени и роста гепатомы

Как было нами показано, в эритроцитах опухолевого организма на ранних стадиях роста как асцитной опухоли Эрлиха, так и солидной гепатомы 22 наблюдается накопление пуриновых нуклеотидов: моно-, ди- и трифосфатов аденозина и гуанозина.

По полученным данным, операция ЧЭ, выполненная в опухолевом организме, приводит к аналогичному результату: возрастанию концентрации ди- и трифосфатов аденозина, причем, как в экспоненциальную, так и в стационарную фазы роста гепатомы. С другой стороны, имеются и существенные отличия. Так, на 14-ые сутки роста гепатомы резко падают уровни содержания ВТР, ВДР, и ВМР.

Учитывая зарегистрированный параллельно подъем концентрации AMP и инозина можно предположить, что поздние сроки роста гепатомы, стимулирующие регенераторный процесс в печени, приводят к активации катаболизма гуанилатов в эритроцитах. Об этом же свидетельствует и снижение концентрации AMP с одновременным увеличением концентрации аденозина. Следовательно, формирование эритроцитарного пула пуриновых соединений зависит от типа размножающихся в организме клеток: стимулированная пролиферативная активность гепатоцитов при репаративной регенерации сопровождается иным статусом и динамикой распределения пуринового пула в эритроцитах крови, чем размножение опухолевых клеток в очаге злокачественного новообразования.

Сравнительный анализ интенсивности включения меченого тимидина в ДНК различных линий гепатом и печени животных в организме-опухоленосителе [Ferdinandus et al., 1970; Rizzo et al., 1970] выявила сложную картину конкурентных отношений биосинтеза ДНК и пролиферативной активности клеток печени и гепатомы, которые включали в себя изменения как количественных характеристик синтеза НК, так и качественных - задержку вступления гепатоцитов в S -период в регенерирующей печени в опухолевом организме. Следовательно, в данном конкретном случае, эритроциты крови следует рассматривать в качестве сопрягающей системы обмена свободных ПНК между двумя очагами пролиферативной активности в организме, отражающими характер конкурентных взаимоотношений тканей с опухолевыми клетками.

III.4 Сравнительная оценка метаболических характеристик пуриновых соединений в лимфоцитах тимуса и селезенки мышей в процессе опухолевого роста.

Одним из специфических признаков действия опухоли на организм является вызываемое ею состояние иммунодепрессии, биохимические механизмы которой до сих пор остаются невыясненными [Д.А.Уманский, 1982; Г.И.Потапова, В.С.Шапот, 1987].

Вместе с тем, определение активности ферментов в условиях насыщения субстратом не позволяют дать адекватную оценку реальных скоростей метаболических реакций [В.С.Шапот, Г.И.Потапова, 1986]. Кроме того, фактическая доступность пуриновых субстратов, состояние транспортных систем переноса пуринов через плазматические мембраны клеток в условиях патологии и могут определять реальные скорости ферментативных реакций и, тем самым, функциональный и пролиферативный статус иммунокомпетентных клеток.

Нами была проведена оценка изменений в обмене пуриновых соединений в тимocyтaх и спленocyтaх мышей в условиях роста опухолевой ткани, исходя из транспортных характеристик гипоксантина и инозина в сопоставлении с внутриклеточным пулом пуринов.

Интенсивность транспорта Hyp и Ino в тимocyтaх и спленocyтaх ("метаболические потоки") вычислялась на основе результатов по включению $[^3\text{H}]\text{Hyp}$ и $[^3\text{H}]\text{Ino}$ в эритроциты и лимфоциты через 5 минут после внутрибрюшинного введения меченых субстратов, с учетом эритроцитарного содержания гипоксантина и инозина. Для этих целей учитывались данные по уровню накопления $[^3\text{H}]\text{Hyp}$ и $[^3\text{H}]\text{Ino}$ в эритроцитах на всех исследуемых сроках развития опухоли, а также данные по содержанию "холодных" субстратов - Hyp и Ino в эритроцитах. После чего вычисляли относительную молярную долю α соответствующего экзогенного меченого соединения с учетом его удельной радиоактивности. Вследствие высокой удельной активности меченых $[^3\text{H}]$ -пуринов, доля меченого субстрата в его общем внутриэритроцитарном пуле не превышала 0,2%, поэтому введение радиоактивного пурина в организм животного не оказывало влияния на характер его внутриклеточного метаболизма. Используя данные по накоплению $[^3\text{H}]\text{Hyp}$ и $[^3\text{H}]\text{Ino}$ в лимфоцитах тимуса и селезенки на исследованных сроках роста опухоли, вычисляли реальные потоки Hyp и Ino в тимocyтaх и спленocyтaх из эритроцитов крови. Расчет проводили по следующей формуле:

Формула расчета "метаболического потока" гипоксантина и инозина из эритроцитов крови в тимоциты.

$$T = 12 * \frac{L_e^T}{L_e^{ЭР}} * C^{ЭР}$$

- где: T = интенсивность транспорта гипоксантина и инозина в лимфоциты тимуса (пмоль/10⁶ кл/час)
 L_e^T = включение [³H] Нур (Ino) в тимоциты (распады/мин/10⁶ кл/5 мин).
 L_e^{ЭР} = включение [³H] Нур (Ino) в эритроциты крови (распады/мин/мл/5 мин).
 C^{ЭР} = концентрация гипоксантина (инозина) в эритроцитах крови (пмоль/мл).

Процесс роста гепатомы 22 у мышей существенно образом влияет на характеристики транспорта и метаболизма пуриновых соединений в клетках органов иммунной системы. Так, в экспоненциальную стадию роста опухоли наблюдалось увеличение интенсивности транспорта исследуемых метаболитов в клетки тимуса: резкая активация поступления Нур в тимоциты на 3-5 сутки роста гепатомы (Рис.4).

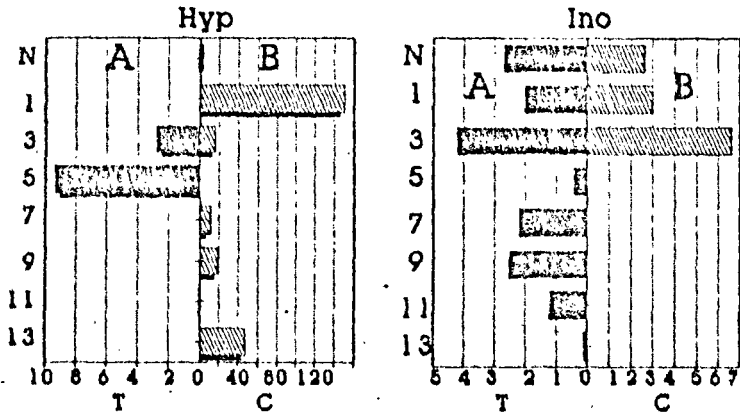


Рис.4. Интенсивность транспорта (T = пмоль/10⁶ кл/60 мин) Нур и Ino (A) и их внутриклеточное содержание (B) (C=пмоль/10⁶ клеток) в тимоцитах мышей с22а в процессе роста гепатомы 22.

При этом концентрация эндогенного Hyp возрастала в 50 раз на 1-е сутки и в течение 3-5 суток убывала до следовых количеств (Табл.6).

Таблица 6.

Содержание пуриновых соединений в лимфоцитах тимуса мышей CBA в процессе роста солидной гепатомы 22 (пмоль/ 10^6 кл; $\bar{m} \pm m$; $n=4$)

Соединение	Норма	Время после инокуляции гепатомы 22 (сутки)						
		1	3	5	7	9	11	13
Ade	24.0 ±2.8	24.2 ±3.1	29.5 ±3.0	10.6 ±1.4	34.8 ±4.1	55.9 ±6.1	40.7 ±5.4	32.0 ±5.9
Gua	11.1 ±2.1	10.9 ±0.9	13.4 ±1.8	6.6 ±0.9	14.4 ±2.1	23.7 ±2.0	16.0 ±2.8	34.2 ±4.1
Hyp	2.7 ±0.5	149.9 ±16.8	16.4 ±1.2	*	11.3 ±1.9	19.9 ±2.4	*	47.3 ±5.8
Xan	-	*	*	-	14.6 ±2.2	*	*	7.1 ±1.8
Ino	2.6 ±0.6	3.0 ±0.4	6.6 ±0.8	-	-	-	-	-
Ado	-	-	-	5.2 ±0.7	1.9 ±0.4	4.4 ±1.3	-	-

* - следовые количества (0,1 - 0,4 пмоль/ 10^6 кл)

Соотношение транспортных характеристик Ino и его концентраций в тимоцитах на разных сроках роста опухоли было иным, чем у Hyp : поступление Ino в тимоциты только на 3-и сутки превышало норму, тогда как уровень его содержания возрастал в течение первых трех дней развития гепатомы, с последующим исчезновением из состава КРФ тимоцитов (Табл.6; Рис.4). Другими словами, между интенсивностью транспорта Hyp в тимоциты и его внутриклеточной концентрацией прослеживалась обратно пропорциональная зависимость, тогда как для Ino это соотношение было прямо пропорциональным.

Данные по изменению активности ключевых ферментов пуринового метаболизма (таких, как АДА, ПНФ и 5-N) в тимоцитах в период до достижения клетками гепатомы максимальной скорости роста [Barankiewicz & Cohen, 1987] в сопоставлении с характером изменений активности этих ферментов при дифференцировке и созревании тимоцитов [С.Н.Храцова с соавт., 1986] дает основание предположить наличие

блока в дифференцировке и созревании тимоцитов в этот период развития опухоли. Исходя из полученных нами данных, интенсивный транспорт I_{no} наряду с резким подъемом уровня Hyp в тимоцитах на первые сутки роста гепатомы свидетельствует об изменении характера активности инозинового цикла в этих клетках, характерном для перехода тимоцитов в 6-фазу [A.Cohen, 1984]. Это подтверждается низким уровнем Ado в тимоцитах (Табл.6) в период до 3-их суток, который согласуется с данными литературы о повышении активности АДА в тимоцитах через 5 часов и 1 сутки после инокуляции опухолевых клеток [С.Н.Храмова с соавт., 1986].

С другой стороны, уже 5-е сутки роста гепатомы, соответствующие началу периода максимальной скорости ее роста, характеризовались повышенным содержанием в тимоцитах Ado , что соответствует данным о 6-кратном падении активности АДА в этих клетках к этому периоду, а содержание оснований Ado и Gua уменьшалось в два раза по сравнению с нормой (Табл.6). При этом концентрации Hyp и I_{no} в эритроцитах также значительно снижались по сравнению с нормой.

Таким образом, в период, предшествующий развитию блока в дифференцировке тимоцитов на фоне растущей опухоли, происходит возрастание потоков в эти клетки I_{no} и, в особенности, Hyp , сопряженное с транспортной функцией эритроцитов. Необходимо отметить, что скорость поступления Hyp в клетки тимуса была на 1-2 порядка больше его концентрации в тимоцитах, тогда как для I_{no} эти величины сравнимы. Подобная динамика метаболических потоков может свидетельствовать о значительном усилении salvage-утилизации пуринов (в особенности, гипоксантина) индуцируемой растущей опухолью.

На более поздних сроках развития гепатомы изменения в обмене пуринов характеризовались значительным замедлением интенсивности транспорта Hyp и I_{no} с одновременным возрастанием концентрации пуриновых оснований (Табл.6; Рис.4). Результаты согласуются с данными литературы об увеличении активности ПНЭ в тимоцитах на этих сроках роста гепатомы [Г.И.Потапова с соавт., 1986]. Учитывая, что относительно высокие значения ПНЭ-активности регистрировались в недифференцированных тимоцитах [M.Massala, 1982], результаты свидетельствуют об увеличении доли незрелых клеток в тимусе на терминальных сроках роста опухоли.

Исследования метаболических сдвигов в спленоцитах показали, что интенсивность транспорта в них Hyp была максимальной на 3-й и 11-е

сутки, а I_{no} на 1-е и 7-е сутки роста гепатомы (Рис.5):

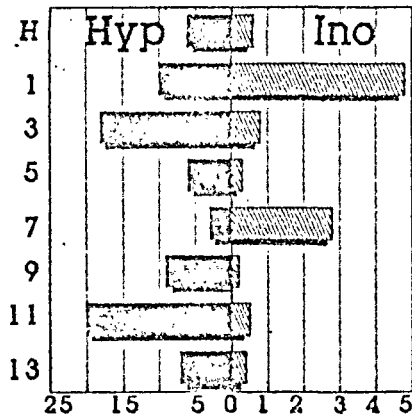


Рис.5. Интенсивность транспорта (T -моль/ 10^6 кл/60 мин) Hup и I_{no} в спленоцитах мышей сЗНА в процессе роста гепатомы. 22.

Однако, даже максимальные значения транспортных величин в спленоцитах были ниже уровня их эндогенного пула. Особенно это заметно для транспорта I_{no} . Высокие уровни Adc и Gua достоверно снижались к 5-7 суткам эксперимента (Табл.7), а концентрация Hup резко возрастала на 1-3 сутки в 3 раз, с последующим снижением к терминальным срокам роста опухоли.

Анализ имеющихся работ показывает, что к 3-м суткам роста гепатомы активность АДА в т- и в-лимфоцитах селезенки мышей уменьшается в 1,5-3,0 раза, а активность 5-Н в обских субпопуляциях лимфоцитов, наоборот, увеличивается в 2-3 раза [Г.И.Потанова с соавт., 1986; С.П.Храпцова с соавт., 1986]. Однако хроматографический анализ КРФ спленоцитов показал низкий уровень в них Adc в период 1-3 суток с последующим возрастанием концентрации на 7-9 сутки роста опухоли (Табл.7). Из всех сроков не идентифицировали нуклеотид I_{no} , что согласуется с повышенной активностью фермента ПНЭ в клетках этого органа иммунодепрессии [С.П.Храпцова с соавт., 1986].

Составительно динамика эндогенного содержания Hup в спленоцитах и интенсивности его транспорта на ранних сроках (до 7-их суток) роста гепатомы может свидетельствовать об активации "холостого"

режима функционирования I_{HbO} -цикла: при этом увеличение транспортных поставок экзогенного Hup в лимфоциты с последующим включением его в salvage-реакции сопровождается параллельным ростом активности 5'-Н, приводя к преимущественному дефосфорилированию образующегося I_{Hb} . С этим предположением согласуется наблюдение о торможении к 5-ым суткам активности синтеза нуклеиновых кислот в т- и в-лимфоцитах селезенки [С.Н.Урашова с соавт., 1986].

Таблица 7.

Содержание пуриновых соединений в лимфоцитах селезенки мышей с/зна в процессе роста солидной гепатомы 22 (пмоль/ 10^6 кл; $\bar{M} \pm m$; $n=4$)

Соединение	Норма	Время после инокуляции гепатомы 22 (сутки)						
		1	3	5	7	9	11	13
Ade	12.7 ±6.2	55.6 ±5.1	34.0 ±4.2	11.4 ±2.2	19.0 ±1.8	81.0 ±9.4	47.8 ±6.0	83.5 ±8.9
Gua	23.4 ±2.6	22.2 ±3.1	19.4 ±1.8	6.1 ±0.7	15.1 ±1.4	34.4 ±3.8	24.5 ±3.6	38.6 ±3.2
Hup	1.5 ±1.3	39.5 ±4.1	49.0 ±3.8	23.2 ±3.4	54.6 ±6.8	53.7 ±4.8	43.4 ±5.4	14.4 ±2.1
Xan	13.5 ±1.5	*	35.2 ±3.8	*	126.0 ±13.5	135.7 ±12.4	26.8 ±3.2	80.9 ±9.9
Ada	14.0 ±1.8	-	18.9 ±2.2	30.4 ±4.2	6.1 ±0.5	9.1 ±1.2	-	-

* - следовые количества (0.1 - 0.4 пмоль/ 10^6 кл)

Терминальные сроки роста гепатомы 22 характеризовались высокими уровнями содержания Ade и Gua, близкими к нормальным значениям Hup и низкими значениями интенсивности транспорта пуринов, в особенности I_{Hb} (Табл.7). Подобная динамика наблюдалась как в селезенках, так и в тимусах, и, по-видимому, свидетельствует о значительном снижении активности ферментных систем анаболизма пуринов.

Таким образом, функциональные и пролиферативные изменения в лимфоцитах тимуса и селезенки мышей с/зна в процессе роста гепатомы 22 сопровождаются значительными изменениями внутриклеточного метаболизма пуринов, характер которого, в свою очередь, зависит от транспортных характеристик *in vivo* нуклеозидов и оснований. Наиболее выраженные изменения транспортных характеристик были найдены в клетках тимуса в 1-5 сутки роста опухоли.

Поскольку в проведенной работе рассматривались метаболические потоки в системе "эритроциты-тимоциты", для более детального исследования метаболических потоков пуриновых соединений в лимфоциты была применена метод проточного радиокисотопного детектирования, позволяющий анализировать отдельные звенья цепей биохимических реакций в клетках.

III.5 Моделирование *in vitro* метаболических потоков пуриновых соединений из эритроцитов в тимоциты печени в условиях развития гепатомы 22.

Исходя из полученных закономерностей интенсивности транспортных потоков гипоксантина и инозина в тимоциты и спленоциты в условиях *in vivo*, мы развили идею эритроцитарно-зависимых метаболических потоков в клетках различных органов и тканей, в частности, в органах иммуногенеза, моделируя процессы транспорта экзогенного [^{14}C]гипоксантина в тимоциты печени *in vitro* в условиях, затрагивающих функциональный статус иммунной системы: в экспоненциальной и максимальной стадии роста гепатомы 22, с использованием принципиально новых возможностей, которые дает применение проточного радиокисотопного детектора в высокоэффективной жидкостной хроматографии [A.Vaitkemp, 1987].

Сравнительный анализ распределения меченых метаболитов между эритроцитами и тимоцитами после их совместной инкубации показывает, что большая часть введенной в эритроциты метки (в виде [^{14}C]нур) сосредоточена в [^{14}C]АмР.

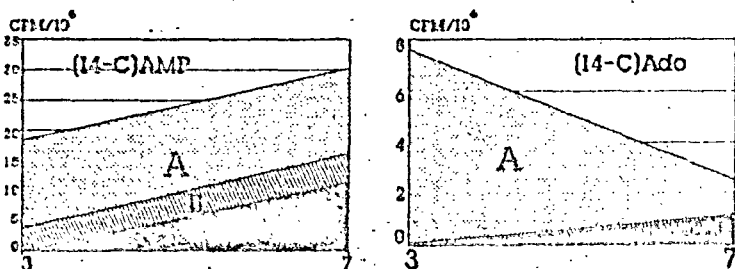


Рис.6 Распределение [^{14}C]АмР и [^{14}C]Адо в тимоцитах (А) и эритроцитах (В), выделенных на 3 и 7 сутки роста гепатомы, при их совместной инкубации в течение 60 минут, а также в среде инкубации (С). (эритроциты предварительно метились [^{14}C]нур).

Причем на 3-и сутки роста опухоли меченый АМР идентифицируется только в тимоцитах и среде инкубации, тогда как на 7-е сутки АМР был выявлен также и в эритроцитах.

На Рис.6 видно, что на 7-е сутки роста гепатомы уровень меченого АМР значительно накапливается в лимфоцитах тимуса и незначительно возрастает в среде инкубации. С другой стороны, на 3-и сутки роста гепатомы, в тимоцитах был идентифицирован меченый аденозин (в эритроцитах и среде инкубации [14 С]Адо отсутствовал), а на 7-е сутки меченый аденозин приблизительно поровну был распределен между фракциями тимоцитов и эритроцитов.

Необходимо отметить, что при 20-мин совместной инкубации эритроцитов и тимоцитов, выделенных на 7-е сутки роста гепатомы, метка идентифицировалась преимущественно в эритроцитарной фракции (в виде АМР, Ino/Guo и Адо), тогда как 60-мин инкубация приводила к тому, что основная часть меченых соединений обнаруживалась в лимфоцитах тимуса, причем помимо перечисленных соединений, входила также и во фракции IMP/GMP и Hup/Gua (Рис.7).

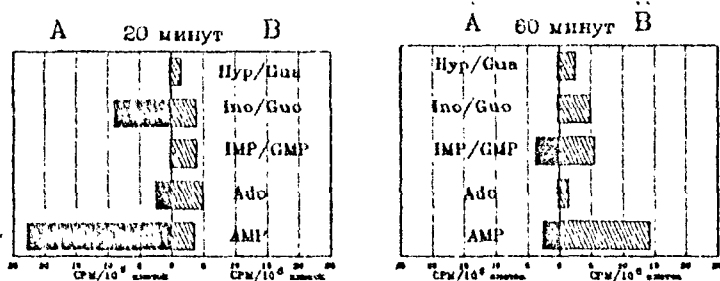


Рис.7 Распределение [14 С]Hup в эритроцитах (А) и тимоцитах (в), выделенных на 7 сутки роста гепатомы при их совместной инкубации в течение 20 и 60 минут

Сравнение радионуклеотидных хроматограммы показывает, что при 20 инкубации в среде идентифицируются нуклеозиды и основания, тогда как 60 инкубации приводит к появлению в среде АМР, но не нуклеозидов и оснований. Это наблюдение может указывать с большой степенью вероятности, что в тимоцитах транспортируется не сам меченый гипоксантин, а продукты катаболизма предварительно синтезированных пуринов.

Данные, полученные с помощью УФ-детектирования, также указывают на увеличение концентрации в среде инкубации свободных нуклеозидов и их оснований. Анализ распределения "холодных" метаболитов пуринового ряда в тимоицитах, полученных с помощью УФ-ВОЛХ, выявил что к 7-м суткам роста гепатомы, в тимоицитах наблюдается общее снижение всех пуриновых метаболитов (более, чем в два раза), а нуклеозиды аденозин и гуанозин исчезают из состава КРФ лимфоцитов тимуса (Рис.3).

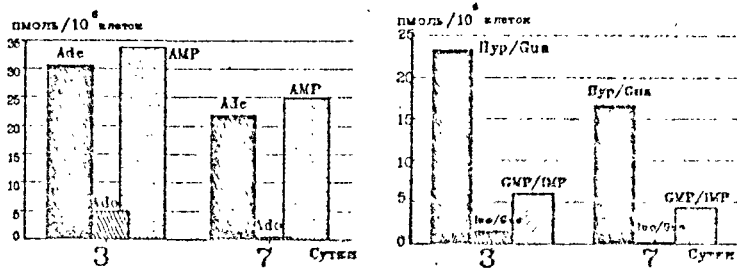


Рис.3 Уровни содержания пуриновых соединений в тимоицитах мышей на 3-й и 7-й день роста гепатомы 22.

Обращает на себя внимание сравнимые концентрации "холодных" АМР и аденина поскольку меченый аденин нами не был обнаружен в тимоицитах, как на 3-и, так и на 7-е сутки роста гепатомы.

Полученные результаты позволяют сделать следующие обобщения.

Во-первых, проведенный эксперимент можно считать одним из свидетельств наличия сопряженной системы транспорта и обмена пуриновых соединений между красными клетками крови и лимфоцитами тимуса, поскольку аккумулятивная в эритроцитах метка была зарегистрирована в тимоицитах после их совместной инкубации с эритроцитами, причем в большей степени в виде аденозинмонофосфорной кислоты.

Во-вторых, картина распределения меченых и "холодных" пуриновых метаболитов в тимоицитах (обратно пропорциональная зависимость для нуклеозидов и их монофосфатов) позволяет сделать вывод, что транспорт [¹⁴С]пур (или его метаболитов) в лимфоциты тимуса сочетается с реакциями его утилизации внутриклеточными ферментами, такими, как гипоксантин-гуанин-, а также аденинфосфорибензилтрансферазами.

В-третьих, в тимоцитах опухолевого организма, для которых были показаны глубокие нарушения пуринового обмена при росте экспериментальных гепатом [С.Н.Храмцова с соавт., 1986], эти изменения могут быть связаны не только с собственно метаболическими реакциями в самих клетках, но и с нарушением транспорта пуриновых метаболитов в системе "эритроциты - тимоциты", так как пуриновый обмен и в эритроцитах также претерпевает специфические изменения в опухолевом организме. Этот вывод можно сделать на основе распределения меченых и "холодных" пуриновых производных на 3-и и 70-е сутки роста гепатомы (Рис.7,в).

Думается, что найденное явление может послужить новым направлением в исследованиях, направленных на поиск биохимических механизмов подавления иммунитета в опухолевом организме, а также, в конкретном случае, в выяснении сложной зависимости между пуриновым метаболизмом и нарушениями в дифференцировке и созревании лимфоцитов иммунокомпетентных органов при возникновении и развитии злокачественных новообразований.

✓ РЕКОМЕНДАЦИИ К ПРАКТИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты могут использоваться при планировании исследований, направленных на выяснение роли нуклеинового обмена в тканях организма при организации пролиферативных и деструктивных процессов на экспериментальных моделях и клиническом материале.

Метаболическое давление опухоли на организм, приводящее к нарушению функционального гомеостаза, следует рассматривать в терминах изменений межклеточного сопряжения обмена биомолекул, выполняющих интегративные функции в организме. С этой точки зрения возможны новые подходы к разработке принципов терапии различных заболеваний, особенно злокачественных опухолей и аутоиммунных процессов, эффективный поиск физиологически активных веществ, корректирующих иммунодефицитные состояния, а также направленно модулирующих те или иные функции организма через пуриновый и пиримидиновый метаболизм.

Разработанные методы высокоэффективной жидкостной хроматографии предшественников нуклеиновых кислот, а также ряд теоретических положений могут быть использованы на курсах биохимии, иммунологии и

онкологии для более глубокого пояснения интегрирующей роли метаболизма пуриновых и пиримидиновых соединений в органах и тканях в норме, а также при различных формах клинической патологии.

VI. В В О Д И

1. На уровне целостного организма существует система межтканевого сопряжения метаболизма свободных предшественников нуклеиновых кислот, включающая в себя альтернативные пути их биосинтеза (*de novo* и "Salvage"), катаболизма, транспорта и утилизации нуклеозидов и азотистых оснований, которая функционирует в режиме метаболического гомеостаза.
2. Развитие опухолевого процесса в организме приводит к трансформации обмена пуриновых и пиримидиновых соединений в печени, эритроцитах крови, лейкоцитах тимуса и селезенки организма-хозяина. Эти нарушения включают в себя перестройку активности ферментов биосинтеза нуклеотидов *de novo* и ферментов реутилизации нуклеозидов и оснований, изменение характеристик интенсивности их транспорта и катаболизма в клетках. Особенности метаболизма свободных предшественников нуклеиновых кислот органспецифичны и зависят от стадии роста опухоли.
3. Характер обмена нуклеотидов в ткани гепатомы специфичен, что выражается в активации биосинтеза гуаниновых нуклеотидов в клетках гепатомы с параллельным снижением уровня аденилатов (особенно АГР), а также в резком увеличении концентрации пуриновых оснований, связанном с повышенной аккумуляцией опухолевых клетками аденина, гуанина и гипоксантина из крови организма-хозяина.
4. Экспоненциальная стадия роста гепатомы 22 и асцитной опухоли Эрика включает:
 - активацию катаболизма пуринов в печени животных с односторонним накоплением гипоксантина, ксантина и мочевой кислоты.
 - возрастание уровня адениновых и гуаниновых нуклеотидов в эритроцитах крови на всех стадиях роста опухолей.
 - резкое увеличение концентрации пуриновых нуклеозидов и

- оснований в эритроцитах в первые три суток роста гепатомы.
- истощение эритроцитов пуриновыми нуклеозидами и основаниями к моменту достижения клетками гепатомы максимальной скорости роста (5-7 суток после инокуляции опухоли).
5. Экспоненциальная стадия роста гепатомы 22 приводит к подавлению пролиферации гепатоцитов через 42 часа после операции частичной гепатэктомии, что сопровождается возрастанием уровней адениновых и гуаниновых нуклеотидов с одновременной активацией катаболизма пуриновых нуклеотидов в регенерирующей печени. Стационарная фаза роста гепатомы 22 стимулирует пролиферативные процессы в регенерирующей печени и активирует биосинтез адениновых и гуаниновых нуклеотидов. Частичная гепатэктомия, выполненная на 5-ые сутки роста гепатомы вызывает увеличение концентрации пуриновых нуклеотидов в эритроцитах крови мышей-опухоленосителей, тогда как на 12-ые сутки роста опухоли в эритроцитах значительно снижается концентрация гуаниновых нуклеотидов и AMP и возрастают уровни IMP , инозина и аденозина.
6. Рост гепатомы 22 индуцирует изменения транспортных характеристик пуриновых нуклеозидов и оснований в лимфоцитах тимуса и селезенки мышей, включающих:
- резкую активацию интенсивности транспорта гипоксантина в тимоциты на 3-5 сутки роста гепатомы.
 - обратно пропорциональную зависимость между интенсивностью транспорта гипоксантина в тимоциты и его внутриклеточной концентрацией.
 - прямо пропорциональную зависимость этих показателей для инозина в экспоненциальную стадию роста гепатомы.
 - снижение интенсивности транспорта пуриновых соединений в тимоциты и спленоциты и увеличение концентрации пуриновых оснований и нуклеозидов на терминальных сроках роста гепатомы
7. Между эритроцитами и лимфоцитами тимуса показано наличие системы сопряжения транспорта и обмена пуриновых соединений в реакциях их утилизации "salvage" ферментами тимоцитов, характеристики которой изменяются в зависимости от стадии роста опухоли.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Анализ ПНК в печени и органах эмбриогенеза и кроветворения мышей на фоне развития опухоли методом ВЭЖХ //Тез.докл. II Всесоюз. симп. "Жидкостная хроматография". - Черногоровка. - 1982. - С.63-64 / соавт. Р.Т.Тогузов, И.С.Мейснер, В.М.Резина.
2. Хроматографический анализ пуриновых и пиримидиновых производных органов и тканей человека в диагностике патологических состояний //Тез.докл. I Всесоюз.конф. "Хроматография в биологии и медицине". - М. - 1983. - С.86-87 / соавт. Р.Т.Тогузов, П.А.Кольцов, М.И.Антонов, Б.Б.Глинка.
3. Применение методов жидкостной колоночной хроматографии для анализа компонентов КРФ гепатомы 22, органов и тканей мышеч-опухоленосителей //Там же. - С.142-143. / соавт. Р.Т.Тогузов, И.С.Мейснер, В.М.Резина.
4. Хроматографический анализ нуклеозидов и азотистых оснований эритроцитов крови мышей в процессе развития солидной гепатомы 22 //Тез.докл. III Всесоюз.симп. по коллект. жидкостной хроматографии. - Рига. - 1984. - С.52 / соавт. Р.Т.Тогузов, И.С.Мейснер, А.М.Иванов.
5. Способ дифференциальной диагностики рака и язвенной болезни желудка //Авторское свидетельство № 1125803. - 1984 /соавт. П.А.Кольцов, Р.Т.Тогузов, Н.Селиванов.
6. Способ определения прижизненной травматизации ялец //Авторское свидетельство № 1138130. - 1984 /соавт. П.А.Туманова, Р.Т.Тогузов, В.Н.Кржков.
7. Хроматографический анализ формирования пулов пуриновых и пиримидиновых производных в тканях при организации пролиферативного процесса // Сб. научн. трудов "Хроматография в биологии и медицине". - М. - 1985 - С.115-123 /соавт. Р.Т.Тогузов, А.М.Иванов, И.С.Мейснер, П.А.Кольцов.
8. Способ прогнозирования риска рождения детей с мышечной дистрофией Дюшена //Авторское свидетельство № 1373167. - 1986. - /соавт. Р.Т.Тогузов, В.Ф.Ситников, В.Ю.Прокудин.
9. Регуляция метаболизма пуриновых и пиримидиновых производных - основа диагностики патологических состояний в эксперименте и клинике //Ж. Вестник АМН СССР. - 1986. - №3. - С.40-52 /соавт. Р.Т.Тогузов, В.В.Талицкий, И.С.Мейснер, А.М.Иванов.
10. Определение пуриновых и пиримидиновых производных в составе КРФ органов и тканей методом высокоэффективной жидкостной образцово-базной ион-парной хроматографии //Д. Вопр.мед.химии. - 1987. - №1. - С.133-138 /соавт. Р.Т.Тогузов, А.М.Иванов, И.С.Мейснер, Т.В.Новикова.
11. Стимуляция расщепления пуриновых и пиримидиновых соединений методом ион-парной образцово-базной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) // Укр.биохим.журнал. - №3. - С.35-40 / соавт. Р.Т.Тогузов, А.М.Иванов, И.С.Мейснер.
12. Метаболизм пуриновых соединений в тканях опухолевого организма //Сб. научн. трудов "Компоненты нуклеиновых кислот. - Рига. - 1988. - С.34-35
13. Особенности обмена пуриновых соединений в гепатоме 22, печени и эритроцитах крови мышей в процессе развития опухоли //Д. Вопр. мед.химии. - 1989. - №3. - С.125-129 /соавт. Р.Т.Тогузов, А.М.Иванов, И.С.Мейснер.
14. Трансперт и обмен пуриновых соединений в лейкоцитах тимуса и селезенки мышей линии штам в процессе роста гепатомы 22 //Д. Эксперим.онкология. - 1989. - Т.11. - №1. - С.33-37 /соавт. А.М.Иванов, Р.Т.Тогузов.

15. Применение обращенно-фазной ВЭХХ в изучении метаболизма нуклеотидов в клетках с различной функциональной активностью // Сб. научн. трудов "Хроматография в биологии и медицине". - М. - 1989 - С.26-32 /соавт. Г.Гербер, А.Вернер, В.Зимс.
16. Анализ пула свободных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и оснований в тимоцитах, Т- и В-лимфоцитах селезенки мышей с3ма в процессе роста солидной гепатомы 22 //И. Биохимия. - 1989. - Т.54. - №11. - С.1857-1865 /соавт. С.Н.Храмцова, В.С.Шапот, Г.Гербер, А.Вернер, В.Зимс.
17. Метаболический пул пуриновых соединений в эритроцитах крови мышей в процессе роста первичных опухолей //Бюлл.эксперим.биол. и мед. - 1990. - №7. - С.39-40 /соавт. Р.Т.Тогузов, А.М.Пименов, Г.Гербер, А.Вернер, В.Зимс.
18. ВЭХХ анализ пула пуриновых соединений в регенерирующей печени и эритроцитах крови мышей в опухолевом организме //Тез. докл. V Всесоюзн. симп. по молек. жидкостной хроматографии. - Рига. - 1990. - С.214 /соавт. Р.Т.Тогузов, М.Д.Итаминская, П.А.Карманов, Г.К.Красюк.
19. Application of HPLC in diagnostics of pathologic states in experiments and clinic //5th Danube Symp.on Chromatogr. - Yalta, U.S.S.R. - 1985. - P. /with R.Toguzov, P.Koltsov, Yu.Butov.
20. New aspects of application of HPLC in biology and medicine //5th Danube Symp.on Chromatogr. - Yalta, U.S.S.R. - 1985. - P. /with R.Toguzov.
21. Natural chromatographic systems in biological objects //Chromatography, The State of Art. - Budapest. - 1985. - P.761-807 /with R.Toguzov.
22. Chromatographic analysis of purine and pyrimidine derivatives from the tissues of animals and humans in experimental and clinical pathology //Chromatography, The State of Art. - Budapest. - 1985. - P. 7 /with R.Toguzov, I.G.Meisner, P.Koltsov.
23. The separation of the major ribonucleotides, nucleosides and bases in reverse-phase ion-pair chromatography //J.Liquid Chromatogr. - 1986. - V.9. - №5. - P.1003-1019 /with A.Pimenov, R.T.Toguzov.
24. Simultaneous separation of ribonucleotides, nucleosides and bases by ion-pair reverse-phase HPLC on columns with radial compression //J.Chromatogr.Biomed.Appl. - 1986. - V.365. - P.221-227 /with R.Toguzov, I.Meisner, A.Pimenov.
25. Determination of nucleotides, nucleosides and nucleobases in cells of different complexity by reversed-phase and ion-pair HPLC //J.Chromatogr.Biomed.Appl. - 1987. - V.421. - P.257-265 /with R.Toguzov, A.Pimenov, A.Werner, W.Siems, I.Rapaport, G.Gerber.
26. Separation of nucleotides in cells of different metabolic complexity by use of reversed-phase and ion-pair HPLC //Chromatography '87. - Budapest, Akad.Kiado. - 1988. - P.495-503 /with A.Werner, H.Schmidt, R.Toguzov, A.Pimenov.
27. Determination of purine derivative pools in mouse tissues during hepatoma 22 growth by HPLC //10th Intern.Symp. "Biomed.Appl. Chromatography and Electrophoresis. - Pilsen, CSSR. - 1988. - P.52 /with R.Toguzov, I.Meisner, A.Pimenov.
28. HPLC analysis of purine and pyrimidine compounds of red blood cells, diagnostic significance //10th Intern.Symp. "Biomed.Appl. Chromatography and Electrophoresis. - Pilsen, CSSR. - 1988. - P.53 /with R.Toguzov, V.Prokudin.