



УДК 577.113.3:543.544.6

**РАЗДЕЛЕНИЕ ПРИРОДНЫХ РИБОНУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТОВ  
И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЕ В КИСЛОТОРАСТВОРИМОЙ  
ФРАКЦИИ КЛЕТОК МЕТОДОМ АНИОНООБМЕННОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ***Корбух И. А., Стукалов Ю. В., Зимакова Н. И.,  
Преображенская М. Н.**Всероссийский онкологический научный центр  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Разработана методика определения рибонуклеозидтрифосфатов СТР, УТР, АТР и ГТР в кислоторастворимой фракции клеток с использованием анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии на сорбенте LiChrosorb AN при изократическом элюировании аммоний-фосфатным буфером, содержащим ацетонитрил. Исследована зависимость качества разделения от концентрации соли и ацетонитрила, рН подвижной фазы и выбраны оптимальные условия разделения. Определен диапазон линейности соотношения количества рибонуклеозидтрифосфата и площади его пика, получены уравнения регрессии. Содержание СТР, УТР, АТР и ГТР в клетках культуры рака яичника СаОv составляет соответственно  $418 \pm 32$ ,  $1122 \pm 21$ ,  $9262 \pm 442$ ,  $1036 \pm 49$  пмоль/ $10^6$  клеток. После 2 ч инкубации клеток с 6-меркаптопурином содержание АТР и ГТР снижается на 55%, а через 24 ч — на 73 и 85% соответственно. Одновременно наблюдается снижение содержания УТР и СТР на 12–31%.

Содержание природных рибонуклеозидтрифосфатов НТР в кислоторастворимой фракции клеток (КРФ) дает непосредственную информацию об уровне синтеза РНК в этих клетках. В то же время оно косвенно характеризует и уровень синтеза ДНК, поскольку наблюдается соответствие между параметрами изменения содержания НТР и дезоксирибозидтрифосфатов [1]. Определяя количество НТР в КРФ клеток, подвергающихся воздействию антиметаболитов нуклеинового обмена, можно оценить биологическую активность препаратов этого типа. Анализ уровня НТР в клетках костного мозга онкологических больных позволяет также выделить группу больных, потенциально наиболее чувствительных к химиотерапии определенными антиметаболитами нуклеинового обмена [2]. Специфические изменения соотношения отдельных нуклеозидтрифосфатов могут дать ценную информацию о молекулярных механизмах действия антиметаболитов. Например, цитотоксическое действие 3-дезазауридина сопровождается снижением уровня СТР, которое обуславливается ингибированием СТР-синтазы [3].

Целью настоящей работы являлась разработка методики количественного анализа нуклеозидтрифосфатов в КРФ клеток, в частности клеток карциномы яичника человека СаОv. На культивируемых в монослое клетках СаОv проводится тестирование цитотоксической активности потенциальных противоопухолевых препаратов, в том числе и антиметаболитов [4]. Представляло интерес охарактеризовать количественный состав НТР клеток СаОv без воздействия препаратов и при действии известного противоопухолевого препарата — 6-меркаптопурина.

В последнее время для определения нуклеотидов все чаще применяется метод анионообменной ВЭЖХ [5]. Разделение моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов проводится с использованием градиента концентрации соли и рН подвижной фазы [6] или при изократическом элюировании аммоний-фосфатным буфером, содержащим ацетонитрил [7]. Из-за низ-

Используемые сокращения: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, КРФ — кислоторастворимая фракция, НТР — рибонуклеозидтрифосфаты.

кого уровня НТР в КРФ клеток приходится работать при высокой чувствительности УФ-детектора (0,01 ОЕ<sub>254</sub> на всю шкалу). В этом случае при градиентном элюировании для снижения дрейфа нулевой линии детектора необходима весьма трудоемкая работа по приготовлению оптически чистых компонентов подвижной фазы. Поэтому для анализа НТР нами был выбран изократический режим разделения, не предъявляющий столь высоких требований к чистоте используемых реактивов и в сравнении с градиентным дающий более высокую воспроизводимость результатов анализа. Моно- и дифосфаты нуклеозидов, также присутствующие в КРФ клеток, при таком режиме элюируются ранее НТР, как правило, не разделяясь между собой.

Для разделения НТР мы использовали колонку с анионообменным сорбентом LiChrosorb AN (Merck), характеризующимся высокой ионообменной емкостью. С целью подбора оптимальных условий разделения было изучено влияние на величину коэффициента емкости  $k'$  ( $k' = (V - V_0)/V_0$ , где  $V$  — объем элюирования вещества,  $V_0$  — свободный объем колонки) состава подвижной фазы: концентрации фосфата аммония, величины рН и содержания ацетонитрила.

Полученные данные по влиянию на  $k'$  концентрации солевого буфера в диапазоне 0,25–0,4 М (рН 3,7–4,3, объемная доля ацетонитрила 10%) представлены на рис. 1. Уменьшение концентрации буфера ниже 0,27 М нецелесообразно, так как это увеличивает продолжительность анализа, а увеличение концентрации выше 0,36 М ухудшает разделение СТР, АДР, GDP. Оптимальная концентрация фосфата аммония — 0,290–0,315 М.

Изменение величины  $k'$  в диапазоне рН буфера 3,2–4,4 (0,3 М буфер, содержание ацетонитрила 10%), приведенная на рис. 2, носит сложный характер. При рН > 3,8 не только ухудшается разделение нуклеотидов, но и меняется порядок удерживания СТР и GDP. Наиболее подходящим для разделения НТР является буфер с рН 3,6–3,75. Для получения воспроизводимых результатов необходимо поддерживать величину рН в этих оптимальных пределах.

При увеличении концентрации ацетонитрила до 20% время анализа сокращается, но резко ухудшается разделение НТР. Наилучший состав подвижной фазы — 0,31 М однозамещенный фосфат аммония в 10% ацетонитриле при рН 3,7. Следует отметить, что в процессе работы, а также при переходе на новую колонку возникает необходимость корректировки состава подвижной фазы. Это легко достигается изменением концентрации фосфата аммония. После проведения на одной колонке примерно 150–200 анализов времена удерживания НТР уменьшаются на 15–25%, а эффективность колонки снижается на 30–50%. Такое изменение рабочих параметров колонки происходит вначале постепенно, а в конце периода ее эксплуатации ускоряется. Найденные условия хроматографического разделения искусственной смеси нуклеотидов оказались пригодными и для анализа НТР в КРФ клеток, в частности клеток СаОv. Как видно на хроматограмме, приведенной на рис. 3, наблюдается хорошее разделение УТР, АТР и GТР, пик СТР частично перекрывается с пиком UDP.

Для разработки методики количественного анализа НТР следовало определить диапазон линейной зависимости количества НТР от площади его пика, получить уравнения регрессии и оценить точность измерения параметров этих уравнений. Проведение таких исследований возможно лишь при наличии чистых образцов НТР. Однако во всех исследованных нами коммерческих образцах НТР, в том числе в препаратах фирм Sigma и PL Biochemicals (США), имелись примеси соответствующих моно- и дифосфатов нуклеозидов, содержание которых увеличивалось при хранении. Очистку НТР проводили на колонке с DEAE-целлюлозой в градиенте KCl 0–0,5 М (в стартовый раствор добавляли 1 мМ HCl).

Анализ очищенных фракций НТР, проводившийся с помощью ВЭЖХ по описанной выше методике, показал, что содержание в них соответствующих моно- и дифосфатов нуклеозидов не превышает 0,01%. Содержание НТР в собранных фракциях определяли после их гидролиза кипя-

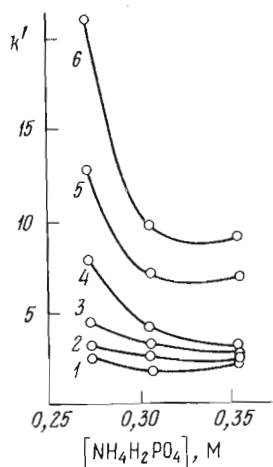


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость коэффициента емкости СТР (1), АДР (2), ГДР (3), УТР (4), АТР (5), ГТР (6) от концентрации  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  в подвижной фазе при ВЭЖХ. Условия см. в «Экспер. части»

Рис. 2. Зависимость коэффициента емкости UDP (1), СТР (2), ГДР (3), АДР (4), УТР (5), АТР (6) и ГТР (7) от pH подвижной фазы. Условия см. в «Экспер. части»

Рис. 3. Хроматограмма КРФ клеток СаОv на колонке с LiChrosorb AN в оптимальных условиях (см. текст и «Экспер. часть»)

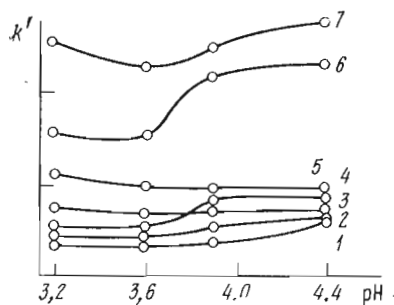


Рис. 2

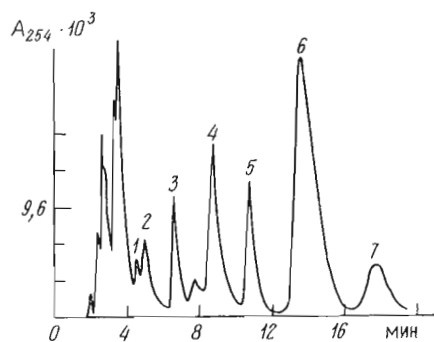


Рис. 3

чением в 2 М  $\text{HNO}_3$  по количеству получающегося фосфат-иона (см. «Экспериментальную часть»). Время гидролиза всех НТР нами было выбрано на основе данных о кинетике гидролиза АТР. Степень превращения (%) АТР в зависимости от времени составила: через 0,5 ч — 83,9, через 1 ч — 96,4, через 2 ч — 99,9, через 3 ч — 100. В последующем при определении концентрации очищенных НТР в собранных фракциях гидролиз вели в течение 2,5 ч.

Очищенные НТР сразу же использовали для определения линейного диапазона концентрационной зависимости. Полученные данные приведены в табл. 1. Для СТР, АТР и УТР изученная зависимость линейна во всем исследованном диапазоне, о чем свидетельствует коэффициент корреляции, равный 0,999. Наименьшее определяемое количество (вычислено в соответствии с [8]) составляет соответственно 52, 21 и 40 пмоль. В случае ГТР имеется начальный нелинейный участок, что не позволяет определять менее 100 пмоль ГТР. При больших количествах ГТР соотношение между количеством и площадью соответствующего пика линейно — коэффициент корреляции 0,997. Во всех уравнениях регрессии точность измерения коэффициента  $a$ , характеризующего чувствительность методики анализа, и коэффициента  $b$  позволяет говорить об удовлетворительной воспроизводимости методики. Следует также отметить меньшую чувствительность при определении СТР — для него значение коэффициента  $a$  примерно в 2 раза меньше, чем для остальных НТР.

Разработанная методика разделения и анализа НТР позволила провести определение содержания НТР в КРФ клеток СаОv. КРФ клеток, обработанных 6-меркаптопурином в концентрации  $10^{-4}$  М, через 2 и 24 ч инкубации сравнивали с КРФ клеток контроля. Результаты представ-

Данные регрессионного анализа зависимости площади пиков от количества NTP

NTP	Исследованный диапазон количества, пмоль	a *	b *	Коэффициенты корреляции
СТР	40-1200	18,88±0,18	507±110	0,999
УТР	40-1200	33,04±0,14	1406±80	0,999
АТР	200-6500	38,78±0,08	12 200±250	0,999
ГТР	20-1200	56,77±1,10	-(3808±500)	0,997

\* a, b — коэффициенты уравнения регрессии  $S=am+b$ , где S — площадь пика, m — количество NTP. Число измерений 14. Доверительный уровень P 0,95.

Таблица 2

Содержание NTP (пмоль/10<sup>6</sup> клеток) в КРФ клеток СаОv без воздействия и при инкубации с 6-меркаптопурином (в концентрации 10<sup>-4</sup> М) \*

Время инкубации с 6-меркаптопурином, ч	СТР	УТР	АТР	ГТР
0 (контроль)	418±32	1122±21	9262±442	1036±49
2	334±20 (20%)	987±19 (12%)	4215±231 (55%)	468±24 (55%)
24	292±18 (31%)	841±17 (25%)	2568±156 (73%)	154±9 (85%)

\* Данные представлены в виде средних значений ± доверительный интервал при P 0,95 (с учетом разброса при подсчете клеток), цифры в скобках — степень ингибирования. Среднее число определений 5-7.

лены в табл. 2. Полученные средние значения содержания NTP в нативных клетках СаОv имеют тот же порядок, что и величины для культивируемых клеток лимфом [7, 9]. Следует отметить хорошую воспроизводимость результатов для всех четырех NTP, что позволяет надежно констатировать изменение содержания СТР, УТР, АТР и ГТР, превышающее 15, 4, 10 и 9% соответственно (эти значения равны проценту удвоенной величины доверительного интервала от среднего значения).

Как видно из табл. 2, через 2 ч инкубации клеток с 6-меркаптопурином содержание АТР и ГТР снижается на 55%, а через 24 ч — на 73 и 85% соответственно. Параллельно наблюдается уменьшение содержания СТР и УТР на 20 и 12% через 2 ч и на 31 и 25% через 24 ч. Известно, что 6-меркаптопурин при участии фермента гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы превращается в 6-тиоинозинмонофосфат (6-ТИМР), который тормозит превращение 5-фосфорибозилпрофосфата в 5-фосфорибозиламин — ключевую реакцию в синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Кроме того, 6-ТИМР является ингибитором сукцинилацилсинтетазы и сукцинилациллизазы, что согласуется с наблюдаемым нами снижением содержания АТР и ГТР.

В настоящее время по разработанной методике проводится изучение влияния других (известных и исследуемых) противоопухолевых препаратов на содержание NTP в клетках СаОv.

### Экспериментальная часть

В работе использовали реактивы квалификации ч. д. а. или х. ч., NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ос.ч. 10-5 (ТУ-6-09-20-3-79), рибонуклеотиды (Reanal). Ацетонитрил, ч. (ТУ-6-09-3534-74), очищали фракционной перегонкой смеси 1,5 л ацетонитрила и 150 мл метанола (х.ч.). Первые 400 мл дистиллята отбрасывали и собирали основную фракцию (около 1 л). Поглощение очищенного ацетонитрила при 254 нм (длина кюветы 1 см; относительно воды) не превышает 0,01 ОЕ. Все растворы и образцы для

хроматографии фильтровали через фильтр GS (Millipore) с диаметром пор 0,45 мкм.

ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе, модель 1084 В (Hewlett-Packard). Использовали колонку размером 25×0,46 см (Brownlee Labs.), упакованную сорбентом LiChrosorb AN (Merck) с размером частиц 10 мкм, и предколонку (5×0,46 см), упакованную сорбентом Perisorb RP-18 (Merck) с размером частиц 30–40 мкм. В качестве подвижной фазы использовали 0,31 М  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  в 10% ацетонитриле при pH 3,7. Пробы объемом 100 мкл элюировали в изократическом режиме при скорости подвижной фазы 2 мл/мин и температуре колонки 30° С.

Очистку индивидуальных НТР проводили на жидкостном хроматографе низкого давления, модель Dialagrad 382 (ISCO), снабженном инжектором, модель 7010 (Reodyne), с объемом петли 1 мл и детектором, модель Uvisord-II (LKB), используя колонку (5×1,5 см) (Whatman), упакованную 2 г DEAE-целлюлозы (Reanal). НТР элюировали со скоростью 2 мл/мин системой буферов А (1 мМ HCl) и В (0,5 М KCl). Колонку предварительно уравнивали буфером А, вводили с помощью инжектора раствор 2–4 мг НТР в воде и элюировали при скорости градиента 1,25% В/мин. После сбора фракции, содержащей НТР, скорость градиента увеличивали до 7,5% В/мин. От 100% буфера В возвращали колонку к начальным условиям за 4 мин.

Гидролизовали АТР (1 мг) кипячением с 3 мл 2 М  $\text{HNO}_3$ , отбирали пробы через 0,5; 1; 2 и 3 ч и определяли содержание фосфат-иона по градуировочному графику. Для построения графика использовали растворы, содержащие 1–15 мкг фосфора. Определение фосфора вели по следующей методике: к образцу, содержащему фосфат-ион, прибавляли 3 мл ацетатного буфера (pH 4), 150 мкл 2%  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , перемешивали, добавляли 0,5 мл 1%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  и разбавляли водой до 5 мл. Поглощение раствора измеряли на спектрофотометре СФ-26 при 865 нм относительно раствора сравнения, содержащего все компоненты, кроме фосфора.

*Приготовление клеточных экстрактов.* Многослойную культуру клеток СаОv выращивали как описано в работе [10].

Однолитровые матрасы засеивали суспензией  $(1,2\text{--}1,3)\cdot 10^7$  клеток. Через 24 ч после посева культуры среду меняли, в отдельных опытах в готовой культуральной среде растворяли 6-меркаптоурин в концентрации  $10^{-4}$  М и клетки с препаратом инкубировали 2 и 24 ч. По окончании инкубации среду сливали, препараты клеток промывали раствором Хенкса и снимали со стекла раствором Версена (использовали растворы Хенкса и Версена производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР). Отслоенные клетки отмывали охлажденным раствором Хенкса и центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин на центрифуге MSF. Экстракцию НТР проводили 0,5 мл 0,5 М  $\text{HClO}_4$  в течение 30 мин при 0° С. Затем КРФ отделяли от клеток центрифугированием в том же режиме, осадок промывали 0,3 мл  $\text{HClO}_4$  и вновь центрифугировали. Полученные экстракты объединяли, нейтрализовали 5 М КОН до pH 7, доводили объем пробы до 1 мл и оставляли на 10 мин при 0° С для полного осаждения  $\text{KClO}_4$ . Осадок отделяли центрифугированием. Полученную КРФ клеток фильтровали и анализировали. При необходимости образцы замораживали в жидком азоте и хранили при  $-25^\circ\text{C}$ . Количество клеток в суспензии культуры подсчитывали в камере Горяева.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Henderson J. F., Hunting D. In: Nucleosides and cancer treatment / Eds Tattersall M. H. N., Fox R. M. Sydney: Acad. Press, 1981, p. 33–45.
2. Pustum Y. M., Preisler H. D. In: Nucleosides and cancer treatment / Eds Tattersall M. H. N., Fox R. N. Sydney: Acad. Press, 1981, p. 46–56.
3. Plunkett W., Benvenuto J. A., Stewart D. J., Loo T. L. Cancer Treatment Reports, 1979, v. 64, № 3, p. 415–420.
4. Добрынин Я. В., Бектемиров Т. А., Иванова Т. П., Чекунова Э. В., Анджапаридзе О. Г., Корбух И. А., Бульчев Ю. Н., Якунина И. Г., Преображенская М. Н. Хим.-фарм. ж., 1980, № 5, с. 10–15.
5. Вульфсон А. Н., Якимов С. А. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 365–390.

6. Poyolotti A. L., Santi D. Anal. Biochem., 1982, v. 126, № 2, p. 333-345.
7. Garret C., Santi D. Anal. Biochem., 1979, v. 99, № 2, p. 268-273.
8. Руководство по аналитической химии. М.: Мир, 1975, с. 27.
9. Zimmerman T. P., Decroose R. D. Biochem. Pharmacol., 1978, v. 27, № 4, p. 709-716.
10. Добрынин Я. В., Балашова А. С., Монахова Т. П. Цитология, 1967, т. 9, № 7, с. 871-876.

Поступила в редакцию  
25.V.1983

SEPARATION OF NATURAL RIBONUCLEOSIDE TRIPHOSPHATES AND THEIR  
DETERMINATION IN THE ACID-SOLUBLE FRACTION OF CELLS BY ANION-  
EXCHANGE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

KORBUKH I. A., STUKALOV Yu. V., ZIMAKOVA N. I.,  
PREOBRAZHENSKAYA M. N.

*All-Union Cancer Research Center, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow.*

An anion-exchange HPLC procedure for CTP, UTP, ATP and GTP determination in the acid-soluble fraction of cells is described. Ribonucleoside triphosphates are separated on LiChrosorb AN isocratically with  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  - acetonitrile. The dependence of the separation efficiency on the salt and acetonitrile concentrations and pH was analyzed and the optimal conditions were chosen. The range, wherein the linearity between the ribonucleoside triphosphate amount and the area of the corresponding peak is observed, was defined and the regression equations were derived. The CTP, UTP, ATP and GTP content in the ovarian cancer cells CaOv in culture was found to be  $418 \pm 32$ ,  $1122 \pm 21$ ,  $9262 \pm 442$  and  $1036 \pm 49$  pmole/ $10^6$  cells, respectively. After 2 hr incubation with 6-mercaptopurine ( $10^{-4}$  M) the level of ATP and GTP is reduced by 55%, and after 24 hr incubation - by 73% for ATP and 85% for GTP. At the same time the UTP and CTP content is decreased by 12-31%.