Próby hamowania wzrostu tumorów *Datura stramonium* antymetabolitami

*Inhibiting action of antimetabolites on Datura stramonium
tumour growth*

HENRYK URBANEK

Antymetabolitami, którym ostatnio przypisuje się duże znaczenie zarówno teoretyczne, jak i praktyczne, są analogi strukturalne zasad azotowych kwasów nukleinowych. Zdolność wpływania tych związków na reprodukcję komórkową może być wykorzystywana przy leczeniu chorób bakteryjnych, wirusowych i nowotworowych.

Badania nad hamowaniem wzrostu antagonistami puryn i pirymidyn są prowadzone od kilkunastu lat. Stwierdzono hamowanie wzrostu różnych szczepów bakterii (Elion i współpr. 1953; Matthews, Smith 1956; Smith, Matthews 1957; Heidelberger i współpr. 1957; Dunn, Smith 1957; Handschumacher, Welch 1956), wirusów (Matthews 1952 i 1954; Smith, Matthews 1957; Commoner, Mercer 1951) i eksperymentalnych nowotworów zwierzęcych (Clarke i współpr. 1953 i 1958; Elion i współpr. 1958; Heidelberger i współpr. 1957; Hertz, Tullner 1949; Kidder i współpr. 1949; Law 1950; Sugiura i współpr. 1950) przez 6-merkaptopurynę, 2-tioguaninę, 8-azaguaninę, 2,6-dwuaminopurynę, 5-fluorouracyl, 2-tiouracyl, 4(6)-azauracyl, 5-bromouracyl, 5-chlorouracyl i inne.

Analogiczne badania dotyczące materiału roślinnego są spotykane rzadziej i prowadzą często do sprzecznych konkluzji. Ber (1950) donosi o hamującym działaniu tiouracylu na wzrost korzeni i łodyg owsa, gorczycy, rzeżuchy i gryki. Rebstock i Ball (1957) stwierdzili hamujące działanie 2-merkaptobenzimidazolu na wzrost fasoli, a Forsyth i Samborski (1960) zaobserwowali hamowanie wzrostu etiolowanych łodyg grochu przez benzimidazol. Moewus (1959) stwierdził hamowanie mitozy u *Polytoma uvella* przez azaguaninę. Ponadto Bopp (1960) donosi o hamowaniu powstawania i wzrostu tumorów wywołanych

przez *A. tumefaciens* u *Kalanchoe daigremontiana* za pomocą tiouracylu i bromouracylu.

Z drugiej strony Sormova i współpr. (1960) zaobserwowali pobudzenie wzrostu wielu roślin przez bromouracyl. Podobnie Skinner i współpr. (1957) stwierdzają pobudzanie kiełkowania nasion sałaty przez 6-tio i 6-aminopuryny. Lipetz (1961) w opublikowanej ostatnio pracy nie potwierdza wyżej cytowanych wyników o hamowaniu wzrostu tumorów przez bromouracyl.

Celem niniejszej pracy było przebadanie działania szeregu analogów strukturalnych pirymidyn i puryn jako antymetabolitów na powstawanie i wzrost tumorów wywołanych przez *A. tumefaciens* u *Datura stramonium*. Jednocześnie wykonano próby hamowania wzrostu *A. tumefaciens* i *Datura stramonium* przez wyżej wymienione analogi.

MATERIAŁ I METODY

Materiał

Materiał badań stanowiły: *A. tumefaciens*, *Datura stramonium* i tumory wywołane u *Datura stramonium* przez *A. tumefaciens*. Jako analogów zasad azotowych użyto: 8-azaguaninę*, 6-merkaptopurynę, benzimidazol, 2-aminobenzimidazol, 5-bromouracyl, 5-chloroacetoamidouracyl, barbituran sodu, 5-dwuazouracyl i 2-tiotyminę.

Działanie analogów na wzrost *A. tumefaciens*

Bakterie hodowano na pożywce agarowo-ziemniaczanej z dodatkiem wyżej wymienionych związków w stężeniach od 10^{-5} M — 10^{-3} M. Po trzech dniach inkubacji w temp. 25°C porównywano wzrost bakterii hodowanych na pożywkach zawierających badane substancje z kontrolą.

Działanie analogów na wzrost *Datura stramonium*

Rośliny doświadczalne hodowane w szklarni spryskiwano kilkakrotnie analogami w stężeniach od 10^{-5} M — 10^{-3} M i obserwowano ich wzrost.

Działanie analogów na powstawanie i wzrost tumorów

Rośliny doświadczalne hodowano w szklarni. Tumory wywoływano zakażeniem łodygi *Datura stramonium* przez *A. tumefaciens*. Zwracano przy tym uwagę, aby rośliny doświadczalne były jednakowej wielkości. Badane tkanki traktowano analogami przez owinięcie miejsca zakażonego drobnoustrojem lub rosnącego już tumoru tamponem waty zwilżonej roztworami antymetabolitów o różnym stężeniu. Przy próbach hamowania powstawania tumorów pierwsze traktowanie analogami następowało zaraz po zakażeniu i powtarzano je po 2 i 5 dniach. Przy

* Analogi stosowane w niniejszej pracy pochodziły z firmy K. and K. Laboratories, INC.

próbach hamowania wzrostu tumorów pierwsze działanie analogami wykonywano po 12 dniach licząc czas od momentu zakażenia i powtarzano je co trzy dni w ciągu miesiąca.

Po 8 tygodniach wzrostu tumorów porównywano ich świeżą masę.

Doświadczenia wykonano w 2 seriach: I seria została wykonana w miesiącach luty — marzec 1961 r., a II seria w miesiącach kwiecień — maj 1961 r.

WYNIKI

Z przebadanych substancji jedynie dwuazouracyl w stęż. wyższych od 2×10^{-4} M hamował wzrost *A. tumefaciens*.

Nie stwierdzono hamującego wpływu żadnego z analogów w stęż. od 10^{-5} M — 10^{-3} M na wzrost *Datura stramonium*.

Przy badaniach hamowania powstawania i wzrostu tumorów aktywne okazały się azaguanina i dwuazouracyl. Azaguanina hamowała powstawanie tumorów począwszy od stężenia 2×10^{-5} M, a dwuazouracyl w stężeniach większych od 2×10^{-4} M. Podobnie azaguanina i dwuazouracyl hamowały wzrost tumorów. Zdjęcie (fot. 1) przedstawia tumor

Fig. 1. Tumory zahamowane przez azaguaninę i dwuazouracyl.

Tumours inhibited by azaguanine and diazouracil

a — tumor kontrolny (control); b — tumor traktowany azaguaniną (tumour treated by azaguanine); c — tumor traktowany dwuazouracylem (tumour treated by diazouracil)

kontrolny oraz zahamowany azaguaniną w stężeniu 2×10^{-4} M i dwuazouracylem w stężeniu 5×10^{-4} M po 8 tygodniach wzrostu. Już w ciągu 3—5 dni po potraktowaniu wyżej wymienionymi analogami następowało prawie całkowite zahamowanie wzrostu tumorów. W prze-

Tabela 1 — Table 1

Hamowanie wzrostu tumorów przez 8-azaguaninę
Inhibition of tumour growth by 8-azaguanine

Stężenie azaguaniny azaguanine concentration	seria I series I	seria II series II
	świeża masa w g* fresh matter in g	świeża masa w g* fresh matter in g
0 kontrola 1)**	$0,95 \pm 0,10$	$1,02 \pm 0,09$
0 kontrola 2)***	$30,24 \pm 1,81$	$32,40 \pm 1,76$
5×10^{-5} M	$27,85 \pm 2,14$	$32,83 \pm 2,00$
10^{-4} M	$14,00 \pm 1,38$	$21,25 \pm 1,99$
2×10^{-4} M	$2,77 \pm 0,20$	$7,35 \pm 0,48$
5×10^{-4} M	$2,28 \pm 0,14$	$4,76 \pm 0,35$
10^{-3} M	$2,09 \pm 0,14$	$3,07 \pm 0,31$

* Dane liczbowe stanowią średnią arytmetyczną 10 pomiarów $\pm$ odchylenie standartowe
The numbers present an average of 10 determinations $\pm$ standard deviations

** Tumory po 12 dniach wzrostu (w chwili pierwszego traktowania antymetabolitami)
12 days old tumours (the moment of the first treatment by antimetabolites)

*** Tumory po 8 tygodniach wzrostu
8 weeks old tumours

Tabela 2 — Table 2

Hamowanie wzrostu tumorów przez 5-dwuazouracyl
Inhibition of tumour growth by 5-diazouracil

Stężenie dwuazouracylu diazouracil concentration	Series I series I	seria II seires II
	świeża masa w g* fresh matter in g	świeża masa w g* fresh matter in g
0 (kontrola 1)**	$0,95 \pm 0,10$	$1,02 \pm 0,09$
0 (kontrola 2)***	$30,24 \pm 1,81$	$32,40 \pm 1,76$
10^{-4} M	$29,06 \pm 2,14$	$33,12 \pm 1,80$
2×10^{-4} M	$20,38 \pm 1,62$	$27,45 \pm 2,46$
5×10^{-4} M	$2,87 \pm 0,28$	$8,10 \pm 0,85$
10^{-3} M	$2,42 \pm 0,27$	$5,85 \pm 0,46$

* Dane liczbowe stanowią średnią arytmetyczną 10 pomiarów $\pm$ odchylenie standartowe
The numbers present an average of 10 determinations $\pm$ standard deviations

** tumory po 12 dniach wzrostu (w chwili pierwszego traktowania antymetabolitami)
12 days old tumours (the moment of the first treatment by antimetabolites)

*** Tumory po 8 tygodniach wzrostu
8 weeks old tumours

przewodzonych doświadczeniach okazało się konieczne wielokrotne traktowanie tumorów analogami, gdyż w przeciwnym razie wzrost tumorów ulegał wznowieniu. Po dziesięciokrotnym zadziałaniu azaguaniną i dwuazouracylem tumory nie wykazywały już zdolności odnawiania się do końca wegetacji rośliny.

Wyniki przedstawiające świeżą masę tumorów traktowanych azaguaniną, dwuazouracylem i kontrolnych po 8 tygodniach wzrostu są przedstawione w tabelach 1 i 2. Jak wynika z tego zestawienia azaguanina w stężeniach od 10^{-4} M — 10^{-3} M, a dwuazouracyl w stężeniach 2×10^{-4} M — 10^{-3} M hamowały zdecydowanie wzrost tumorów. Zahamowanie w serii I jest nieco silniejsze niż w serii II.

DYSKUSJA

Fakt, że spośród 9 przebadanych związków tylko dwa okazały się aktywne w hamowaniu powstawania i wzrostu tumorów można tłumaczyć zarówno niezdolnością tkanki tumorowej do wcielania w nukleotydy i w kwasy nukleinowe większości analogów puryn i pirymidyn, jak też szybkim rozkładem tych substancji w badanej tkance. Sor m o v a i współpr. (1960) donoszą, że 5-bromouracyl w tkankach roślinnych jest bardzo szybko rozkładany.

Zdolność hamowania wzrostu tumorów przez azaguaninę i dwuazouracyl stwierdzono dopiero przy stosunkowo wysokich stężeniach tych związków. Wytlumaczenia tego zjawiska można by szukać w mechanizmie biosyntezy normalnych nukleotydów purynowych i pirymidynowych. W organizmach żywych dominuje, według wielu autorów, przyłączanie się reszty cukrowej i fosforanowej do związków przejściowych, stanowiących ogniwa pośrednie w biosyntezie puryn i pirymidyn (Buchanan, Hartman 1959; Reichard 1959). Tworzenie nukleotydów z syntetyzowanych już puryn i pirymidyn jest procesem rzadziej spotykanym.

Dwuazouracyl hamował nie tylko wzrost tkanki tumorowej, ale i wzrost *A. tumefaciens*. Stąd można by wnioskować, że hamujący wpływ tego związku na tumory może wynikać z zahamowania rozmnażania się bakterii. Zostało jednak stwierdzone przez badaczy, że drobno-ustroje wywołują jedynie powstawanie tkanki tumorowej (tumor pojawia się po około 5—7 dniach po zakażeniu), natomiast do jej wzrostu nie są już potrzebne (Braun 1943). W pracy niniejszej pierwsze traktowanie dwuazouracylem stosowano już podczas wzrostu tumora (12 dnia po zakażeniu). Możemy stąd wnioskować, że dwuazouracyl hamuje także wzrost tkanki tumorowej.

Hamowanie wzrostu tumorów przez azaguaninę i dwuazouracyl silniejsze w serii zimowej niż w serii wiosennej można by chyba wytłuma-

czyć większą wrażliwością roślin na działanie stymulatorów czy inhibitorów wzrostu w okresie zimowym.

W Zakładzie naszym prowadzone są obecnie badania nad wyjaśnieniem mechanizmu hamującego działania azaguaniny i dwuazouracylu na wzrost tumorów u *Datura stramonium*.

Pani doc. W. Potapczykowej składam serdeczne podziękowanie za merytoryczne przedyskutowanie pracy oraz za szereg cennych rad i wskazówek.

STRESZCZENIE

Przebadano wpływ 8-azaguaniny, 6-merkaptopuryny, benzimidazolu, 2-amino-benzimidazolu, 5-bromouracylu, 5-chloroacetoamidouracylu, barbituranu sodu, 5-dwuazouracylu i 2-tiotyminy na powstawanie i wzrost tumorów u *Datura stramonium* wywołanych przez *A. tumefaciens*.

Żaden z badanych związków w stężeniach 10^{-5} M — 10^{-3} M nie hamował wzrostu *Datura stramonium*.

Jedynie 5-dwuazouracyl w stężeniach większych od 2×10^{-4} M hamował wzrost *A. tumefaciens*.

Powstawanie tumorów hamowały: dwuazouracyl w stężeniach 2×10^{-4} — 10^{-3} M i azaguanina w stężeniach 2×10^{-5} M — 10^{-3} M.

Wzrost tumorów hamowały: dwuazouracyl w stężeniach 5×10^{-4} M — 10^{-3} M i azaguanina w stężeniach 2×10^{-4} M — 10^{-3} M.

Pozostałe z wyżej wymienionych związków nie wykazywały żadnego wpływu ani na powstawanie tumorów, ani na ich wzrost.

Katedra Biochemii
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło, dn. 22.I.1962 r.)

SUMMARY

Attempts have been made to prevent tumour formation induced by *A. tumefaciens* in *Datura stramonium* plants and to inhibit tumour growth by the use of certain homologues of the nucleic acid bases e.g. 8-azaguanine, 6-mercaptapurine, benzimidazole, 2-amino-benzimidazole, 5-bromouracil, 5-chloroacetamidouracil, barbitone sodium, 5-diazouracil and 2-thiothymine.

Not one of the above mentioned compounds in concentrations of 10^{-5} M to 10^{-3} M has been shown to possess any appreciable inhibiting activity on *Datura stramonium* growth.

Only 5-diazouracil in higher concentrations above 2×10^{-4} M has shown an inhibiting action on *A. tumefaciens* growth.

Diazouracil in concentrations of 2×10^{-4} M to 10^{-3} M and azaguanine in concentrations of 2×10^{-5} M to 10^{-3} M were effective on preventing tumour formation.

Diazouracil in concentrations of 5×10^{-4} M to 10^{-3} M and azaguanine in concentrations of 2×10^{-4} M to 10^{-3} M have shown an inhibiting effect on tumour growth.

The remaining compounds which have been tested have shown any influence neither on tumour formation nor on tumour growth.

LITERATURA

- Ber A., 1949/1950, *Acta Soc. Bot. Poloniae* 20: 131.
- Bopp M., 1960, *Planta* 54: 221.
- Braun A. C., 1943, *Amer. J. Bot.* 30: 674.
- Buchanan J. M., Hartman S. C., 1959, *Adv. in Enzymol.* 21: 199.
- Clarke D. A., Philips F. S., Sternberg S. S., Stock C. C., Elion G. B. and Hitchings G. H., 1953, *Cancer Research* 13: 593.
- Clarke D. A., Elion G. B., Hitchings G. H., Stock C. C., 1958, *Cancer Research* 18: 445.
- Commoner B. and Mercer F., 1951, *Nature* 168: 113.
- Dunn D. B. and Smith J. D., 1957, *Biochem. J.* 67: 494.
- Elion G. B., Bieber S., Nathan H. C., Hitchings G. H., 1958, *Cancer Research* 18: 802.
- Elion G. B., Singer S., Hitchings G. H., Balis M. E., Brown G. B., 1953, *J. Biol. Chem.* 202: 647.
- Forsyth F. R., Samborski D. J., 1960, *Canad. J. Botany* 38: 875.
- Handschumacher R. E., Welch A. D., 1956, *Cancer Research* 16: 965.
- Heidelberger C., Chaudhuri N. K., Danneberg P., Mooren D., Griesbach L., Duschinsky R., Schnitzer R. J., Plevan E., Scheiner J., 1957, *Nature* 179: 663.
- Hertz R., Tullner W. W., 1949, *Science* 109: 539.
- Kidder G. W., Dewey V. C., Parks R. E., Jr., Woodside G. L., 1949, *Science*, 109: 511.
- Law L. W., 1950, *Cancer Research* 10: 186.
- Lipetz J., Stonier T., 1961, *Nature* 190: 929.
- Matthews R. E. F., 1952, *Nature* 169: 500.
- Matthews R. E. F., 1954, *J. Gen. Microbiol.* 10: 521.
- Matthews R. E. F., Smith J. D., 1956, *Nature* 177: 271.
- Moewus F., 1959, *Science* 130: 920.
- Rebstock T. L., Ball D., 1957, *Plant Physiol.* 32: 19.
- Reichard P., 1959, *Adv. in Enzymol.* 21: 263.
- Skinner CH. S., Russel Claybrook J., Talbert F., Shive W., 1957, *Plant Physiol.* 32: 117.
- Smith J. D., Matthews R. E. F., 1957, *Biochem. J.* 66: 323.
- Sormova Z., Sebesta K., Bauerova J., Melichow O., Sorm F., 1960, *Experientia XVI*, 5: 189.
- Sugiura K., Hitchings G. H., Cavalieri L. F., Stock C. C., 1950, *Cancer Research* 10: 178.