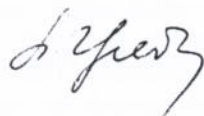


На правах рукопису

ГРЕБЕНИК ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА



ВИВЧЕННЯ МІЖМОЛЕКУЛЯРНИХ ВЗАЄМОДІЙ  
ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ (ТІОТЕФА, ПРОСПІДІНА, ДОКСОРУБІЦИНА,  
ФАРМОРУБІЦИНА) З ДЕЯКИМИ СТРУКТУРНИМИ КОМПОНЕНТАМИ  
НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ ТА ВІЛКІВ МЕТОДОМ МАС-СПЕКТРОМЕТРІЇ

03.00.05 - Біофізика

А в т о р е ф е р а т  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Харків - 1996



00755633 (Т)

дисертація є рукопис

АВ 33.842

Робота виконана в Інституті прикладної фізики НАН України

Науковий керівник - доктор фізико-математичних наук, професор,  
Суходуб Леонід Федорович

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук, професор,  
Радавський Юрій Леонідович

доктор фізико-математичних наук,  
старший науковий співробітник,  
Сорокін Віктор Олександрович

Провідна організація - Інститут проблем кріобіології та  
кріомедицини НАН України, м. Харків

Захист відбудеться "1" 03 1996 р. на засіданні  
спеціалізованої вченої ради К 02.02.16 Харківського державного  
університету за адресою: 310077, м.Харків, пл. Свободи, 4,  
аудиторія 3-15, о 17<sup>00</sup> годині 15 хв.

З дисертацією можна ознайомитися в Центральній науковій  
бібліотеці Харківського державного університету, м.Харків,  
пл. Свободи, 4.

Автореферат розісланий 1. 02. 1996 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

О.В.Наглов

ЛННБ ім. В. Стефаніка  
АН України

Актуальність теми: Успіхи в пізнанні молекулярних механізмів дії протипухлинних фармакологічних препаратів на біомолекули малігнізованих клітин багато в чому обумовлені вираженою тенденцією сучасної фізико-хімічної біології до стрімкого розширення кола фізичних методів досліджень, що використовуються для отримання інформації, яка характеризує якісні і кількісні параметри міжмолекулярних взаємодій лікарських речовин і компонентів біомолекул-"мішеней" як в модельних умовах, так і *in vivo* (Ross, 1964; Lawley, 1975; Singer, 1975; Веркін и др. 1985; Пацковский и др., 1989; Шейнкер и др. 1989; Husain et al., 1992; Zimmerman, 1993). Одним із найбільш перспективних фізичних методів досліджень, що успішно використовуються в біохімічних і молекулярно-біологічних додатках фармакології протипухлинних препаратів, є мас-спектрометрія (МС) (Matsui et al., 1994), зокрема, часопролітна МС з іонізацією уламками поділу 252-Cf (time-of-flight plasma desorption mass spectrometry /TOF-PDMS/) (Macfarlane, 1974; Jungclas et al., 1983; Cooks, 1983; Sundqvist, 1985; Roepstorff, 1987). Особливості механізмів десорбції/іонізації органічних речовин в PDMS дозволяють:

1) вибірково детектувати в модельних сумішах і *in vivo* присутні в слідових кількостях (< 1 pmol) ковалентно зв'язані аддукти лікарських речовин з біомолекулами;

2) вивчати нековалентно зв'язані мультимолекулярні структуровані асоціати фармакологічних препаратів з біомолекулами-"мішенями" у вигляді так званих гетерокластерних квазімолекулярних іонів  $[(\text{фармакологічний препарат})_n + (\text{біомолекула-"мішень"})_m + \text{H}]^+$ ,  $n > 1, m > 1$ . Останній напрямок цікавий в суто прикладному аспекті - як основа для вивчення деталей механізмів взаємодії нових протипухлинних фармакологічних препаратів (похідні антрациклінових антибіотиків, лекситропсини) з біомолекулами-"мішенями" за допомогою нековалентного зв'язування і стеричної відповідності компонентів (Lown, 1988), з метою розробки нових, більш ефективних препаратів. Крім того, дослідження нековалентно зв'язаних комплексів біомолекул з низькомолекулярними лігандами є суттєвою частиною нового фундаментального напрямку молекулярної біохімії і фармакології - супрамолекулярної хімії (Lehn, 1987; Rebek, 1990), предмет якої - моделювання селективних взаємодій органічних сполук в мультимолекулярних структурованих нековалентно зв'язаних комплексах, наближених до біологічних структур. Розвиток уявлень супрамолекулярної хімії дозволить проводити направлений синтез високоефективних протипухлинних препаратів нових поколінь, хіміотерапевтичний ефект яких обумовлений оборотним високоспецифічним зв'язуванням з біомолекулами-"мішенями", зокрема, ділянками геному малігнізованої клітини, що відповідають за процеси росту і регуляції останньої (Hurley et al., 1988). В світлі приведенних тенденцій уявляється достатньо перспективним застосування

TOF-PDMS до модельних систем, що включають протипухлинні речовини алкілюючого типу або похідні антрациклінових антибіотиків-інтеркаляторів і компоненти нуклеїнових кислот як основних клітинних біомолекул-"мішеней" зазначених препаратів.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи є вивчення на молекулярному рівні процесів взаємодії як класичних протипухлинних препаратів алкілюючого типу (тіоТЕФ, проспідін), необоротно модифікуючих компоненти нуклеїнових кислот (НК), так і нових протипухлинних препаратів направленої дії (доксорубіцин, фарморубіцин), що утворюють на основі стеричної відповідності специфічні нековалентно зв'язані супрамолекулярні комплекси - асоціати з ділянками геному малігнізованої клітини, методом часопротитної мас-спектрометрії з іонізацією уламками поділу  $^{252}\text{Cf}$  (TOF-PDMS).

Основні задачі досліджень. Виходячи з мети були визначені такі основні задачі:

- 1) Вивчити методом часопротитної плазменно-десорбційної мас-спектрометрії (TOF-PDMS) шляхи ковалентної модифікації компонентів нуклеїнових кислот протипухлинними препаратами тіоТЕФом і проспідіном.
- 2) Провести експерименти по виявленню та детальному вивченню нековалентно зв'язаних комплексів біомолекул (гетерокластерів) в TOF-PDMS.
- 3) Вивчити процеси взаємодії протипухлинних антрациклінових антибіотиків - АА (доксорубіцина і фарморубіцина) з деякими мономерами нуклеїнових кислот та білків методом TOF-PDMS.
- 4) Встановити кореляційні зв'язки між фізико-хімічними параметрами гетерокластерних іонів АА з біомолекулами різної хімічної природи та ступенем протипухлинної активності вказаних АА.
- 5) Виявити основні принципи мас-спектрометричної ідентифікації стереоізомерних молекул лікарських речовин стосовно до методу TOF-PDMS.

Наукова новизна роботи:

- 1) методом TOF-PDMS виявлені нові, раніше не виявлені іншими фізико-хімічними методами, аддукти протипухлинних речовин алкілюючого типу (тіоТЕФ, проспідін) з компонентами нуклеїнових кислот;
- 2) вперше показаний феномен утворення в TOF-PDMS гетерокластерних іонів біомолекул і розроблені теоретико-методологічні основи використання останніх при моделюванні процесів нековалентного зв'язування протипухлинних препаратів з біомолекулами-"мішенями";
- 3) вперше в рамках методу TOF-PDMS встановлено безпосередній вплив на процес утворення гетерокластерних іонів типу [фармакологічний препарат + біомолекула-"мішень"] здібності зазначених ком-

понентів формувати в ході спікрystalізації із рідкої фази квазікрystalічні структури, стабілізовані на основі стеричної відповідності нековалентними (ван-дер-ваальсовими, водневими) зв'язками (Китайгородський, 1985);

4) встановлена корелятивна залежність між структурно-термодинамічними параметрами гетерокластерних іонів типу [антрацикліновий антибіотик (AA) + біомолекула-"мішень"] і ступенем хіміотерапевтичної протипухлинної активності стереоізомерних AA - фарморубіцина і доксорубіцина;

5) наведені експериментальні результати, які свідчать про те, що гетерокластерні іони біомолекул і протипухлинних препаратів виникають як внаслідок десорбції/іонізації квазікрystalічних макрокластерів, які десорбуються цілком із твердофазного зразка (Jungclas, 1987; Macfarlane, 1987), так і газофазних реакцій (Cooks, 1983).

#### Основні положення, що виносяться на захист.

1) TOF-PDMS як високочутливий метод фізико-хімічного аналізу біомолекул надає можливість одночасного спостереження як мінорних ковалентно зв'язаних аддуктів останніх з протипухлинними препаратами, так і нековалентно зв'язаних супрамолекулярних комплексів біомолекул з вказаними препаратами.

2) При взаємодії високоенергетичних уламків поділу  $^{252}\text{Cf}$  з твердофазними мультикомпонентними зразками біомолекул (A, B, C, D) утворюються гетерокластерні, стабілізовані нековалентними зв'язками іони  $[\text{Am} \cdot \text{Bk} \cdot \text{Cl} \cdot \text{Dg}]$ , де m, k, l, g - 0, 1, 2 ... n.

3) Якісний та кількісний склад гетерокластерів біомолекул визначається наявністю специфічних міжмолекулярних зв'язків та їх термодинамічними характеристиками між вказаними біомолекулами в твердофазних зразках.

4) Спостереження в мас-спектрі мультикомпонентних зразків біомолекул різної хімічної природи A, B, C, D гетерокластерних іонів  $[\text{A} \cdot \text{B}]$ ,  $[\text{A} \cdot \text{C}]$  з інтенсивністю піків відповідно I та I' ( $I \gg I'$ ) свідчить про те, що, по-перше, біомолекула A здатна зв'язуватись нековалентними зв'язками з B та C, але не з D; і, по-друге, стійкість комплексу AB вища за AC.

5) На основі TOF-PDMS аналізу розроблений метод проведення експрес-скринінгу біомолекул - потенційних "мішеней" протипухлинних препаратів в галузі прикладної онкофармакології.

Теоретичне та практичне значення роботи. Результати проведених досліджень мають суттєве значення в фундаментальній галузі біофізики - взаємодії високоенергетичних часток з біомолекулами клітини. Щодо практичного значення роботи, встановлено, що: TOF-PDMS може бути з успіхом використана в фармакологічній хімії для проведення експрес-скринінга на предмет виявлення здібності заново синтезованих

протиухлинних фармакологічних препаратів останніх поколінь утворювати обумовлюючи хіміотерапевтичний ефект високоспецифічні, нековалентно зв'язані комплекси з біомолекулами-"мішенями" (компонентами нуклеїнових кислот, білками, вуглеводами) (Rebek, 1990), а також для реєстрації ковалентно зв'язаних аддуктів біомолекул з ксенобіотиками, присутніми в модельних сумішах і in vivo в слідових кількостях (Gaudiano et al., 1990).

Апробація роботи: Основні результати досліджень були представлені на IX Всесоюзному симпозиумі по ціленаправленому пошуку лікарських речовин (Рига, 1991), науково-практичній конференції молодих дослідників ФТІНТ АН УССР (Харків, 1991), XII Міжнародній конференції з мас-спектрометрії (Амстердам, 1991), школі-семінарі ФТІНТ АНУ "Використання мас-спектрометрії в біології і медицині" (Харків, 1992), V Міжнародній Пекінській конференції з проблем інструментального аналізу (Пекін, 1993), науковій конференції "Шляхи підвищення продуктивності і якості сільськогосподарської продукції" Сумський с/г інститут (Суми, 1993), 4-му Міжнародному симпозиумі по молекулярних аспектах хіміотерапії пухлинних захворювань (Гданьськ, 1993), 3-му Міжнародному симпозиумі "Мас-спектрометрія в медицині і біології" (Сан-Франциско, 1994), XIII-ій Міжнародній конференції з мас-спектрометрії (Будапешт, 1994), симпозиумі "Синтез, експериментальне вивчення та клінічне застосування четвертичних амонієвих сполук" (Чернівці, 1995), науковому семінарі відділу іонної фізики інституту ядерних досліджень Університету м. Уппсала (Швеція), а також на засіданні наукової Ради ІФФ НАНУ і міжкафедральному засіданні медичного факультету СумДУ.

Публікації. Результати досліджень викладенні в 5 статтях та 14 тезах.

Структура і обсяг дисертації: Дисертація складається із вступу, шести глав, заключної частини, загальних висновків та списку цитованої літератури. Робота викладена на 190 сторінках і вміщує: 144 сторінок машинописного тексту, 45 рисунка, 1 таблицю. Список цитованої літератури включає 212 назв.

#### Об'єкт та методи досліджень.

Дослідження особливостей формування міжмолекулярних комплексів протиухлинних препаратів зі структурними компонентами макромолекул клітини - біомолекулами-"мішенями", проводили у модельних системах. Протиухлинними препаратами, які входили до складу цих систем, були алкілюючі агенти (тіоТЕФ, проспідів) і інтеркалюючі речовини (доксорубіцин, фарморубіцин). Азотисті основи, нуклеозиди, нуклеотиди і амінокислоти використовували як біомолекули-"мішені".

В експериментах був використаний тіоТЕФ, попередньо очищений подвійною перекристалізацією (Косевич и др., 1987). Використовували фарморубіцин (епірубіцин гідрохлорид) і адіаміцин (докоорубіцин гідрохлорид) "Farmitalia Carlo Erba" (Італія); дезоксірибонуклеозиди dAdo, dThd, dGuo, dCyd; рибонуклеозиди Guo, Cyd (НДКІ ВАР, Росія); азотисті основи Cyt "Chemapol" (Чехія), 1-MeCyt, 5-MeCyt, iso-Cyt "Serva" (Німеччина), амінокислоти Phe, iso-Phe, Leu, Val, Ile, Cys, Gly, His, Lys, Arg "Sigma" (США); лактоза "Merck", нітроцелюлоза "Schleicher & Schuell" (Німеччина).

Модифікацію дезоксирибонуклеозид-5'-фосфата (pdGuo) і дезоксицитидин-5'-фосфата (pdCyd) проводили, розчиняючи реагенти в бідистильованій воді, змішуючи і інкубуючи отриману суміш (37°C, pH 6,5-7,0) на водяній бані (Серебряний и др., 1986). При вивченні стійкості комплексів тіоТЕФа з нуклеотидами в кислотному і лужному середовищі у систему додавали 0,1 н NaOH або 0,1 н HCl і витримували при тій же температурі 15 хвилин.

Реакцію проспідина з pdGuo проводили при 37°C 2,5 години з попередньою температурною активацією розчину препарату (інкубація 2 години при 37°C).

Дослідження формування нековалентно зв'язаних комплексів антрациклінових антибіотиків з азотистими основами, нуклеозидами, нуклеотидами і амінокислотами проводили у еквімолярних сумішах докоорубіцина або фарморубіцина з вказаними структурними компонентами полімерів.

Поставлені експериментальні задачі розв'язували із застосуванням як основного методу дослідження часопротитної мас-спектрометрії з іонізацією уламками поділу 252-Cf (TOF-PDMS) на приладі мас-спектрометрі біохімічному - МСЕХ (АО "Selmi", Суми, Україна).

Проби готували на основі нітроцелюлозної і лактозної матриць, або взагалі без матриці (металевої підкладинці) - в залежності від мети експерименту (Roepstorff et al., 1987). Аліквоту аналізованої проби (10 - 50 мкл) наносили на пробонесучий диск і підсушували у струмені теплого повітря або аргона. Мас-спектри отримували при прискорюючому напруженні Uпр - ± 20 kV. Для кожної серії експериментів проводили попереднє мас-спектрометричне дослідження контрольних проб речовин, які використовувались при створенні модельних систем.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ІХ ОБГОВОРЕННЯ

### Модельна система "тіоТЕФ - дезоксірибонуклеотид"

При мас-спектрометричному дослідженні взаємодії тіоТЕФа з дезоксирибонуклеотидами були отримані наступні результати. Виявлено, що протипухлинний препарат тіоТЕФ утворює гетерокластерні іони з дезоксирибонуклеотидом типу  $[(\text{дезоксирибонуклеотид}) \cdot (\text{тіоТЕФ})_n]^+$ , причому

стехіометричний параметр  $n$  залежить від хімічної природи нуклеотиду: якщо в склад комплексу "тіоТЕФ + рdGuo" входить до 9 молекул проти-пуклинного препарату ( $n = 1-9$ ), то в аналогічну структуру, характер-ну для тіоТЕФ і рdCyd - тільки дві молекули нуклеотиду ( $n = 1-2$ ).

На рис. 1 представлений мас-спектр інкубаційної суміші рdGuo (M) і тіоТЕФ, де чітко видно піки іонів з  $m/z - 346,1 - [M - H]^-$ ,  $m/z - 536,2 - [M + (тіоТЕФ)_1 - H]^-$ ,  $m/z - 725,0 - [M + (тіоТЕФ)_2 - H]^-$ ,  $m/z - 914,1 - [M + (тіоТЕФ)_3 - H]^-$ ,  $m/z - 1103,1 - [M + (тіоТЕФ)_4 - H]^-$ ,  $m/z - 1292,0 - [M + (тіоТЕФ)_5 - H]^-$ ,  $m/z - 1481,3 - [M + (тіоТЕФ)_6 - H]^-$ ,  $m/z - 1670,1 - [M + (тіоТЕФ)_7 - H]^-$ ,  $m/z - 1859,0 - [M + (тіоТЕФ)_8 - H]^-$ ,  $m/z - 2048,2 - [M + (тіоТЕФ)_9 - H]^-$  ( $T_n = 2 \cdot 10^6$ ). Для інших нуклеоти-дів - рdAdo і рdThd, аналогічні комплекси з тіоТЕФ не виявлені. Ці ре-зультати знаходяться в повній відповідності з експериментальними ро-ботами, що показали підвищену афінність тіоТЕФ до GC-збагачених ділянок ДНК, і, особливо, похідних гуаніну (Gua).

Більш того, в експериментах, в яких проводили порівняння зв'язування тіоТЕФ з різними нуклеотидами, показано, що в трьохком-понентному середовищі інкубації (тіоТЕФ + рdGuo + рdCyd) переважно виникали комплекси з рdGuo (рdGuo · (тіоТЕФ) $_n$ ), де  $n = 1-3$ .

Відліки

M 1:32

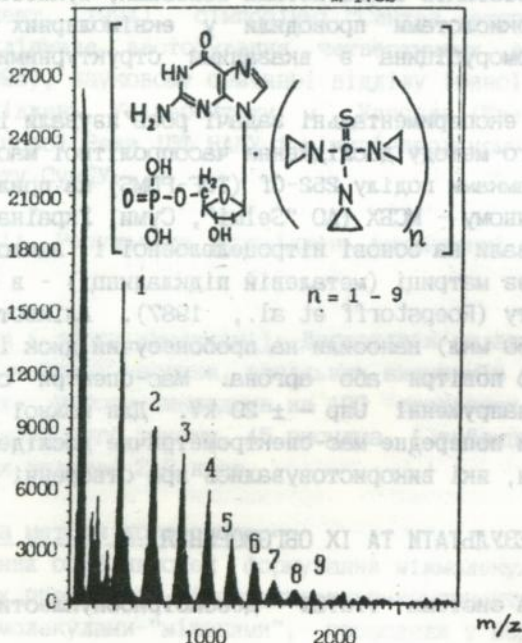


Рис.1. TOF-PMDS спектр суміші тіоТЕФ і рdGuo, інкубований 1 годину при 37°C. Уприс.- - 20 kV, кількість стартів - 2 000 000, матриця - нітроцелюльова.

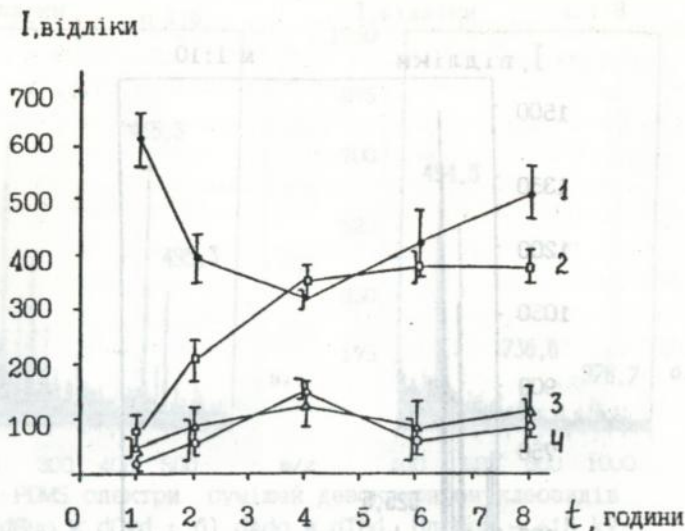
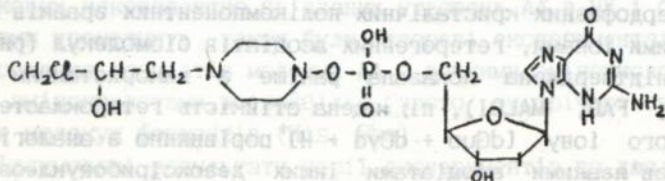


Рис. 2 Крива накопичення у середовищі інкубації комплексу  $\text{tiOTe}\Phi$  з  $\text{pdGuo}$ : 1 -  $\text{pdGuo}$ ; 2 -  $[\text{pdGuo} (\text{tiOTe}\Phi)_4]$ ; 3 -  $[\text{pdGuo} (\text{tiOTe}\Phi)_2]$ ; 4 -  $[\text{pdGuo} (\text{tiOTe}\Phi)_3]$ .

Нарешті, TOF-PDMS використовували з метою вивчення динаміки накопичення комплексів  $\text{tiOTe}\Phi$  з  $\text{pdGuo}$  в процесі інкубації. Оптимальний час інкубації  $\text{tiOTe}\Phi$  з  $\text{pdGuo}$ , необхідний для отримання інтенсивних піків іонів  $[\text{tiOTe}\Phi + \text{pdGuo} - \text{H}]^+$  (рис.2) складає 2 - 4 години і практично співпадає з результатами, отриманими іншими дослідниками з використанням інших методів (Серебряний, 1987).

#### Модельна система "проспідін - дезокотигуанозин-5'-фосфат".

Застосування методу TOF-PDMS до даної модельної системи дозволило виявити новий, раніше не ідентифікований аддукт, який в мас-спектрі представлений піком з  $m/z = 525,5$  (рис. 3). Експериментальні умови отримання аддукта свідчать на користь того, що в реакцію з нуклеотидом вступає високореакційноздатний фрагмент проспідіна, що утворюється під час температурної активації препарату (2 години при  $70^\circ\text{C}$ ). Виявлений в реакційній системі мінорний аддукт має наведену нижче структуру:



I, відліки м 1:10

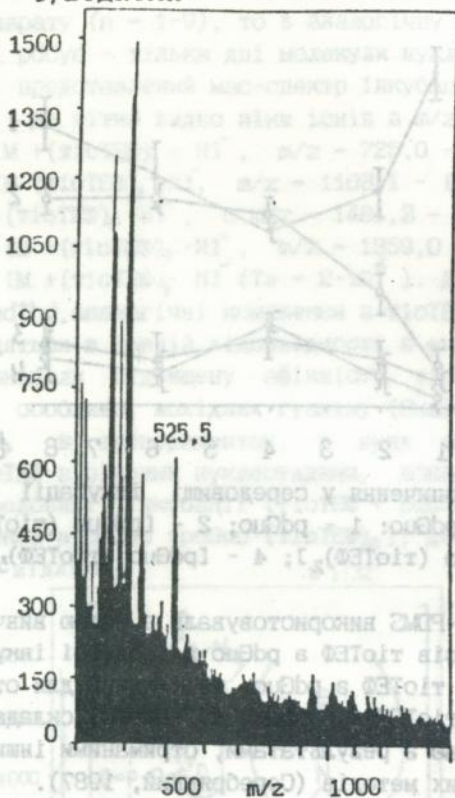


Рис. 3 TOF-PDMS спектр суміші проспідину (попередньо інкубованого 2 години при  $70^{\circ}\text{C}$ ) і pdGuo. Уприск. - + 20 kV; кількість стартів - 25 000; без матриці.

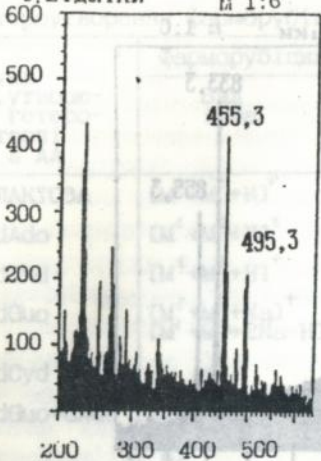
Утворення і реєстрація гетерокластерних комплексів в TOF-PDMS.

В серії експериментів з двокомпонентними еквімолярними сумішами типу  $(dn+dn')$  (dAdo+dThd; dGuo+dCyd; dAdo+dCyd; dCyd+dThd; dAdo+dGuo; dThd+dGuo) вперше показана можливість утворення в TOF-PDMS із твердофазних кристалічних полікомпонентних зразків поряд з гомокластерними іонами, гетерогенних асоціатів біомолекул (рис. 4).

TOF-PDMS підтверджена показана раніше з використанням інших MS-методик (FD, FAB, MALDI), підвищена стійкість гетерокластерного двокомпонентного іону  $[dGuo + dCyd + H]^+$  порівнянно з аналогічними нековалентно зв'язаними асоціатами інших дезоксирибонуклеозидів, присутніх в цій же пробі.

I, Відліки

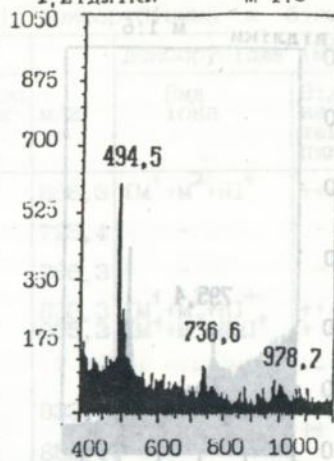
M 1:6



a.

I, Відліки

M 1:8



б.

11.

Рис. 4 TOF-PDMS спектри сумішей дезоксирибонуклеозидів  
а) dGuo и dCyd ; б) dAdo и dThd. Уприск.- +15 kV;  
кількість стартів - 100 000; без матриці.

Аналізу піддали також твердофазні системи які містять в собі біомолекули різної хімічної природи, а саме: амінокислоти L-Phe, L-Trp, His і компоненти НК (Gua, Cyt, Ura). Аналіз мас-спектрів вказаних модельних систем також підтвердив можливість детекції в TOF-PDMS гетерогенних нековалентно зв'язаних асоціатів, що містять різні за природою, але, напевно, досить добре відповідні один одному стереохімічно і функціонально, біомолекули.

#### Модельні системи

#### "антрацикліновий антибіотик - біомолекула-"мішень"

Докладно вивчений в модельній твердофазній системі процес комплексоутворення протипухлинних стереоізомерів АА доксорубіцина і флорорубіцина із структурними компонентами біополімерів клітини, особливо з нуклеозидами, оскільки для основного механізму протипухлинної дії даної групи препаратів постульовано наявність інтеркаляції плоских хромофорів антибіотиків між нуклеотидними парами молекули ДНК (Bailly, 1991). Виходячи із сучасних поглядів про вирішальні внесок в молекулярний механізм протипухлинного ефекту даних антибіотиків комплексних нековалентно зв'язаних утворень АА з НК і білковими компонентами хроматину, також були створені експериментальні умови для спостереження асоціатів молекул АА з деякими амінокислотами, зокрема, з амінокислотами, що найбільш часто зустрічаються в активних центрах молекул ферментів (His, Phe).

Підсумовані результати серії експериментів по дослідженню неко-

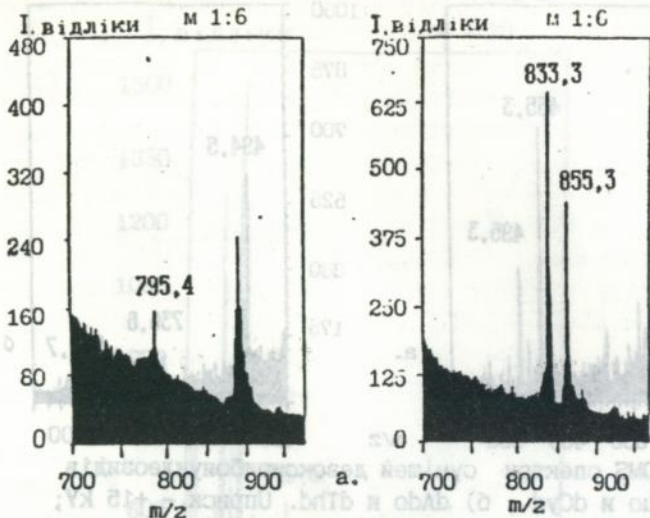


Рис. 5 TOF-PDMS спектри сумішей фарморубіцина (Fr) і дезоксирибонуклеозидів: а) Fr і dAdo; б) Fr і dGuo. Уприск.- +15 kV; кількість стартів - 100 000; без матриці.

валентного зв'язування AA з компонентами клітинних макромолекул-"мішеней" наведені в таблиці. Аналіз 24 вивчених модельних систем показав високу комплексоутворюючу здатність протипухлинних препаратів даної групи по відношенню до компонентів НК і білків, що знайшло своє відображення в мас-спектрах TOF-PDMS у вигляді інтенсивних піків гетерокластерних іонів типу [AA + біомолекула-"мішень"]. Незначна різниця в хімічній структурі стереоізомерів фарморубіцина (Fr) і доксорубіцина (Dr) чинить значний вплив як на утворення гетерокластерних іонів при введенні в модельну систему того чи іншого AA, так і на інтенсивність відповідних цим іонам піків в мас-спектрах.

Так, наприклад, Fr утворює гетерогенні асоціати з dAdo, dGuo і dThd, але не з dCyd (рис.5). Якщо прийняти відносну інтенсивність піків таких гетерокластерних іонів за міру стабільності асоціатів, то для комплексу з dGuo характерно більш міцне зв'язування, яке визначається, напевно, стеричною відповідністю взаємодіючих молекул. Далі, аналіз інтенсивності піків гетерокластерних іонів у бінарних сумішах, а також дослідження конкурентної вибірковості в зв'язуванні AA з дезоксирибонуклеозидами в трьохкомпонентній суміші "AA+dN+dN'" дозволив побудувати ряд стабільності комплексів і вибірковості AA по відношенню до dN. Для Fr він має такий вигляд:



Для стереоізомера Fr - доксорубіцина (Dr), навпаки, характерне

## Кластероутворення фарморубіцин і доксорубіцин з біомолекулами

ТАБЛИЦЯ

Сполука (M <sup>1</sup> ), утворює гетеро-кластерні іони з АА	Фарморубіцин (M <sup>2</sup> )		m/z	Доксорубіцин (M <sup>2</sup> )		m/z
	Вид іона	Віднос на інтенс. піка		Вид іона	Віднос на інтенс. піка	
1. ЛАКТОЗА	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	886,3	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	886,3
2. dAdo	$[M^1+M^2+H]^+$	+	795,4	-	-	-
3. dThd	$[M^1+M^2+H]^+$	++	786,3	-	-	-
4. dGuo	$[M^1+M^2+Na]^+$ $[M^1+M^2+2Na-H]^+$	+++ ++	833,3 855,3	$[M^1+M^2+H]^+$ $[M^1+M^2+Na]^+$	+++ +	811,3 833,4
5. dCyd	-	-	-	-	-	-
6. dGuo+dAdo	$[M^2+dGuo+Na]^+$ $[M^2+dGuo+2Na-H]^+$	+++ +	833,3 855,4	$[M^2+dGuo+H]^+$ $[M^2+dGuo+Na]^+$	+ ++	811,4 833,3
7. dGuo+dThd	$[M^2+dGuo+Na]^+$	+++	833,3	$[M^2+dGuo+H]^+$	++	811,3
8. dAdo+dThd	$[M^2+dThd+H]^+$	+	786,3	-	-	-
9. dGuo+dAdo+dThd	$[M^2+dGuo+H]^+$ $[M^2+dGuo+Na]^+$	++ +	811,4 833,3	$[M^2+dGuo+H]^+$ $[M^2+dGuo+Na]^+$	++ ++	811,3 833,3
10. dCyd+dAdo+dGuo+dThd	-	-	-	-	-	-
11. Guo	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	827,2	$[M^1+M^2+H]^+$	++	827,2
12. Cyd	$[M^1+M^2+H]^+$ pH 10,6	+++	787,3	$[M^1+M^2+H]^+$ pH 6,7	++	787,3
13. Gua	-	-	-	-	-	-
14. Ade	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	679,2	-	-	-
15. Cyt	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	655,2	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	655,2
16. Gua+Cyt	$[M^2+Cyt+H]^+$	+++	655,3	$[M^2+Cyt+H]^+$	+++	655,3
17. Ade+Cyt	$[M^2+Cyt+H]^+$	+++	655,2	$[M^2+Cyt+H]^+$	++	655,1
18. 1-MeCyt	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	669,3	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	669,3
19. 5-MeCyt	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	669,2	$[M^1+M^2+H]^+$	++	669,2
20. iso-Cyt	$[M^1+M^2+H]^+$	++	655,2	$[M^1+M^2+H]^+$	++	655,3
21. Phe	-	-	-	-	-	-
22. iso-Phe	$[M^1+M^2+H]^+$	+	709,3	$[M^1+M^2+H]^+$	+	709,2
23. His+dGuo	$[M^2+dGuo+H]^+$ $[His+dGuo+H]^+$	++ +++	811,2 423,3	$[M^2+dGuo+H]^+$ $[His+dGuo+H]^+$	++ +++	811,3 423,2
24. His	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	699,3	$[M^1+M^2+H]^+$	+++	699,1

комплексотворення тільки по відношенню до dGuo, тому подібної кореляції для даного препарату показати не вдалося. Пріоритет стереохімічної відповідності взаємодіючих молекул при формуванні супрамолекулярного комплексу підтверджується також на прикладі системи "AA + His", в мас-спектрі якої відзначений характерний пік гетерокластерного іону  $[AA + His + H]^+$ . При розгляді трьохкомпонентної системи "AA + dGuo + His" підтверджується конкурентна перевага AA по відношенню до dGuo.

Присутність в мас-спектрі даної реакційної суміші піку єдиного гетерокластерного іону, що містить молекули AA і dGuo, напевно, пов'язана з наявністю більшої кількості сайтів зв'язування з AA в молекулі dGuo порівняно з His.

Мас-спектрометрично показана здібність Fr і Dg до зв'язування, крім компонентів НК і білків, з вуглеводами, зокрема з лактозою. Османне підтверджено в експериментах з використанням оптичних методів (Husain N., 1992). Більш того, лактоза була використана як матрикс при вивченні AA та їх взаємодії з біомолекулами, так як даний дисахарид відповідає критеріям правил підбору матриксу в TOF-PDMS, запропонованих Jungclas et al. (1993), і значно підвищує інформативність мас-спектру.

## ВИСНОВКИ

1. Методом TOF-PDMS твердофазних кристалічних зразків модельних сумішей препарату тіоТЕФ з компонентами НК ідентифіковані нові, раніше не виявлені іншими мас-спектрометричними методами, складні гетерокластерні іони типу  $[\text{дезоксирибонуклеотид}(\text{pdN})+(\text{тіоТЕФ})_n\text{-H}]^+$ , де  $n = 1-9$  (для pdGuo). Показана залежність стехіометрії гетерокластерних іонів  $[\text{pdN}+(\text{тіоТЕФ})_n\text{-H}]^+$  від хімічної природи дезоксирибонуклеотидів:

pdN	pdGuo	pdCyd	pdAdo	pdThd
n	1-9	1-2	0	0

2. Вивчення модельної системи "проспідін - біомолекула-"мішень" (pdGuo)" TOF-PDMS дозволило виявити модифікований по фосфатному залишку дезоксирибонуклеотиду мінорний ковалентно зв'язаний аддукт проспідіна і pdGuo, відмінний від канонічних аддуктів нуклеотидів, модифікованих по атому N7 азотистої основи (Gua).

3. Вперше показано існування в TOF-PDMS феномену утворення із твердофазних кристалічних полікомпонентних зразків поряд із гомокластерними іонами  $[A_n + H]^+$ ,  $n \geq 1$ ;  $[B_m + H]^+$ ,  $m \geq 1$ , гетерокластерних іонів  $[A + B + H]^+$ , що складаються, зокрема, із елементарних біомолекул (dAdo-dThd, dGuo-dCyd) - для сумішей нуклеотидів або біомолекул, які розрізняються за фізико-хімічними параметрами і хімічній структурі: наприклад, (амінокислота - амінокислота')

для суміші канонічних амінокислот.

4. На основі TOF-PDMS показана кореляція між:

а) інтенсивністю піків гетерокластерних іонів [AA + біомолекула-"мішень"] і хімічною природою біомолекул, які складають гетерокластерну структуру: відносна інтенсивність піків іонів [AA+dGuo+H]<sup>+</sup>, [AA+dThd+H]<sup>+</sup>, [AA+dAdo+H]<sup>+</sup>, узгоджується з неодноразово показаною раніше методами молекулярної біології підвищеною афінністю AA до GC-збагачених ділянок нуклеїнових кислот;

б) мас-спектрометричними даними (феноменом утворення специфічних гетерокластерних іонів типу [AA + біомолекула-"мішень"] та інтенсивністю їх піків в мас-спектрах) і протипухлинною хіміотерапевтичною активністю, які не суттєво відрізняються за хімічною структурою AA - стереоізомерів фарморубіцина і доксорубіцина. Більш активний по відношенню до малігнізаційних клітин препарат фарморубіцин, утворює гетерокластерні іони із значно більшою кількістю різних за хімічною структурою біомолекул в порівнянні з менш ефективним протипухлинним AA - доксорубіцином.

5. Знайдена високоефективна високоспецифічна матриця, яка дозволяє вивчати методом TOF-PDMS гетерокластерні іони типу [AA + біомолекула-"мішень"] - лактоза.

6. Показано, що AA утворюють гетерокластерні іони типу [AA + амінокислота + H]<sup>+</sup> з основною амінокислотою His і амінокислотами, в склад яких входить ароматичне кільце (iso-Phe).

#### Список статей, надрукованих за темою дисертації:

1. Суходуб Л.Ф., Чиванов В.Д., Гребеник Л.И., Вондаренко П.В., Зубарев Р.А., Кныш А.Н. Наблюдение продуктов модификации дезоксигуанозин-5'-фосфата тиоТЭФом с помощью масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления калифорния-252// Биоорг. хим. - 1991. - Т. 17, N7. - С. 999-1001.

2. Суходуб Л.Ф., Чиванов В.Д., Гребеник Л.И., Вондаренко П.В., Зубарев Р.А., Кныш А.Н. Изучение взаимодействия триэтилентифосфамида с нуклеотидами методом масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления калифорния-252// Укр. биохим. журн. - 1992. - Т. 64, N 1. - С. 41-49.

3. Суходуб Л.Ф., Гребеник Л.И., Чиванов В.Д. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления калифорния-252 к изучению механизмов действия лекарственных препаратов на ДНК и ее компоненты// Биофизика. - 1994. - Т. 39, вып.2. - С. 289-293.

4. Гребеник Л.И., Чиванов В.Д., Суходуб Л.Ф. Масс-спектрометрическое изучение специфичности взаимодействия противоопухолевых антибиотиков доксорубицина и фарморубицина с компонентами биополимеров// Вісник Сумського державного університету. - 1994. - N 1. - С. 106 - 120.

5. Sukhodub L.F., Grebenik L.I., Chivanov V.D. Study of anticancer drug interaction with DNA by means of particle-induced desorption mass-spectrometry: prospidine and deoxyguanosine-5'-monophosphate//Rapid Commun. Mass Spectrom. - 1994. - v.8 - P. 195 - 198.

Гребеник Л.И. Изучение межмолекулярных взаимодействий противоопухолевых препаратов (тиоТЕФа, проспидина, доксорубина, фарморубина) с некоторыми структурными компонентами нуклеиновых кислот и белков методом масс-спектрометрии.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.05 - биофизика. Харьковский государственный университет. Харьков, 1996.

Изучены процессы взаимодействия противоопухолевых препаратов алкилирующего типа (тиоТЕФа, проспидина) и интеркаляторов (доксорубина, фарморубина) с некоторыми азотистыми основаниями, нуклеотидами, нуклеотидами и аминокислотами методом масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления Cf-252 (TOF-PDMS). Обнаружены новые ковалентно и нековалентно связанные аддукты, являющиеся результатом взаимодействия указанных соединений. На основании TOF-PDMS эксперимента показана корреляция между химической структурой стереоизомеров - доксорубина и фарморубина, их способностью к комплексообразованию с мономерами биомолекул и противоопухолевой активностью.

Grebenik L.I. Study of intermolecular interactions of antitumor drugs (thioTEPA, prospidine, doxorubicine, farmorubicine) with some structural components of nucleic acids and proteins by means of mass spectrometry.

The thesis submitted for a candidate's degree in biological sciences in speciality 03.00.05 - biophysics. Kharkov state university. Kharkov, 1996.

Processes of the interaction of antitumor drugs of the alkylation type (thioTEPA, prospidine) and intercalators (doxorubicine, farmorubicine) with some nitrogen bases, nucleosides, nucleotides and amino acids has been studied by means of the time-of-flight 252-Cf particle desorption mass-spectrometry. New covalent and noncovalent binding adducts, which are the results of the interaction above mentioned compounds has been found. On the basis of TOF-PDMS experiments suggests correlation between chemical structure of stereoisomers - doxorubicine and farmorubicine, their possibility to complexation with biomolecule's monomers and antitumor activity.

**Ключові слова:** нуклеїнові кислоти, білки, тиоТЕФ, проспідин, антрациклінові антибіотики, мас-спектрометрія.

Підписано до друку 29.01.96. Формат 60х34 1/16  
Замовл. № 34 Безкоштовно. Тираж 100 прим.  
"Різоцентр" СумДУ, 244007, Суми, вул. Римського-Корсакова, 2



AB 33 543

AV 33.842

**AV 33.842**