



УДК 577.113.4:543.51

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИОНИЗАЦИЕЙ УСКОРЕННЫМИ АТОМАМИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОДУКТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТИОФОСФАМИДА С ДНК

*Суходуб Л. Ф., Андриевский Г. В., Пятигорская Т. Л.,
Косевич М. В., Жилкова О. Ю.*

*Физико-технологический институт низких температур Академии наук УССР,
Харьков*

До настоящего времени не имеется работ по прямому наблюдению продуктов алкилирования ДНК соединениями, содержащими этилениминные группы. Задача осложняется разрушением аддуктов при химическом гидролизе ДНК и, в случае полифункциональных агентов, затруднением ферментативного гидролиза из-за возможности взаимодействия свободных этилениминных групп с нуклеазами.

Имея в виду указанные обстоятельства, мы применили для изучения механизма взаимодействия противоопухолевого алкилирующего препарата N,N',N'' -триэтилтиофосфамида (тиофосфамида, тиотэф, I) с ДНК метод масс-спектрометрии с ионизацией ускоренными атомами (МС ИУА) в сочетании с ТСХ и УФ-спектроскопией.

Алкилирование ДНК проводили в мягких условиях, приближенных к физиологическим. Для выщепления алкилированных пуринов раствор ДНК прогревали и полученную смесь разделяли гель-фильтрацией. В первой фракции (объем 82 мл, объем удержания 85 мл) содержались олигодезоксирибонуклеотиды, которые в дальнейшем не анализировались. В таблице приведены характеристики второй и третьей фракций. При ТСХ каждой из них кроме ряда слабых пятен получалось только одно основное пятно с максимальной интенсивностью. Соответствующие им соединения (II) и (III), выделенные элюцией с пластинки, характеризуются приведенными в таблице значениями R_f и спектральными данными.

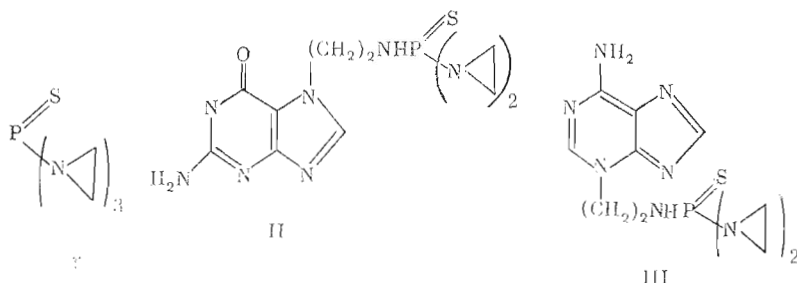
На основании данных МС ИУА с учетом результатов, полученных ранее на модельной системе (dGMP + тиотэф) [1, 2], и литературных данных [3, 4] по УФ-спектрам алкилпроизводных гуанина и аденина был сделан вывод о том, что основное вещество, содержащееся во фракции 2 — N^7 -аддукт тиотэфа с гуанином (II), а во фракции 3 — N^3 -аддукт с адени-

Хроматографические, масс-спектрометрические и спектральные характеристики продуктов взаимодействия ДНК с тиотэфом

Номер фракции *	Объем фракции, мл	Объем удержания, мл	m/z		Продукт	Выход продуктов **	R_f (система)	рН	λ_{max} , нм	λ_{min} , нм	A_{254}/A_{260}
			[M+H] ⁺	[M-N] ⁺							
2	35	165	341	298	II	8,3	0,52 (А)	1	256	234	0,76
								7	284 (250)	262	1,32
							0,59 (Б)	13	280	259	1,29
3	55	210	325	282	III	3,4	0,26 (А)	1	276	240	1,23
								7	277	249	1,36
							0,72 (Б)	13	276	250	1,38

* Колонка 2,6 X 26 см с сефадексом G-25, скорость элюции 1,5 мл/мин.

** Выход рассчитывали спектрофотометрически, считая для (II) $\epsilon_{254} = 8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, для (III) $\epsilon_{277} = 9,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [3, 4].



Таким образом, использование метода МС ИУА позволило впервые детектировать продукты взаимодействия ДНК с алкилирующим препаратом, содержащим этилениминовые группы (и в сочетании с УФ-спектроскопией — идентифицировать центры алкилирования), минуя стадии гидролиза ДНК и препаративного выделения индивидуальных продуктов.

Экспериментальная часть

В работе использовали дополнительно очищенные [5] препараты тиотэфа (Омийнский химико-фармацевтический завод, СССР) и ДНК из эритроцитов цыплят (Reanal, Венгрия).

Реакцию алкилирования ДНК проводили, добавляя к 40 мл раствора ДНК (с концентрацией ДНК 1,43 мг/мл) в 0,01 М NaCl 660 мг тиотэфа в 10 мл воды (результатирующее молярное отношение тиотэф/ДНК(Р)=20:1) и инкубируя смесь при 37°С в течение 140 ч. За время инкубации рН раствора возрастало от 6,6 до 7,8. Затем раствор упаривали в вакууме при 40°С до объема 4–5 мл и избыток тиотэфа экстрагировали (5×5 мл) смесью бензол — хлороформ (1:1). После вторичного упаривания до объема 3–4 мл раствор нагревали на водяной бане при 100°С в течение 1 ч, охлаждали и разделяли с помощью гель-фильтрации на колонне (2,6×26 см) с сефадексом G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), элюируя фракции водой со скоростью 1,5 мл/мин и контролируя поглощение элюата на длине волны 280 нм.

Для масс-спектрометрических исследований фракции 2 и 3 высушивали в вакууме при 40°С. Масс-спектры ИУА получали при помощи масс-спектрометра МИ1201-Э (СССР) в матрице глицерина при энергии первичного луча ионов аргона 3,5 кэВ.

Для УФ-спектрометрических исследований фракции 2 и 3 предварительно разделяли методом ТСХ на пластинках Silufol (Kavalier, ЧССР) в следующих системах растворителей: *n*-бутанол — ацетон — вода, 2:1:1 (А); изопропанол — 25% водный раствор аммиака, 3:2 (Б). Вещества из зон пятен экстрагировали водой и УФ-спектры регистрировали при помощи спектрофотометра «Specord UV VIS» (Carl Zeiss, ГДР).

ЛИТЕРАТУРА

1. Серебряный А. М., Андриевский Г. В., Беккер А. Р., Сибельдина Л. А., Поволоцкая М. Н. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 499–506.
2. Серебряный А. М., Андриевский Г. В., Беккер А. Р., Сибельдина Л. А., Шарова О. Л. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 786–792.
3. Price C. C., Gaucher G. M., Koneru P., Shibakawa R., Sowa J. R., Yamaguchi M. // Biochim. et biophys. acta. 1968. V. 165. P. 327–359.
4. Institoris E., Tamas J. // Chem.-Biol. Inter. 1983. V. 47. P. 133–144.
5. Пятигорская Т. Л., Жилкова О. Ю., Муравьева Л. М., Сухогоуб Л. Ф. // Молеку-

Поступило в редакцию 14.IV.1988

IDENTIFICATION OF DNA-THIOTEPA ADDUCTS BY MEANS OF THE FAST ATOM BOMBARDMENT MASS SPECTROMETRY

SUKHODUB E. F., ANDRIEVSKY G. V., PYATIGORSKAYA T. L., KOSEVICH M. V., ZHILKOVA O. Ya.

Institute for Low Temperature Physics and Engineering, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov

Products of interaction between DNA and an antitumour drug N, N', N''-triethylethiophosphoramidate (thiotepa) have been observed for the first time by the fast atom bombardment mass spectrometry. The sites of alkylation are detected as N7 (Gua) and N3 (Ade), and yields of the products are evaluated.