



УДК 577.113.4 : 543.51

© 1991 г.

*Л. Ф. Суходуб, В. Д. Чиванов, Л. И. Гребеник,  
П. В. Бондаренко\*, Р. А. Зубарев\*, А. Н. Кныш\*\**

**НАБЛЮДЕНИЕ ПРОДУКТОВ МОДИФИКАЦИИ  
ДЕЗОКСИГУАНОЗИН-5'-ФОСФАТА ТИОТЭФОМ С ПОМОЩЬЮ  
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИОНИЗАЦИЕЙ ОСКОЛКАМИ ДЕЛЕНИЯ  
КАЛИФОРНИЯ-252**

*Отделение прикладной физики ИМФ АН УССР, Сумы;  
\*ВНИИ технической физики и автоматизации, Москва;  
\*\*ПО «Электрон», Сумы*

Для изучения механизмов взаимодействия противоопухолевых алкилирующих препаратов с ДНК и ее компонентами помимо традиционных спектроскопических подходов (УФ, ЯМР) в последние годы успешно применяются современные масс-спектрометрические методы, основанные на мягких видах ионизации молекул: полевая ионизация (ПИ) и полевая десорбция (ПД), бомбардировка ускоренными атомами (БУА) и др. [1—3]. Основное достоинство мягкоионизационной масс-спектрометрии заключается в возможности прямого наблюдения высокомолекулярных лабильных и/или нелетучих соединений, причем на уровне следовых концентраций.

Полученные на различных модельных тест-системах данные, касающиеся структурных и физико-химических особенностей продуктов модификации нуклеиновых кислот алкилирующими противоопухолевыми препаратами, описаны в литературе [4—6].

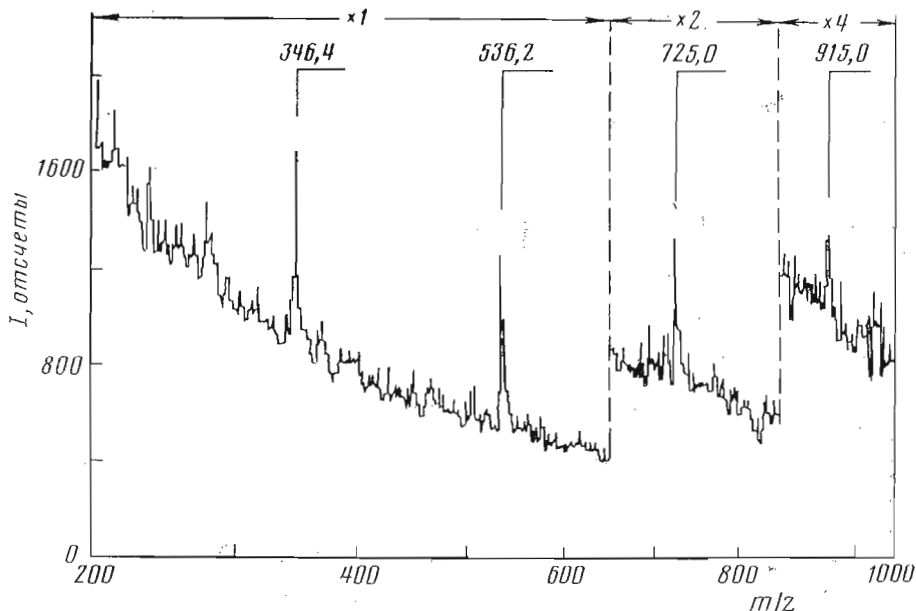
Так, в работах [1—3, 5, 6] методом масс-спектрометрии при ионизации полевой десорбцией и бомбардировкой ускоренными атомами показано образование модифицированных тиотэфом нуклеозидов и свободных оснований, а также аддуктов Cyt, Ade и  $m^9\text{Gua}$  с тиотэфом.

Установлена структура продуктов модификации тиотэфом дезоксигуанозина и дезоксигуанозин-5'-фосфата (pdGuo) — компонентов ДНК, в наибольшей степени подвергающихся алкилированию противоопухолевыми препаратами на основе этиленimina [7—9]. Показано наличие в реакционной смеси комплексов  $\text{pdGuo} \cdot (\text{тиотэф})_n$  с  $n = 1, 2$  и установлены места присоединения тиотэфа к нуклеотиду.

В настоящей работе сообщается об обнаружении более сложных комплексов  $\text{pdGuo} \cdot (\text{тиотэф})_n$  ( $n = 1-3$ ), образующихся приблизительно в тех же условиях, что и в работе [8], с помощью масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления калифорния-252. Этот метод масс-спектрометрии сочетает достаточную мягкость, обеспечивающую получение молекулярных и квазимолекулярных ионов с массой до 50 000 Да, с образованием набора пиков, соответствующих фрагментам исходной молекулы, — свойством, присущим более жестким методам ионизации [10].

Принципиальная возможность появления в среде инкубации названных сложных продуктов алкилирования обусловлена, с одной стороны, наличием в молекуле тиотэфа трех функциональных этилениминных групп, способных образовывать соответствующие межмолекулярные связи,

Тиотэф — N,N',N'' триэтилентриамид тиофосфорной кислоты, PDMS — масс-спектрометрия с ионизацией осколками деления калифорния-252 (plasma desorption mass spectrometry).



Масс-спектр PDMS инкубационной смеси модификации *pdGuo* тиотэфом

а с другой — способностью *pdGuo* присоединять по крайней мере две молекулы тиотэфа [11].

На рисунке представлены участки масс-спектра с пиками, соответствующими комплексам  $pdGuo \cdot (тиотэф)_1$  ( $m/z$  536,  $[M - H]^-$ ),  $pdGuo \cdot (тиотэф)_2$  ( $m/z$  725,  $[M - H]^-$ ),  $pdGuo \cdot (тиотэф)_3$  ( $m/z$  915,  $[M - H]^-$ ).

Предполагаемые места присоединения двух молекул тиотэфа в соответствии с работами [7, 8] — атом N7 основания и 5'-фосфатный остаток при дезоксирибозе *pdGuo*; место связывания третьей молекулы тиотэфа достоверно не установлено. Возможно, происходит присоединение тиотэфа к уже связанной с *pdGuo* молекуле препарата по механизму образования димера (тиотэф)<sub>2</sub>, описанному в работе [6]; в пользу указанного предположения свидетельствует исчезновение при подкислении среды инкубации соляной кислотой пика, соответствующего квазимолекулярному иону с  $m/z$  915 ( $pdGuo \cdot (тиотэф)_3$ ), в отличие от пиков с  $m/z$  725 и 536.

Подчеркнем высокую чувствительность PDMS: в работе [8] содержание аддукта с  $m/z$  536 ( $pdGuo \cdot (тиотэф)_1$ ) составляет 1,2% от исходной массы *pdGuo*; в нашем случае, как видно из рисунка, указанный комплекс характеризуется интенсивным пиком. Интенсивность пиков с  $m/z$  725 и 915 намного ниже. Это дает основание для вывода о крайне малом содержании таких комплексов в реакционной среде, что свидетельствует о возможности использования PDMS для регистрации следовых количеств комплексов химиотерапевтических препаратов с биомолекулами наравне с другими методами, например иммунохимическим, выявляющим 2—3 аддукта на  $10^8$  оснований [12].

Таким образом, масс-спектрометрия с ионизацией осколками деления калифорния-252 может быть рекомендована для аналитических исследований лабильных высокомолекулярных комплексов типа «биопрепарат — биомолекула», присутствующих *in vivo* или в составе многокомпонентных модельных тест-систем в следовых количествах.

### Экспериментальная часть

Использовали очищенный перекристаллизацией тиотэф [6] и дезокси-гуанозин-5'-фосфат отечественного производства.

Алкилирование *pdGuo* проводили, прибавляя к 20 мкл водного раствора *pdGuo* (50 мкг/мл) 20 мкл водного раствора тиотэфа (50 мкг/мл), и инкубировали полученную смесь (рН 6,5—7,2) при 37° С в течение 1,5 ч.

Для масс-спектрометрических исследований инкубационную смесь после окончания реакции наносили на нитроцеллюлозу и подсушивали струей теплого воздуха. Нитроцеллюлозную подложку (коллоксилин целлулоидный) готовили методом электрораспыления раствора нитроцеллюлозы в ацетоне (Chemapol, ЧСФР) на установке «Электроспрей»-УНП (ПО «Электрон», СССР). Масс-спектры получали при помощи времяпролетного масс-спектрометра МСБХ с ионизацией осколками деления калифорния-252 (диапазон массовых чисел до 20 000 Да, чувствительность по грамицидину S 100 фмоль [13] (ПО «Электрон», СССР)). Время накопления  $1 \cdot 10^6$  стартов, ускоряющее напряжения — 20 кВ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sukhodub L. F., Kosevich M. V., Pyatigorskaya T. L., Zhilkova O. Yu., Shelkovsky V. S. // 11 Int. Mass. Spectrom. Conf. Bordo. 1988. P. WEA 42.
2. Суходуб Л. Ф., Андриевский Г. В., Пятигорская Т. Л., Косевич М. В., Жилкова О. Ю. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1698—1699.
3. Суходуб Л. Ф., Косевич М. В., Шелковский В. С., Пятигорская Т. Л., Жилкова О. Ю. // Биофизика. 1990. Т. 35. № 4. С. 549—551.
4. Singer B. // Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 1975. V. 15. P. 219—284.
5. Суходуб Л. Ф., Шелковский В. С., Косевич М. В., Пятигорская Т. Л., Жилкова О. Ю. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 283. № 3. С. 714—716.
6. Sukhodub L. F., Shelkovsky V. S., Kosevich M. V., Pyatigorskaya T. L., Zhilkova O. Yu. // Biomed. and Environ. Mass Spectrom. 1986. V. 13. № 41. P. 167—170.
7. Серебряный А. М., Андриевский Г. В., Беккер А. Р., Сибельдина Л. А., Поволоцкая М. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 499—506.
8. Серебряный А. М., Андриевский Г. В., Беккер А. Р., Сибельдина Л. А., Шарова О. Л. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 786—792.
9. Yu V. T., Fenselau C. C., Colvin O. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 24. P. 7362—7364.
10. Torgerson D. F., Skowronsky R. P., Macfarlane R. D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 60. № 2. P. 616—621.
11. Химия и фармакология синтетических противоопухолевых препаратов: Справочник // Киев: Наукова думка, 1985. 268 с.
12. Roberts D. W., Benson R. V., Groopman J. D. // Cancer Res. 1988. V. 48. № 22. P. 6336—6342.
13. Knysh A. N., Savin O. R., Loschinin M. B., Kirianov G. Y., Bondarenko P. V., Zubarev R. A., Rozynov B. V. // Proc. V Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Active Nat. Prod. V. 2. Varna, 1989. P. 370—372.

Поступило в редакцию  
19.X.1990

L. F. SUKHODUB, V. D. CHIVANOV, J. I. GREBENIK, P. V. BONDARENKO \*,  
R. A. ZUBAREV \*, A. N. KNYSH \*\*

#### OBSERVATION OF THIOTEPA — DEOXYGUANOSINE-5'-PHOSPHATE MODIFICATION PRODUCTS BY PDMS

*Metal Physics Institute, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Sumy;*

*\*Institute for Technical Physics and Automatization, Moscow;*

*\*\*РА «Electron», Sumy*

By means of the plasma desorption mass spectrometry (californium-252) products of the interaction between deoxyguanosine-5'-phosphate (pdG) and the antitumour drug hiotepa (pdG · (thiotepa)<sub>n</sub>, n = 1, 2, 3) have been identified.