

# БИОЛОГИЯ. МЕДИЦИНА

УДК 577.113.4:543.51

## МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ ДОКСОРУБИЦИНА И ФАРМОРУБИЦИНА С КОМПОНЕНТАМИ БИОПОЛИМЕРОВ

Гребеник Л.И., Чиванов В.Д., Суходуб Л.Ф.

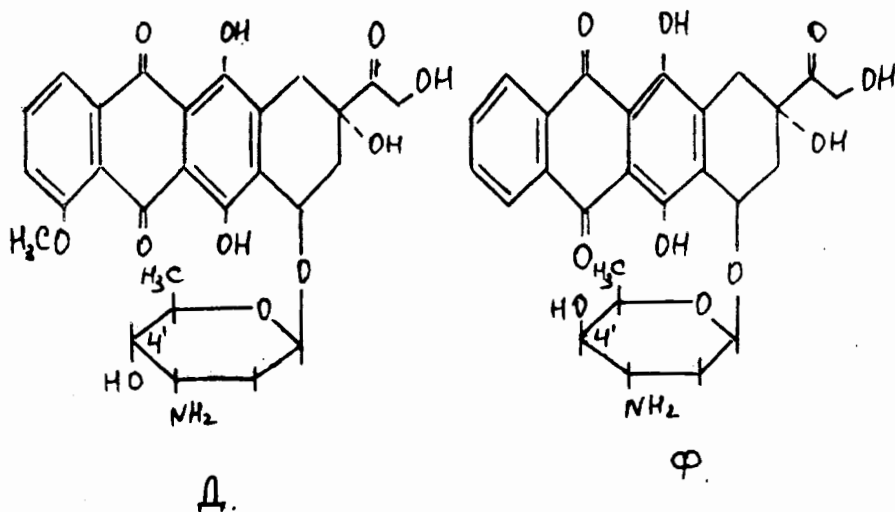
\* Институт прикладной физики АНУ, Сумы, Украина;

\*\* Сельскохозяйственный институт, Сумы, Украина.

### ВВЕДЕНИЕ

Антрациклиновые антибиотики (АА) относятся к одной из наиболее перспективных групп противоопухолевых препаратов, одним из механизмов действия которых является прямое взаимодействие с ДНК, что приводит к снижению матричной активности последней в процессах репликации и транскрипции [1 - 4].

Типичными представителями этой группы АА являются доксорубин (Д) и фарморубин (Ф), различающиеся ориентацией ОН-группы в 4'С положении аминосахарного остатка. Это стереохимическое



различие при сравнительно высокой терапевтической активности как Д, так и Ф (карциномы, злокачественные лимфомы, лейкемии), обуславливает более низкую "токсикологию" препарата Ф по сравнению с Д, причем особенно в плане кардиотоксичности [2].

Предполагается, что прямое взаимодействие Д и Ф с ДНК происходит по механизму интеркаляции плоских хромофоров антибиотиков между нуклеотидными парами (А-Т, G-C) ДНК [1].

В этой связи представляет определенный интерес изучение процессов комплексообразования подобных антибиотиков с отдельными нуклеозидами ДНК, поскольку данные о нуклеотидной специфичности

препаратов А и Ф в литературе практически полностью отсутствуют. Одним из надежных методов, пригодным для получения информации о специфичности межмолекулярного взаимодействия в системе "лекарственный препарат - биомолекула", может быть мягкоионизационная масс-спектрометрия, основанная на ионизации молекул высокоэнергетическими осколками деления калифорния-252 (PDMS-<sup>252</sup>Cf) [5]. Полученный данным методом масс-спектр исследуемой смеси, как правило, содержит наряду с пиками, соответствующими составляющим смесь компонентам (Лекарственный препарат) (ЛП) и (Биомолекула) (Б), и пики, отвечающие как гомо-, так и гетерокомплексам типа [(ЛП)<sub>n</sub>Б], где  $n \geq 1$ . Последние дают возможность судить о принципиально возможных реакциях и о выходе образующихся межмолекулярных аддуктов в реальной биологической среде и, таким образом, быть полезными при установлении степени химиотерапевтической активности тех или иных, в том числе и вновь синтезированных, противоопухолевых препаратов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Реактивы и материалы.*

Использовали фарморубин (эпирубин гидрохлорид) и доксорубин (доксорубин гидрохлорид) "Farmitalia Carlo Erba", Italy, дезоксинуклеозиды dAdo, dThd, dGuo, dCyd, рибонуклеозиды Guo, Cyt (НИКТИ БАВ, Россия), основания Cyt "Chemapol" (ЧСФР), 1 MeCyt, 5 MeCyt, iso-Cyt, "Serva" (Германия), аминокислоты Arg, Phe, iso-Phe, Leu, Val, Ile, Cys, Gly, лактоза "Реахим" (Россия), нитроцеллюлоза "Schleicher & Schuell" (Германия).

### *I. Проведение пробподготовки.*

Пробы готовили, нанося водные растворы препаратов (суммарный объем 40 мкл) на:

- I) поверхность позолоченного пробонесущего диска;
- II) слой нитроцеллюлозы, нанесенной на диск электронапылением раствора нитроцеллюлозы в ацетоне (установка "Электроспрей-УНП", "Selmi", (Украина);
- III) поверхность капли водного раствора лактозы (2-4 мг/мл), распределенной на пробонесущем диске на площади 0,5-0,8 см.

Для получения гетерокластерных образований водные растворы препаратов (1 мг/мл) и биомолекул (1 мг/мл) смешивали в соотношении 1 : 1 (по объему), до суммарного объема 40 мкл (рН 6,8-7,2), переносили на пробонесущий диск одним из трех вышеперечисленных методов (в зависимости от цели эксперимента) и подвергали высушиванию в струе воздуха при температуре  $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Среднее время высушивания - 15-20 мин. Инкубирование проводили, где указано, при температуре  $38 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 1 часа, рН микроколичеств (10-20 мкл) растворов устанавливали компактным рН-метром (Compact pH meter C-1 "Horiba", (Япония).

### *II. Масс-спектрометрия.*

Масс-спектрометрические исследования проводили с использованием времяпролетного биохимического масс-спектрометра МСБХ "Selmi" (Украина), в котором ионизация осуществляется в результате бомбардировки мишени осколками деления <sup>252</sup>Cf. Диапазон массовых чисел МСБХ распространяется не менее чем до 35000 u (35 кДа), чувствительность по грамицидину S составляет 100 фмоль, среднее время анализа 1 пробы - 10-20 мин [6]. Получение масс-спектров осуществляли при

ускоряющем напряжении + 15 kV, время накопления (количество событий распада  $^{252}\text{Cf}$  (стартов) - 25000. Точность измерения массы в диапазоне до 5000 u равна 1,0 u.

Каждое измерение повторяли не менее 3 раз, поскольку в наших исследованиях точность определения молекулярной массы ионов составляла  $\pm 0,8$  u и в силу того, что отношение сигнал/шум равнялось 1,0 - 0,25.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### а) ФАРМОРУБИЦИН И ДОКСОРУБИЦИН.

Из рис. 1 видно, что масс-спектры фарморубицина (а) и доксорубицина (b), нанесенных на золотую подложку, несколько разнятся: фарморубицин, в отличие от доксорубицина не дает пика квазимолекулярного иона  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , в масс-спектре отмечен ион  $[\text{M} + \text{Na}]^+$   $m/z$  566,4. Использование в качестве матрицы-подложки традиционной для PDMS нитроцеллюлозы (NC) [7], показало существенные отличия: фарморубицин характеризуется повышенной склонностью к ассоциации  $[\text{M}_n + \text{H}]^+$ , где  $n = 1 \dots 5$  (рис. 2а). Доксорубицин в тех же условиях дает два пика квазимолекулярных ионов:  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $m/z$  544,0;  $[2\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $m/z$  1087,9 (рис. 2b). По-видимому, повышенная склонность фарморубицина к образованию гомокластерных ионов обусловлена в первую очередь особенностями структуры молекулярных кристаллов препарата, образующихся в процессе пробоподготовки [8].

Эксперименты показали, что наиболее подходящей матрицей для проведения исследований по определению эффективности связывания данных АА с биомолекулами является дисахарид лактоза: в ее присутствии фарморубицин и доксорубицин дают однотипные масс-спектры однозарядных квазимолекулярных ионов  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $m/z$  544,1, и ионов димеров  $[2\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $m/z$  1087,7 (рис. 3 а, b).

Характерно, что как фарморубицин, так и доксорубицин образуют гетерокластерные ионы с материалом матрикса  $[\text{M} + \text{лактоза} + \text{H}]^+$ , где М - молекула АА (рис. 3а, b), табл. Эти данные согласуются с результатами Nohi Husain et al., показавшими высокоаффинное связывание доксорубицина с олигосахаридами посредством невалентных связей [9].

### б) ТВЕРДОФАЗНЫЕ СМЕСИ АА С ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДАМИ.

В масс-спектрах PDMS твердофазных смесей фарморубицина с дезоксиинуклеозидами (dAdo, dThd, dGuo, dCyd) (dN) присутствуют интенсивные пики гетерокластерных ионов типа  $[\text{M} + \text{dN} + \text{H}]^+$  с dAdo,  $m/z$  795,0 (рис. 4а); dThd,  $m/z$  786,1 (рис. 4с) и  $[\text{M} + \text{dN} + n\text{Na} - (n-1)\text{H}]^+$ ,  $n=1,2$  с dGuo :  $[\text{M} + \text{dGuo} + \text{Na}]^+$ ,  $m/z$  833,4,  $[\text{M} + \text{dGuo} + 2\text{Na} - \text{H}]^+$ ,  $m/z$  855,5 (рис. 4b).

Многокомпонентная смесь дезоксиинуклеозидов (dAdo, dThd, dGuo) характеризуется интенсивным пиком гетерокластерного иона, соответствующего комплексу фарморубицина с dGuo:  $[\text{M} + \text{dGuo} + \text{H}]^+$ ,  $m/z$  811,7, а также  $[\text{M} + \text{dGuo} + \text{Na}]^+$ ,  $m/z$  833,4 (рис. 4 d). dCyd не образует гетерокластерных ионов с фарморубицином; более того, при добавлении dCyd к многокомпонентной смеси dAdo, dGuo, dThd не зарегистрированы пики гетерокластерных ионов  $[\text{M} + \text{dN} + \text{H}]^+$  (табл.).

В отличие от фарморубицина доксорубицин не образует гетерокластерных ионов с dAdo и dThd; dGuo входит в состав гетерокластерного квазимолекулярного иона  $[\text{M} + \text{dGuo} + \text{H}]^+$ ,  $m/z$  811,0, отмеченного как в двухкомпонентной смеси фарморубицин - dGuo (рис. 5а), так и в поликомпонентной смеси dAdo, dThd, dGuo (рис. 5b). Характерно, что если в смеси фарморубицин - dGuo не отмечен квазимолекулярный ион  $[\text{M} + \text{dGuo} + \text{H}]^+$ ,  $m/z$  811,7, а лишь

интенсивный пик иона  $[M + dGuo + Na]^+$ ,  $m/z$  833,4 (рис. 4b), то смеси доксорубина с dGuo наоборот присущ интенсивный пик иона  $[M + dGuo + H]^+$ ,  $m/z$  811,0, сопровождающийся малоинтенсивным пиком  $[M+dGuo + Na]^+$  (рис. 5a).

Распределение ионов для поликомпонентных смесей dAdo, dThd, dGuo с АА обратное: фарморубин в смеси указанного состава дает с dGuo интенсивный молекулярный ион  $[M + dGuo + H]^+$ ,  $m/z$  811,7; и менее интенсивный пик  $[M + dGuo + Na]^+$ ,  $m/z$  833,4; доксорубин-малоинтенсивный комплекс  $[M + dGuo + H]^+$ ,  $m/z$  8,110, сопровождаемый ярко выраженным пиком иона  $[M + dGuo + Na]^+$ ,  $m/z$  833,0 (рис. 5b). dCyd с доксорубином не дает кластерных ионов, также как и с фарморубином (таблица).

Приведенные различия в комплексообразовании АА с биомолекулами обусловлены, по-видимому, особенностями структуры твердофазных образцов, полученных посредством сокристаллизации компонентов.

### в) ТВЕРДОФАЗНЫЕ СМЕСИ АА С РИБОНУКЛЕОЗИДАМИ.

На рис. 6 представлены результаты исследования твердофазных смесей Guo и Cyd. Как фарморубин, так и доксорубин образуют гетерокластерные ионы с Guo  $[M + Guo + H]^+$ ,  $m/z$  827,8 и 827,6, соответственно (однако интенсивность пика гетерокластерного иона  $[M+Guo + H]^+$  несколько выше (рис. 6a), чем аналогичный показатель для доксорубина (рис. 6b).

Характерно, что цитидин (Cyd) не образующий гетерокластерных ионов с фарморубином при pH 7,0, дает указанные ионы с фарморубином при щелочных значениях pH (10,6) (рис. 6c). Доксорубин образует гетерокластерные ионы  $[M + Cyd + H]^+$ ,  $m/z$  787,9 несколько менее интенсивные, чем фарморубин в зоне щелочных значений pH, в слегка подкисленной среде (pH 6,7) (рис. 6d) (таблица).

### г) ТВЕРДОФАЗНЫЕ СМЕСИ АА С НУКЛЕИНОВЫМИ ОСНОВАНИЯМИ.

Несмотря на то, что dGuo и Guo образуют с АА гетерокластерные ионы  $[M + dGuo(Guo) + H]^+$ , азотистое основание гуанин (Gua) не дает аналогичных ионов с АА (таблица). Цитозин (Cyt) и его производные: iso-цитозин (iso-Cyt), 1метил-цитозин (1MeCyt) и 5метил-цитозин (5MeCyt), будучи сокристаллизованными с АА на золотую подложку в присутствии матрикса (лактоза) дают интенсивные пики гетерокластерных ионов практически одинаковой интенсивности:  $[M+Cyt+H]^+$ , где М - фарморубин, доксорубин (рис. 7 a,b). Интенсивность пиков гетерокластерных ионов фарморубина с iso-Cyt, 1Me-Cyt и 5Me-Cyt (рис. 7c, 8a, 8c) значительно превышает интенсивность соответствующих ионов, включающих доксорубин (рис. 7 d; рис. 8 b-d) (таблица). Кроме того, 5Me-Cyt с фарморубином образует кластеры более сложного состава, чем с доксорубином:  $[M + (5Me-Cyt)_n + H]^+$ , где  $n = 1, 2, 3$ .

В масс-спектре смеси фарморубина с аденином (Ade) зарегистрирован четкий пик, соответствующий гетерокластерному иону  $[M + Ade + H]^+$ ,  $m/z$  679,0 (рис. 9a), в тоже время в аналогичной системе, дополненной вместо фарморубина доксорубином ион  $[M + + Ade + H]^+$  отсутствует.

В трехкомпонентной смеси (Ade - Cyt - фарморубин) Cyt как более мощный комплексообразователь представлен единственным гетерокластерным ионом  $[M + Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  656,4 (рис. 9b).

### д) ТВЕРДОФАЗНЫЕ СМЕСИ АА С АМИНОКИСЛОТАМИ.

Исходя из экспериментально установленного факта влияния АА на структуру биомембран, в состав которых входят белки [1, 2], проведено изучение смесей фарморубицина и доксорубицина с аминокислотами. Показано, что в смесях АА - цистеин (Cys), аргинин (Arg), глицин (Gly), валин (Val), изолейцин (Ile), лейцин (Leu) гетерокластерные ионы отсутствуют. Комплексы как фарморубицина, так и доксорубицина отмечены для смеси АА с изомером Phe ( $\beta$ -амино -  $\beta$ -фенил пропионовая кислота (iso-Phe)  $[M + \text{iso-Phe} + H]^+$ ,  $m/z$  709,3;  $m/z$  709,5 (рис. 9 с,d). С Phe - компонентом клеточных белков АА не образуют гетерокластерных ионов (таблица).

Весьма дискуссионным представляется вопрос о месте образования гетерокластерных ионов: особенности механизма десорбции органических веществ в PDMS допускают два параллельно идущих процесса. Так, показано, что перевод в газовую фазу молекул органических веществ осуществляется как за счет характерного для MS FAB, SIMS, MALDI "термического" механизма ионизации [10,11,12], так и вследствие воздействия на образец механической ударной волны или импульса давления [13,14]. Принимая во внимание последнее, а также возможность образования молекулярных ассоциатов типа [АА+биомолекула-"мишень"], стабилизированных невалентными связями как в пересыщенных водных растворах, так и в твердофазных кристаллических образцах [15 - 18], авторы полагают, что в феномене образования гетерокластерных ионов указанного вида в PDMS наряду с газофазными процессами [19,20] протекает "мягкая" ионизация предсуществующих в твердофазных кристаллических образцах лабильных межмолекулярных образований-молекулярных кристаллов [21] [АА+биомолекула-"мишень"] в соответствии, например, с гипотезой, постулирующей образование в образцах так называемых предсуществующих ионов "preformed ions" [22,23], тем более, что в области физиологических значений рН (7) как АА, так и биомолекулы ионизованы и обладают зарядами, достаточными для образования ионов [24,25]. В пользу последнего механизма свидетельствует, в частности, явная зависимость качественных и количественных параметров пиков гетерокластерных ионов АА с биомолекулами от состава образца: если в работах, иллюстрирующих возникновение гетерокластерных ионов непосредственно в газовой фазе, отмечены пики широкого набора гомо- и гетерокластерных ионов биомолекул, включающих в различных сочетаниях все компоненты, присутствующие в образцах [19,20], в настоящем исследовании для многокомпонентных смесей, напротив, характерно явное преобладание в составе гетерокластерных ионов [АА+биомолекула-"мишень"] лишь одного вида биомолекул, сопровождающееся полным отсутствием аналогичных ионов, в состав которых входят другие биомолекулы, находящиеся в образце. В частности, для системы, включающей кроме АА дезоксирибонуклеозиды dAdo, dThd, dGuo, характерны только пики гетерокластерных ионов  $[AA+dGuo+H]^+$  (рис.4d,5b), а для системы АА + азотистые основания Ade и Cyt - пики ионов  $[AA+Cyt+H]^+$  (рис.9b). Это согласуется с данными Slifkin et al. [26] и Шеиной, Благого [27], показавшими спектроскопическими методами предпочтительное связывание отдельных азотистых оснований, в особенности Gua [26] с органическими веществами с образованием межмолекулярных комплексов, стабилизированных невалентными связями. Исходя из приведенного, представляется вполне допустимым предположение о том, что состав гетерокластерных ионов [АА+биомолекула] в газовой фазе достаточно адекватно отражает наличие взаимодействия между указанными компонентами в конденсированных фазах: так, явное преобладание в масс-спектрах поликомпонентных смесей дезоксирибонуклеозидов ионов

одного вида  $[AA+dGuo+H]^+$  коррелирует с неоднократно показанной повышенной способностью именно dGuo к образованию межмолекулярных комплексов на основе невалентных связей с органическими веществами различной химической природы [4,26,27,28].

Таким образом, данными исследованиями показано, что:

i) AA (фарморубин и доксорубин) образуют гетерокластерные ионы с биомолекулами (компонентами НК, углеводами, аминокислотами) типа  $[AA+биомолекула+nNa-(n-1)H]^+$ ,  $n = 1, 2$ ;

ii) наиболее интенсивные пики гетерокластерных ионов  $[AA+биомолекула+ H(Na_n)]^+$ ,  $n = 1, 2$  отмечены для систем, в состав которых входят производные гуанина (dGuo, Guo) и цитозина (Cyt, 1Me-Cyt, 5Me-Cyt, iso-Cyt). Это хорошо согласуется с данными Du Vernay et al., изучавших взаимодействие AA с ДНК и отметившими тенденцию к предпочтительному связыванию доксорубина с участками нуклеиновой кислоты, богатыми GC парами [4], а также Шеиной, Благого, показавшими повышенную способность Gua к образованию межмолекулярных комплексов в модельных смесях, включавших Gua и TCNQ [27]. В то же время нами не отмечено специфическое взаимодействие AA с гуанином (Gua) ;

iii) масс-спектрометрические данные коррелируют с противоопухолевой химиотерапевтической активностью AA: для фарморубина, более эффективного противоопухолевого препарата по сравнению с его стереохимическим изомером [29] доксорубином, присуще: а) образование гетерокластерных ионов типа [химиотерапевтический препарат - биомолекула "мишень"] с более обширным кругом исследуемых биомолекул (табл.) и б) более интенсивные пики, соответствующие гетерокластерным ионам, в состав которых входит фарморубин по сравнению с интенсивностями пиков аналогичных ионов, в состав которых входит доксорубин (рис. 6a,6b,7c,7d,8a, 8b,8c,8d). Как предположили авторы первое качественно отражает более низкую специфичность взаимодействия фарморубина с биомолекулами, второе - повышенную эффективность связывания с последними (в сравнении с доксорубином). Это вполне согласуется с фармакокинетическими данными о пониженном содержании фарморубина в плазме крови онкологических больных и меньшем периоде полужизни (30 часов vs 43 часа) по сравнению с доксорубином [29];

iv) PDMS подтверждена способность AA образовывать комплексы с углеводами [9] (лактоза), стабилизированные невалентными связями; кроме того, показано, что AA могут взаимодействовать с биомолекулами и их изомерами, обладающими замещенным ароматическим кольцом (iso-Phe);

v) возможность проведения методом PDMS различения стереоизомеров одного и того же вещества (на примере фарморубина и доксорубина) посредством определения количественных и качественных параметров гомо- и гетерокластерных ионов.

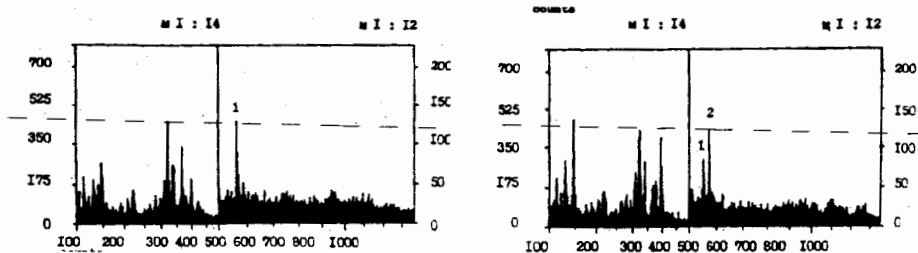
Анализ приведенных экспериментальных результатов позволяет предполагать, что одним из перспективных приложений масс-спектрометрии PDMS является экспресс-определение в сложных модельных (а в перспективе и биологических) смесях биомолекул клетки-возможных "мишеней" для химиотерапевтических противоопухолевых препаратов, в частности AA, посредством исследования качественных и количественных параметров гетерокластерных ионов типа:

[химиотерапевтический препарат + биомолекула-"мишень"], образующихся при взаимодействии осколков деления  $^{252}\text{Cf}$  с

твердофазными кристаллическими образцами и отражающих наличие межмолекулярных невалентных связей между компонентами последних.

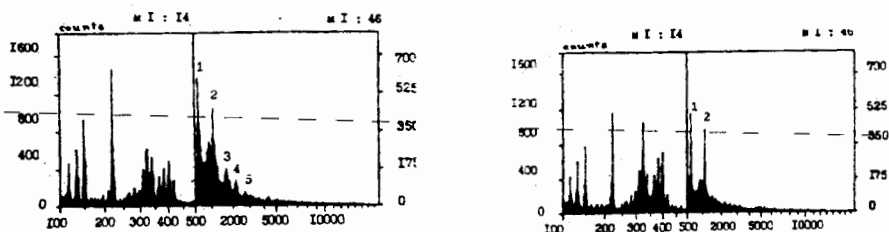
Таблица

Соединение(M <sup>1</sup> ), образующее гетероклас- терные ионы с АА	Фарморубицин (M <sup>2</sup> )		m/z	Доксорубицин (M <sup>2</sup> )		m/z
	Вид иона	Интен- сивн. пика		Вид иона	Ин- тенс. пика	
1. ЛАКТОЗА	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+++	886,0	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+++	886,2
2. dAdo	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	++	795,0	-	-	-
3. dThd	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	++	786,1	-	-	-
4. dGuo	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + Na] <sup>+</sup> [M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + 2Na - H] <sup>+</sup>	+++ ++	833,4 855,5	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup> [M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + Na] <sup>+</sup>	+++ +	811,0 833,2
5. dCyd	-	-	-	-	-	-
6. dGuo + dAdo + dThd	[M <sup>2</sup> + dGuo + H] <sup>+</sup> [M <sup>2</sup> + dGuo + Na] <sup>+</sup>	++ +	811,7 833,4	[M <sup>2</sup> + dGuo + H] <sup>+</sup> [M <sup>2</sup> + dGuo + Na] <sup>+</sup>	+ ++	811,0 833,0
7. dCyd + dAdo + dGuo + dThd	-	-	-	-	-	-
8. Guo	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+++	827,8	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	++	827,6
9. Cyd	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup> pH 10,6	+++	787,2	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup> pH 6,7	++	787,9
10. Gua	-	-	-	-	-	-
11. Ade	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+++	679,0	-	-	-
12. Cyt	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+++	656,2	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+++	656,2
13. Ade + Cyt	[M <sup>2</sup> + Cyt + H] <sup>+</sup>	+++	656,4	[M <sup>2</sup> + Cyt + H] <sup>+</sup>	++	656,4
14. 1MeCyt	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+++	669,2	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+++	669,0
15. 5MeCyt	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+++	669,4	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	++	669,2
16. iso-Cyt	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	++	656,4	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	++	656,2
17. Phe	-	-	-	-	-	-
18. iso-Phe	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+	709,3	[M <sup>1</sup> + M <sup>2</sup> + H] <sup>+</sup>	+	709,5



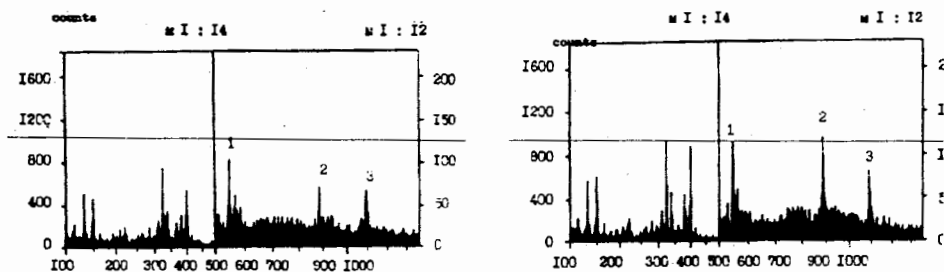
**Рис. 1. Масс-спектры PDMS антрациклиновых антибиотиков на золотой подложке:**

- а) фарморубицин:** 1 -  $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  566,4;  
 б) доксорубицин: 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,2,  
 2 -  $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  566,4.



**Рис. 2. Масс-спектры PDMS на нитроцеллюлозной (NC) матрице:**

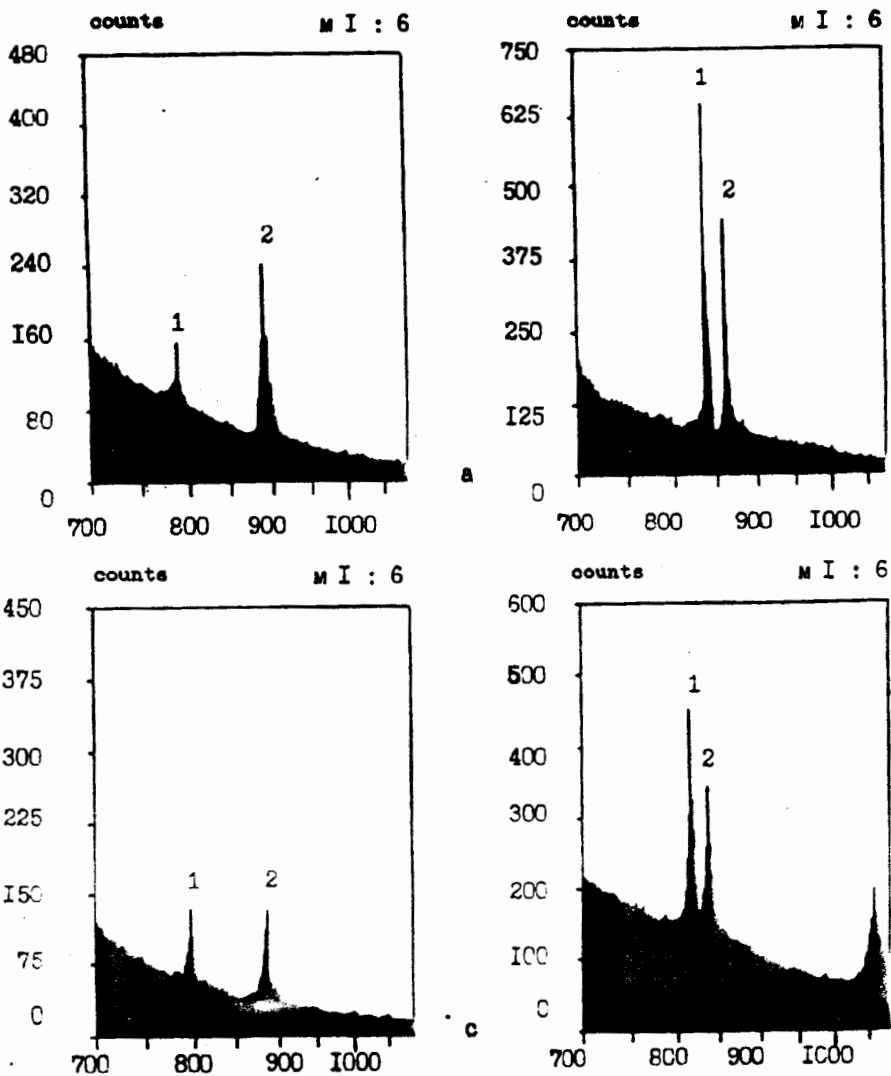
- а) фарморубицин:** 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,1,  
 2 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,1,  
 3 -  $[3M + H]^+$ ,  $m/z$  1630,0,  
 4 -  $[4M + H]^+$ ,  $m/z$  2172,9,  
 5 -  $[5M + H]^+$ ,  $m/z$  2715,0;  
 б) доксорубицин: 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,0,  
 2 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,9.



**Рис. 3. Масс-спектры PDMS в присутствии матрикса - лактозы (Lac):**

- а) фарморубицин:** 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,1,  
 2 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,2,  
 3 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,7;  
 б) доксорубицин: 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,1,  
 2 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,3,  
 3 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,2.





**Рис. 4. Масс-спектры PDMS смесей фарморубицина** c  
**дезоксинуклеозидами dAdo (a):** 1 -  $[M + dAdo + H]^+$ ,  $m/z$  795,0,  
 2 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,0,  
**dGuo (b):** 1 -  $[M + dGuo + Na]^+$ ,  $m/z$  833,4,  
 2 -  $[M + dGuo + 2Na - H]^+$ ,  $m/z$  855,5;  
**dThd (c):** 1 -  $[M + dThd + H]^+$ ,  $m/z$  786,1,  
 2 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,1;  
**dAdo, dThd, dGuo (d):**  
 1 -  $[M + dGuo + H]^+$ ,  $m/z$  811,7,  
 2 -  $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  833,4.  
**Матрикс (здесь и в последующих рисунках) - лактоза (Lac).**

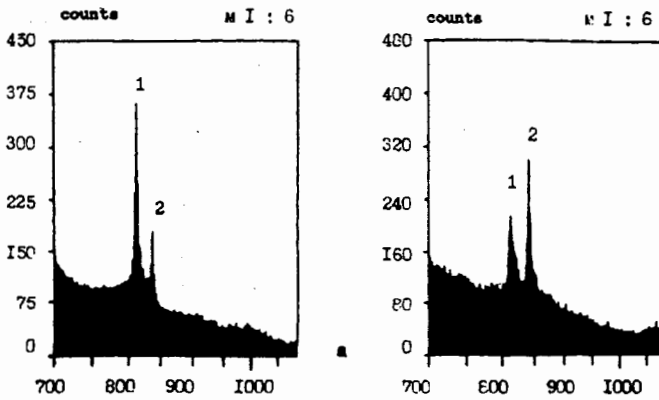


Рис. 5. Масс-спектры PDMS смесей доксорубицина с дезокси-нуклеозидами dGuo (a): 1 -  $[M + dGuo + H]^+$ ,  $m/z$  811,0, 2 -  $[M + dGuo + Na]^+$ ,  $m/z$  833,2; dAdo, dThd, dGuo (b): 1 -  $[M + dGuo + H]^+$ ,  $m/z$  811,0, 2 -  $[M + dGuo + Na]^+$ ,  $m/z$  833,0.

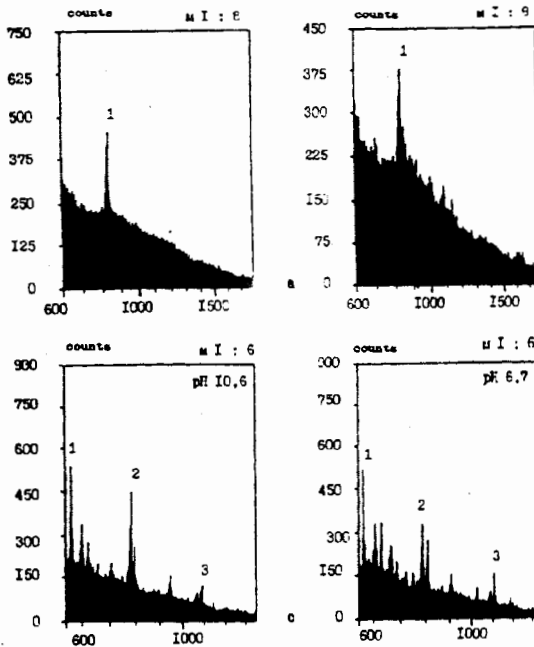


Рис. 6. Масс-спектры PDMS смесей фарморубицина с рибонуклеозидами Guo (a): 1 -  $[M + Guo + H]^+$ ,  $m/z$  827,8; Cyd (c): 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,3, 2 -  $[M + Cyd + H]^+$ ,  $m/z$  787,2, 3 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,8; и доксорубицина с рибонуклеозидами Guo (b): 1 -  $[M + Guo + H]^+$ ,  $m/z$  827,6; Cyd (d): 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,0, 2 -  $[M + Cyd + H]^+$ ,  $m/z$  787,9, 3 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,0.

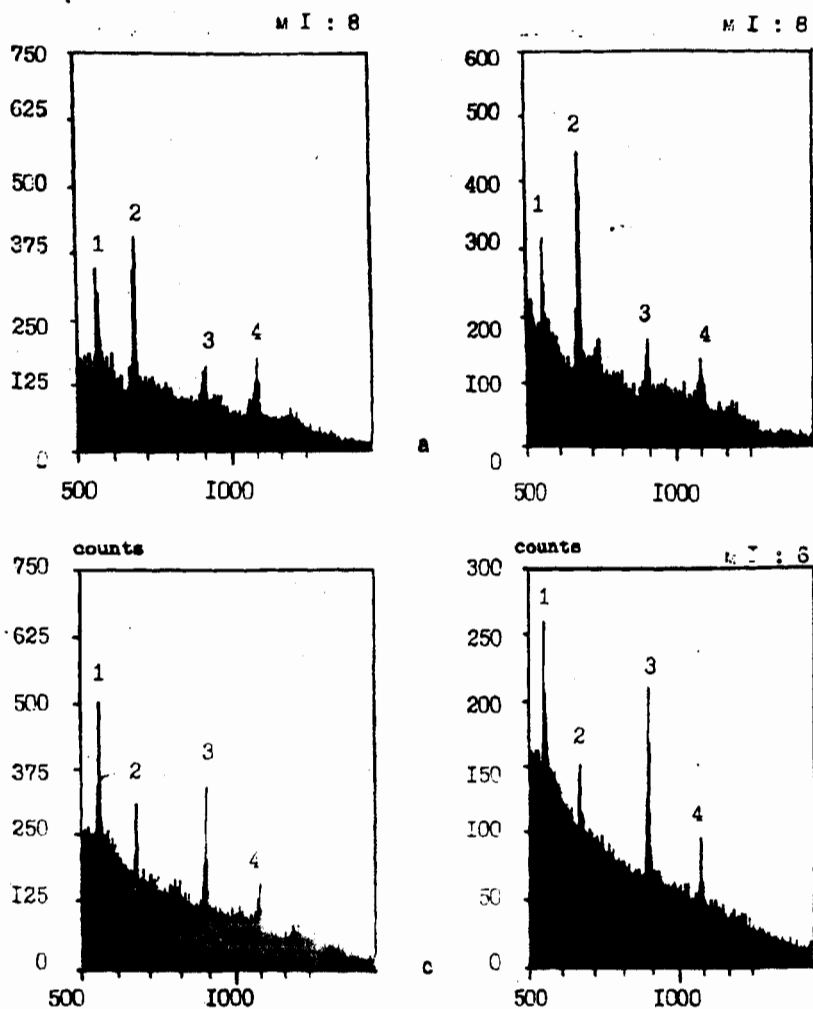


Рис. 7. Масс-спектры PDMS смесей фарморубина с азотистыми основаниями

1 Me - Cyt (a): 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,3;  
 2 -  $[M + Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  656,2; 3 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  
 $m/z$  886,4; 4 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,2;

iso-Cyt (c):

1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,4;  
 2 -  $[M + i-Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  656,4;  
 3 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,2;  
 4 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,3;

и доксорубина с азотистыми основаниями

1 Me - Cyt (b): 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,0;  
 2 -  $[M + Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  656,2; 3 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  
 $m/z$  886,0; 4 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,9;

iso-Cyt (d):

1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,0;  
 2 -  $[M + i-Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  656,2;  
 3 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,0;  
 4 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,0.

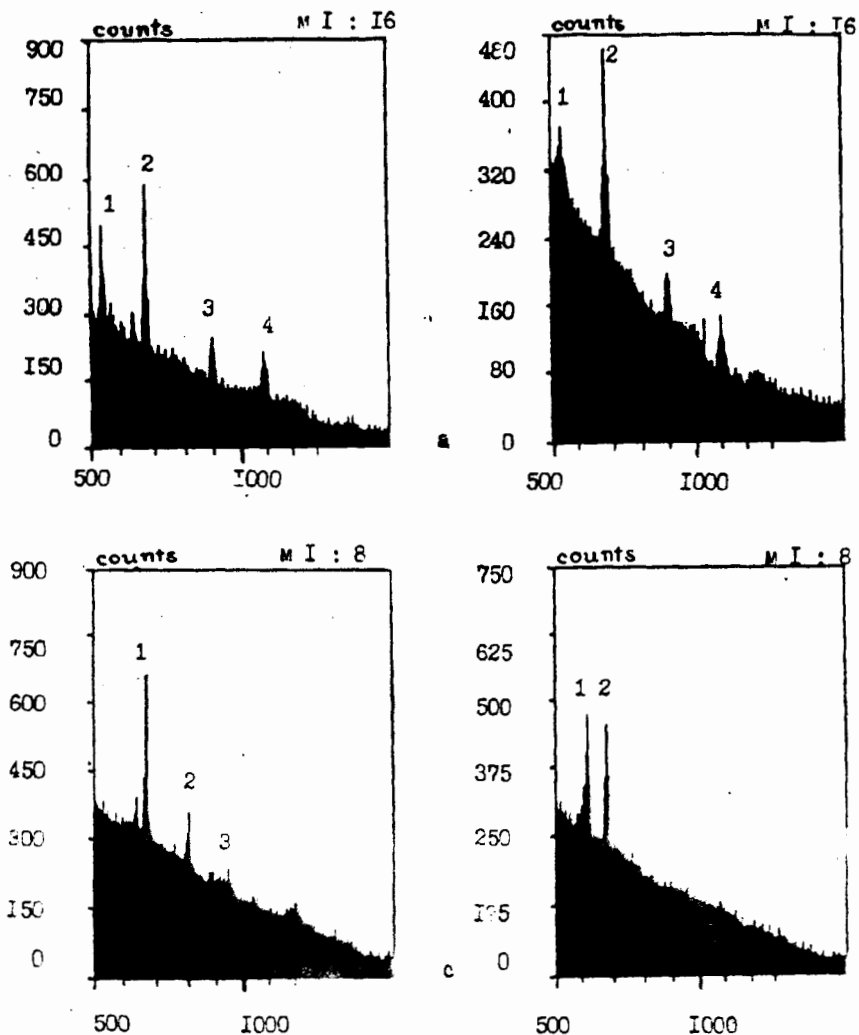


Рис. 8. Масс-спектры PDMS смесей фарморубицина с азотистыми основаниями

1 - Me-Cyt (a): 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,2,

2 -  $[M + 1Me-Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  669,2,

3 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,2,

4 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,5;

5 Me-Cyt (c): 1 -  $[M + 5Me-Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  669,4,

2 -  $[M + 2(5Me-Cyt) + H]^+$ ,  $m/z$  794,5,

3 -  $[M + 3(5Me-Cyt) + H]^+$ ,  $m/z$  918,3.

и доксорубицина с азотистыми основаниями 1Me-Cyt (b): 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,0,

2 -  $[M + 1Me-Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  669,0,

3 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,2,

4 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,9;

5 Me-Cyt (d): 1 -  $[M + 5Me-Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  669,2.

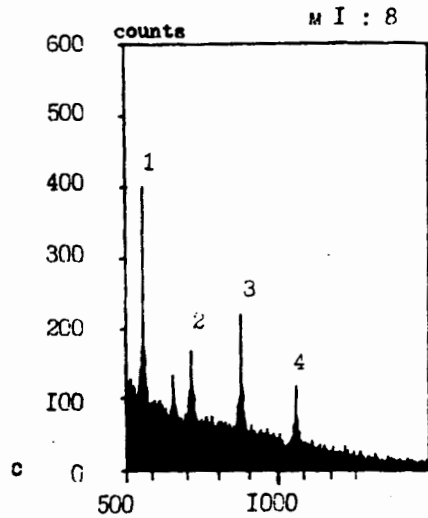
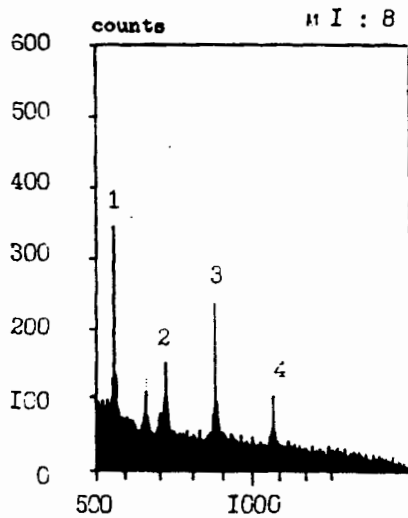
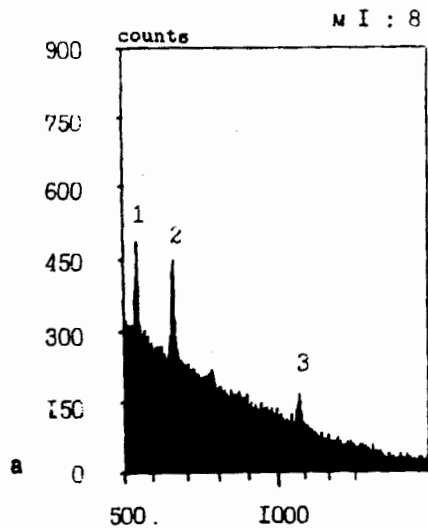
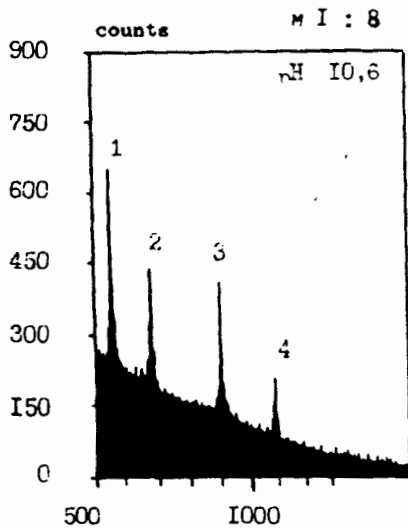


Рис. 9. Масс-спектры PDMS смесей фарморубицина с азотистыми основаниями

Ade (a): 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,3;  
 2 -  $[M + Ade + H]^+$ ,  $m/z$  679,0; 3 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  
 $m/z$  886,0; 4 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,0

Ade и Cyt (b): 1 -  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  544,3;  
 2 -  $[M + Cyt + H]^+$ ,  $m/z$  656,4;  
 3 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,3;

аминокислотой iso-Phe (c): 1 -  $[M + H]^+$ ,  
 $m/z$  544,0; 2 -  $[M + i-Phe + H]^+$ ,  $m/z$  709,3;  
 3 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,3;  
 4 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,2;

доксорубицина с iso-Phe (d): 1 -  $[M + H]^+$ ,  
 $m/z$  544,0; 2 -  $[M + i-Phe + H]^+$ ,  $m/z$  709,5;  
 3 -  $[M + Lac + H]^+$ ,  $m/z$  886,0;  
 4 -  $[2M + H]^+$ ,  $m/z$  1087,0.

## SUMMARY

Using mass spectrometry with fission particles of Cf-252 ionisation (PDMS-Cf) the crystalline mixtures of antitumor antibiotic drugs (AA) (farmorubicin, doxorubicin) with biomolecules (B) (deoxynucleosides, ribonucleosides, nitrogen bases of DNA) have been studied. The heteroions corresponding AA-B-complexes were found in the mass spectra.

It is suggested that the selectivity of the interaction between AA and B is the reason of the heteroions appearance.

Some aspects of the mechanism of the heteroions appearance and the possibility of using this phenomenon for express-determination intracellular bioreceptors are discussed.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаузе Г.Ф., Дудник Ю.В. Противоопухолевые антибиотики. М.: Медицина, 1987. - 176 с.
2. Anthracycline Antibiotics / Ed. H.S. El Khadem. - N.Y.: Acad. Press, 1982. - 285 p.
3. Молекулярные основы действия антибиотиков / Ред. Гаузе Г.Ф., М.: Мир, 1975. - 500 с.
4. Du Vernay V.H., Mong S., Crooke S.T. / In: Anthracyclines: Current States and Developments / Eds. S.T. Crooke and S.D. Reich, - N.Y.: Acad. Press, 1990. - 61 p.
5. Torgerson D.F., Skowronsky R.P., Macfarlane R.D. "New approach to the mass spectrometry of non-volatile compounds", Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974, 60, 2, p. 616-621.
6. Knysh A.N., Savin O.R., Loschinin M.V. et al. MSBX - A New Commercial Time-of-Flight Mass Spectrometer with Cf-252 Ion Source // Proc. V Intern. Conf. Chem. and Biol. Natural Products. Varna: 1989. - 2, p.370-372.
7. Jonsson G.R., Hedin A.B., Hakansson P.L. et. al. "Plasma desorbed mass spectrometry of peptides and proteins adsorbed on nitrocellulose", Anal. Chem. 1986, 58, 6, p. 1084 - 1087.
8. Пиментел Дж., Мак-Клелан О. Водородная связь. М.: Мир, 1964. - 464 с.
9. Nohi Husain, Thilivhali T.N., Dou, A. Munoz De La Pena, Isiah M. Warner. "Complexation of Doxorubicin with  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrins" Appl. Spectroscopy, 1992, 46, 4, p.652-658.
10. Vestal M.L. "Ionization techniques for nonvolatile molecules", Mass spectrom. Rev. 1983, 2, 4, p.447 - 480.
11. Johnson R.E. "Mechanisms for the desorption of large organic molecules", Int. J. Mass Spectr. Ion. Proc. 1987, 78, p.357 - 392.
12. Покровский В.А., Мосин В.В. "Бомбардировка быстрыми атомами в масс-спектрометрии - метод и его применение" Теор. и эксперим. химия. 1987, N 1, с.62 - 78.
13. Ens W., Sundqvist B.U.R., Hedin A., Hakansson P., Jonsson G. "Direction correlation ions in electronic sputtering of large organic molecules.", Phys. Rev. 1989. B 39, p.763- 765.
14. Bitensky I.S., Parilis E.S. "Shock wave mechanism for cluster emission and organic molecule desorption under heavy ion bombardment", Nucl. Instrum. and Method in Phys. Res. 1987, B 21, p.26 - 36.
15. Myerson A.S., Lo Pei Yi. "Cluster Formation and Diffusion in Supersaturated Binary and Ternary Amino Acid Solutions", J. Cryst. Growth., 1991, 110, 1-2, p.26-33.
16. Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry / Ed. Ts'o P.O.P., N.Y.: Acad. Press, vols. 1-2, 1974.
17. Shiea J., Sunner J. "The Acid Effect in Fast Atom Bombardment.", Org. Mass Spectrom., 1991, 26, 1, p.38-44.
18. Audet P., Simard G, Savoie R. "A vibrational spectroscopic study of the self-association of 5'-GMP in aqueous solution.", Biopolymers, 1991, 31, 2, p.243 - 251.
19. Веркин Б.И., Янсон И.К., Суходуб Л.Ф., Теплицкий А.Б. Взаимодействие биомолекул: новые экспериментальные подходы и методы. К.: Наукова думка. 1985. - 164 с.
20. Суходуб Л.Ф., Аксенов С.А. "Наблюдение межмолекулярных комплексов дезоксирибонуклеозидов в масс-спектрах с бомбардировкой быстрыми атомами", Докл. АН Украины, 1993, N2, с. 96 - 98.
21. Voet D., Rich A. "The crystal structures of purines, pyrimidines and their intermolecular complexes.", Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 1970, 10, p. 183 - 265.
22. Pachuta S.E., Cooks R.G. "Mechanisms in Molecular Sims" Chem. Rev. 1987, 87, p. 647 - 669.
23. Fenselay C., Cotter R.J. "Chemical aspects of Fast Atom Bombardment", Chem. Rev. 1987, 87, p.501 - 512.
24. Рейн Р. Исследование бимолекулярных взаимодействий. Зависимость структура - функция для нуклеиновых кислот с учетом взаимодействия их компонентов. В кн. Межмолекулярные взаимодействия: от двухатомных молекул до биополимеров. Ред. Б.Пюльман, М.: Мир, 1981, с. 414 - 489.
25. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. - 584 с.
26. Слифкин М. Взаимодействия с переносом заряда в пуринах и пиримидинах. В кн. Физико-химические свойства нуклеиновых кислот, М.: Мир, 1976, с.77-110.
27. Шейна Г.Г., Благоев Ю.П. Комплексы с переносом заряда азотистой оснований нуклеиновых кислот. Препринт ФТИНТ АН УССР, Харьков, 1976. - 24 с.
28. Суходуб Л.Ф., Чиванов В.Д., Гребеник Л.И., Бондаренко П.В., Зубарев Р.А., Кныш А.Н. "Наблюдение продуктов модификации дезоксирибонуклеозидов-5'-фосфата тиотрифеном с помощью

масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления калифорния-252",  
Биоорганическая химия, 1991, 17, 7, с.999-1001.  
29. Тратник Е. Фарморубин - общее представление о препарате // Тез.симп. "Достижения  
в антрациклиновой химиотерапии: фарморубин", М.,1985. - с.5-17.

*Поступила в редколлегию 4 февраля 1994 года.*

УДК 616.12-008.939.15-39:577.115-02:613.8

## **ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРЕССОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС**

*Давыдов В.В., Швец В.Н., Марченко О.Н.*

В настоящее время существуют убедительные данные об активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) при стрессе [1,2]. На их основании выдвинуто предположение об особой роли ПОЛ в патогенезе стрессорного повреждения внутренних органов [3,4].

Вместе с тем в литературе все еще отсутствуют систематизированные данные о возрастных особенностях стрессорной активации перекисного окисления липидов. Учитывая, что разработка этого вопроса открывает определенные перспективы в раскрытии механизмов снижения резистентности организма к действию повреждающих факторов при старении, целью настоящего исследования явилось изучение соотношения показателей ПОЛ в крови взрослых и старых крыс при стрессе.

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.** Работа выполнена на 48 крысах самцах линии Вистар. Использовались животные двух возрастов: молодые - 10 месяцев и старые - 22- 25 месяцев. Обе возрастные группы животных в свою очередь делились на 2 подгруппы: 1- интактные и 2- крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу, путем фиксации на спине в течение 30 минут.

Эффективность развития стресса контролировалась патоморфологически по изменению надпочечников и тимуса, а также на основании измерения в крови концентрации кортизола.

Животные декапитировались. Собиралась кровь, из которой на холоде немедленно выделялась сыворотка. Образцы сыворотки экстрагировались 10 объемами смеси, состоящей из равных объемов n-гептана и изо-пропанола [5]. Органический слой экстракта использовался для определения концентрации соединений, содержащих в своем составе сопряженные двойные связи [5], и шиффовых оснований [3], а также для измерения скорости образования ТБК(+)- реагирующих веществ (веществ реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) в условиях стимуляции индуцированного перекисного окисления липидов в среде инкубации [6].

Полученные данные подвергались статистической обработке по методу Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Проведенные исследования показали, что моделирование иммобилизационного стресса сопровождается увеличением концентрации промежуточных продуктов ПОЛ в крови исследуемых животных. Так содержание диеновых конъюгатов у взрослых крыс, подвергнутых стрессу, становится в 2 раза, а у старых - в 1,2 раза выше их величины у интактных животных соответствующих контрольных групп.