

УДК 577.3+543.51+612

Л. Ф. Суходуб

ВОЗМОЖНОСТИ МЯГКОИОНИЗАЦИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В обзоре собраны данные, демонстрирующие возможности мягкоионизационной масс-спектрометрии (МИ-МС) в молекулярно-биологических исследованиях по двум направлениям: термодинамическом и структурно-аналитическом.

Дано описание методики температурно-зависимой полевой масс-спектрометрии, с помощью которой впервые были поставлены эксперименты по измерению термодинамических характеристик ряда биологических ассоциатов: уотсон-криковские, «неправильные» и др. пары оснований, стопочные димеры оснований, комплексы «аминокислота—основание», гидраты оснований и их пар. Сделан анализ этих данных в сочетании с теорией. Показаны перспективы МИ-МС в изучении продуктов гидролиза (распада) лекарственных препаратов в физиологическом растворе и аддуктов их взаимодействия с ДНК.

Введение. Масс-спектрометрический метод исследования вещества, открытый в начале века Астоном, в настоящее время относится к разряду наиболее широко используемых аналитических методик. Его практическое применение началось с физики и химии с момента появления в 50-е годы первых промышленных образцов. Дальнейшее развитие метода позволило перейти к изучению медико-биологических и экологических объектов. В итоге в наши дни масс-спектрометрия (МС) становится неотъемлемым инструментальным методом как научно-производственных, так и академических лабораторий различного профиля. Подтверждением этому служат, например, данные о том, что в США на 1987 г. около 5000 ученых используют МС в качестве основного исследовательского инструмента и примерно 1500 из них принимают участие в ежегодных конференциях по МС и родственным направлениям, организуемых американским обществом по МС [1].

Методы мягкой ионизации в масс-спектрометрии. Разработка и внедрение мягкоионизационных (МИ) методик в МС вызвали настоящий взрыв аналитико-молекулярных исследований в биологических науках. Это обусловлено, прежде всего, возможностью проведения анализа ранее недоступных, труднолетучих, высокополярных и/или термо-

© Л. Ф. СУХОДУБ, 1991

лабильных молекул органического и биоорганического происхождения в диапазоне молекулярных масс до 20 000 и выше. Другой немаловажной причиной наблюдаемого процесса является внедрение методов компьютерной обработки МС-информации и представление ее в удобной для пользователя аналитической форме. Особенно эффективно использование МИ-МС применительно к медико-биологическим и фармакологическим смесям в сочетании с различными видами хроматографии. Ниже приведена краткая характеристика некоторых МИ-методов,

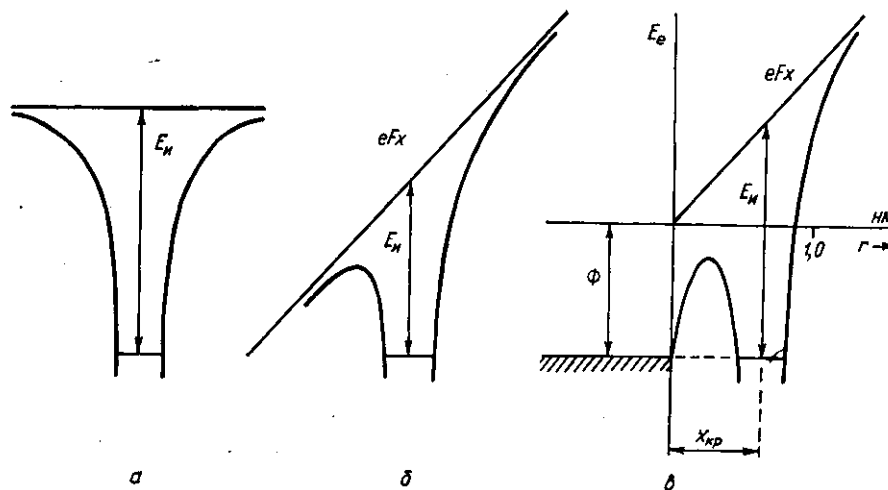


Рис. 1. Диаграмма потенциальной энергии электрона в атоме: *a* — в свободном пространстве ($F=0$); *b* — $F \neq 0$; *в* — вблизи металлической поверхности

развиваемых и используемых в лаборатории, руководимой автором, а также даны примеры их применения в молекулярно-биологических и биофизических исследованиях.

Полевая ионизация (ПИ) и полевая десорбция (ПД). Начало МС-ПИ было положено Мюллером и продолжено Беки и его учениками [2]. Параллельно в это же время с акцентом на теорию метода проводились работы киевской группой из Института физической химии АН УССР [3]. В основе метода ПИ лежит явление ионизации молекул в сильном ($F \sim 10^8$ В/см) электрическом поле по механизму туннельного эффекта. В отсутствие поля ($F=0$) валентный электрон молекулярной орбитали находится в потенциальной яме глубиной, равной энергии ионизации молекулы (E_n). При наложении электрического поля потенциальная яма деформируется, что приводит к возникновению барьера конечной ширины (рис. 1). Вблизи металлической поверхности эмиттера происходит дополнительная деформация барьера за счет действия сил изображения, благодаря чему вероятность туннелирования электрона из молекулы в металл становится еще выше. Характерной особенностью ПИ является наличие критического расстояния ионизации ($x_{кр}$) (см. рис. 1), оценка которого может быть произведена по приближенной формуле (2):

$$x_{кр} \simeq (E_n - \Phi)/F.$$

Для биологических молекул $E_n \simeq 10$ эВ, поэтому при $F \sim 10^8$ В/см, $\Phi = 5$ эВ, параметр $x_{кр} = 0,5$ нм. Время ионизации молекулы τ_n обычно оценивается по формуле [2]:

$$\tau_n \simeq 10^{-16} \exp\left(\frac{0,68E_n^{3/2}}{F}\right).$$

Разновидностью ПИ является методика ПД, для которой характерна конденсированная форма исследуемого вещества, нанесенного непосредственно на эмиттер (рис. 2).

Бомбардировка быстрыми ионами (ББИ) и атомами (ББА). В данных методах ионизация молекул осуществляется в результате бомбардировки поверхности образца пучком ускоренных (несколько кэВ) ионов или атомов (аргон, ксенон) (см. рис. 2). Предполагается [4], что в этих процессах первичная частица вызывает каскад соударений в небольшом объеме исследуемого вещества. Часть энергии первичных частиц расходуется на распыление поверхностных частиц в нейтральном и ионном состояниях. При бомбардировке образца нейтральными атомами вещество находится в жидкой матрице (глицерин), благодаря чему в поверхностном слое поддерживается определенный уровень концентрации исследуемых молекул за счет их диффузии из объема. Это дает возможность наблюдать стабильный масс-спектр в течение длительного времени.

Плазменная десорбция осколками деления ^{252}Cf . В основе данной методики лежит взаимодействие высокоэнергетичных осколков деления ^{252}Cf с исследуемым веществом. В результате за очень

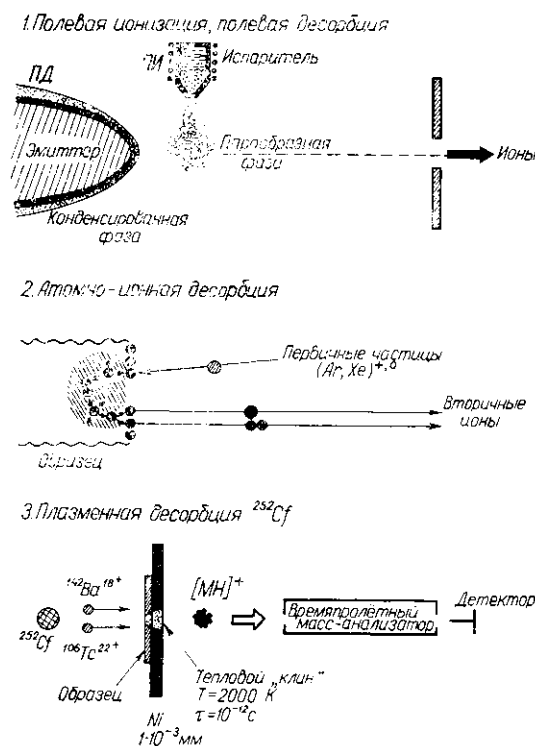


Рис. 2. Мягкоионизационные методы МС

короткое ($\sim 10^{-12}$ с) время происходит сильный разогрев микрообъема образца до 20 000 К, что позволяет регистрировать в масс-спектрах ионы, соответствующие высокомолекулярным полимерным структурам, например инсулину, без значительной фрагментации.

Результаты и обсуждение. Межмолекулярные взаимодействия. Взаимодействие молекул осуществляется с образованием как ковалентных связей, так и межмолекулярных комплексов (ассоциатов). В последнем случае имеют дело с невалентным (физическим, вандерваальсовым) взаимодействием, природа которого заключается в электромагнитных свойствах молекул. Это слабые взаимодействия, которые чрезвычайно важны для биологических систем. Достаточно отметить, что биологическое функционирование важнейших макромолекул клетки (ДНК, РНК, белки) зависит как от внутримолекулярных взаимодействий, так и от взаимодействий макромолекул с ион-гидратным окружением. Суммарная энергия межмолекулярного взаимодействия определяется балансом четырех составляющих сил (электростатической, поляризационной, дисперсионной и силой обменного отталкивания), благодаря которым между взаимодействующими молекулами устанавливается равновесное расстояние.

Анализ состояния теории межмолекулярных взаимодействий показывает, что квантовая химия способна так же успешно описывать вандерваальсовы комплексы, включая биологические, как и ковалентные [5].

Экспериментальное изучение межмолекулярных взаимодействий представляет огромную трудность. Для малых молекул, подобных мо-

лекуле H_2O , обычно используют методику упругого рассеяния молекулярных пучков, радио- и микроволновую спектроскопию [5]. Межмолекулярные биологические комплексы типа уотсон-криковских пар ДНК наблюдали в неполярных растворителях с помощью таких традиционных методов, как ИК-ЯМР-, ПМР-спектроскопии [6—10]. Однако из-за влияния растворителя, которое в ряде случаев значительно, данные о полученных энтальпиях (ΔH_{ac}) и константах ассоциации (K_{ac}) образующихся комплексов следует рассматривать как полуколичественные оценки [8].

Экспериментальное взаимодействие молекул в вакууме стало возможным в результате разработки и апробации на ряде систем методики

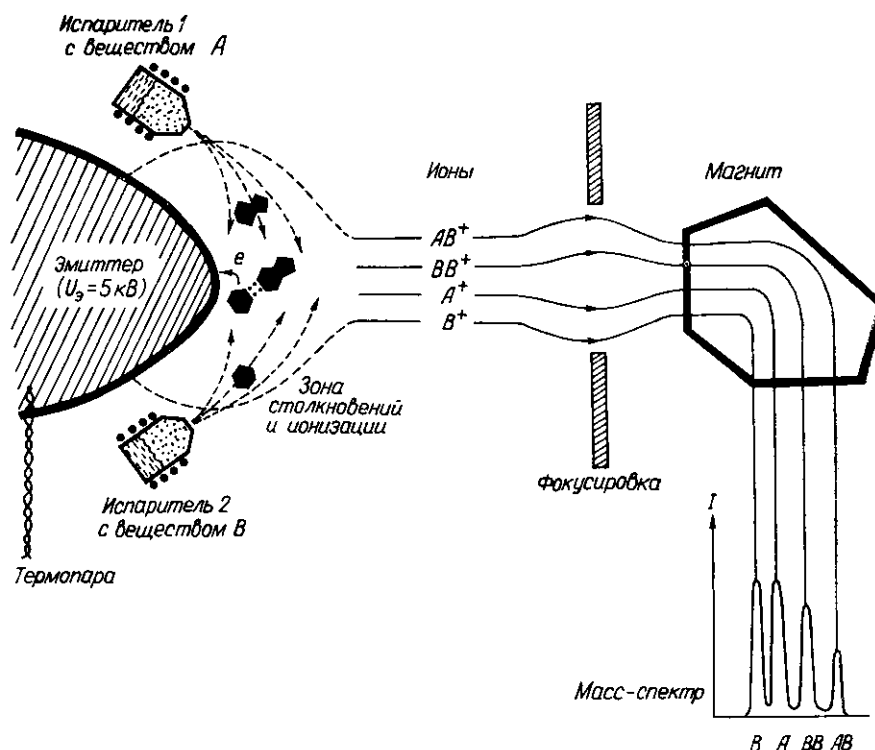


Рис. 3. Методика ТЗ-ПМС для изучения межмолекулярных взаимодействий в вакууме

температурно-зависимой полевой МС (ТЗ-ПМС) [9, 10]. Данная методика основана на МС с полевой ионизацией (рис. 3). Необходимая напряженность электрического поля создается с помощью игольчатого вольфрамового или платинового эмиттера с радиусом вершины $r, \sim 10^2 - 10^3$ нм, на который подается потенциал до 5 кВ. Исследуемые молекулы, например основания ДНК, поступают в зону ионизации (вершина эмиттера) из двух стеклянных испарителей. Благодаря эффекту полевой конденсации [11, 12] плотность исследуемых молекул вблизи вершины эмиттера на несколько порядков выше таковой в испарителе. В результате становятся заметными столкновения молекул друг с другом, приводящие к образованию межмолекулярных комплексов. Часть исходных молекул и ассоциатов ионизируется и мгновенно выталкивается из зоны столкновений. Меняя температуру в зоне столкновений молекул, можно измерить термодинамические величины (K_{ac} , ΔH_{ac}), характеризующие энергетику наблюдаемых в вакууме ассоциатов в условиях термодинамического равновесия [11, 12].

Внутримолекулярные взаимодействия в ДНК. Рассматривая внутримолекулярные взаимодействия в ДНК — материальном носителе генетической информации в живых организмах, — выделяют компланарные (горизонтальные) и стопочные (вертикальные) взаимодействия

между нуклеотидными основаниями. Вопрос об относительном вкладе этих двух типов взаимодействий в суммарный баланс сил ДНК является принципиальным.

А. Горизонтальные взаимодействия. Исследования проводили на специальных механических смесях — 9-метиладенин+1-метилтимин (m^9A+m^1T), 9-метилгуанин+1-метилцитозин (m^9G+m^1C), включающих метилпроизводные оснований, при взаимодействии которых образуются ассоциаты (димеры), в том числе в точности соответствующие уотсон-криковским парам ДНК (см. рис. 3). Поскольку интенсивность пика в масс-спектре пропорциональна концентрации соответствующей компоненты в зоне реакции, то из соотношения интенсивностей димерных пиков к мономерным легко получить величину K_{ac} , температурный ход которой характеризует энтальпию реакции [11, 12]. В табл. 1 собраны величины измеренных ΔH_{ac} .

Таблица 1
Энергетика димеров оснований нуклеиновых кислот (кДж/моль)

Димеры	$-\Delta H$ (опыт)	$-E$ (теория)		Димеры	$-\Delta H$ (опыт)	$-E$ (теория)	
		[5]	[15]			[5]	[15]
Компланарные				Стопочные			
$m^9A \cdot m^1U$	60,7	—	49,8	U/U	23,0	—	32,2
$m^9A \cdot m^1T$	54,4	77,9	—	$m^{1,3}U/m^{1,3}U$	36,4	—	—
$m^9G \cdot m^1C$	87,9	126,5	106,7	T/T	30,1	—	29,7
$m^1U \cdot m^1U$	39,7	—	40,6	$m^{1,3}T/m^{1,3}T$	43,5	—	—
$m^1T \cdot m^1T$	37,8	67,1	—	C/C	32,2	—	51,1
$m^1C \cdot m^1C$	73,3	99,7	73,2	$m^{1,4,4}C/m^{1,4,4}C$	52,2	—	—
$m^9G \cdot m^1U$	59,4	—	56,0	A/A	18,0	—	32,2
$m^9A \cdot m^1C$	56,5	—	57,8	$m^{6,6,9}A/m^{6,6,9}A$	38,1	—	—
$m_3^{2,2,9}G \cdot m^1C$	68,6	—	57,8	Coff/Coff	49,8	—	—
$m_3^{2,2,9}t^6G \cdot m^1C$	57,3	—	—				

Б. Вертикальные взаимодействия. В табл. 1 приведены также величины «вакуумных» энтальпий стопочных димеров оснований и их метилпроизводных, найденные с помощью ТЗ-ПМС [11, 12].

Анализ полученных данных показывает, что уотсон-криковские пары образуются с заметно бóльшим энергетическим выигрышем по сравнению с димерами соответствующих гомоассоциатов. Вакуумные энтальпии находятся в хорошем количественном согласии с современными теоретическими расчетами [5, 15]. Из сравнения горизонтальных и вертикальных взаимодействий в модельных системах можно предположить, что последние вносят меньший вклад в суммарный баланс сил ДНК. В табл. 1 приведены также измеренные энтальпии для так называемых «неправильных» пар ($m^9G \cdot m^1U$, $m^9A \cdot m^1C$, $m^{2,2,9}t^6G \cdot m^1C$), которые сравнительно редко встречаются в структуре нуклеиновых кислот, однако, тем не менее, имеют важное функциональное значение [16]. Так, подобное спаривание оснований может встречаться при встраивании в двойную спираль ДНК модифицированных оснований, например, 6-тиогуанина, который используется в химиотерапии. Построенные на основе атомного моделирования структуры «неправильных» пар показывают, что в случае пар $m^9G \cdot m^1U$, $m^9A \cdot m^1C$ спаривание осуществляется с помощью двух водородных связей между основаниями в обычной таутомерной форме, а в случае пар, содержащих производные m^9G и m^1C , — с помощью двух водородных связей, соединяющих молекулу m^1C с енольным таутомером m^3G [16]. Предположение о том, что основание G в реакционной зоне находится в двух таутомерных формах, основано на результатах ИК-спектроскопических исследований матрично изолированных метилпроизводных оснований: m^1U , m^1C , m^9A , m^9G [17]. Из этих данных следует, что для всех оснований, кроме m^9G в матричном окружении, содержатся только так

называемые «биологические» таутомерные формы. Для m^9G в инертной (Ar или N_2) газовой матрице обычный «оксо» таутомер находится приблизительно в соотношении 1 : 1 с редким «гидрокси» таутомером [17]. Следует отметить удовлетворительное согласие вакуумных энтальпий с предсказаниями теории [18]. В заключение отметим, что *wobble*-пара $G \cdot U$ и пара $A \cdot C$ сравнимы по стабильности с уотсон-крикковской парой $A \cdot U$. Замена кислорода на атом серы в молекуле m^9G заметно ($\sim 17\%$) понижает стабильность пары $G \cdot C$, что может вызвать локальное уменьшение внутримолекулярных взаимодействий в ДНК, поскольку при подобном замещении стоиочные взаимодействия, вероятнее всего, останутся неизменными.

В табл. 2 содержатся предварительные результаты, полученные методом ТЗ-ПМС, касающиеся энергетики образования комплексов

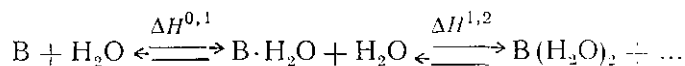
Таблица 2
Энтальпии образования (ΔH) и энергии (E) комплексов с акриламидом (A) в вакууме (кДж/моль)

Комплекс	$-\Delta H$	$-E$
$m^2U \cdot A$	$40,6 \pm 4,2$	42,2
$m^{1,3}T \cdot A$	$28,5 \pm 2,5$	27,6

в системе «аминокислота—основание» [19]. В экспериментах исследовали механические смеси, состоящие из метилпроизводных оснований (m^1U и $m^{1,3}T$) и акриламида, моделирующего узнающие группы атомов аминокислот глутамина и аспарагина. Найденные величины ΔH количественно хорошо согласуются с результатами теории (см. табл. 2). Они могут быть использованы для оценки вероятности узнавания боковыми группами аминокислот глутамина и аспарагина атомных групп

тимина и урацила в случае одно- и двутяжевого состояния НК [19].

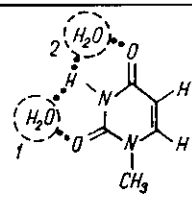
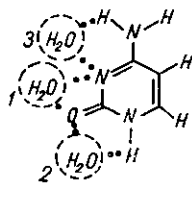
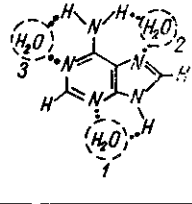
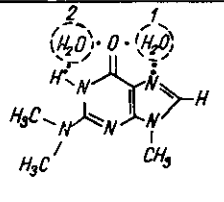
Гидратация нуклеотидных оснований и уотсон-крикковских пар. Известно, что гидратация биополимеров играет существенную роль в балансе сил, определяющих их функциональные конформации [14]. Достаточно отметить, что изменение содержания воды в полинуклеотидных нитях является причиной конформационного перехода в двойной спирали [27]. Однако до недавнего времени наши знания о гидратационных свойствах структурных составляющих биополимеров, в частности азотистых оснований, ограничивались квантовохимическими и атомно-атомными расчетами. Методика ТЗ-ПМС оказалась весьма информативной при изучении энергетики гидратации как изолированных молекул, так и их ассоциатов [14, 25]. В экспериментах по гидратации молекулы воды и метилпроизводные оснований поступали к игольчатому эмиттеру из двух испарителей, имеющих разные температуры. В специальных опытах было установлено, что механизм образования гидратных ассоциатов имеет ступенчатый характер



(B -молекулы оснований).

Из температурных зависимостей гидратных масс-спектров в координатах $\ln K_{\text{с}}^{B \cdot H_2O} - 1/T$ вычисляли величины энтальпий образования гидратных комплексов [14]. Анализ полученных данных и результатов теории [20—22] привел к построению структурно-энергетических схем гидратации (табл. 3), характеризующих взаимодействие ближайших молекул воды с полярными атомными группами оснований. Из приведенных схем следует, что урацил, тимин имеют два сильных центра связывания (присоединение третьей молекулы воды к дигидрату $B \cdot (H_2O) \cdot (H_2O)$ происходит с заметно меньшим энергетическим выигрышем (см. табл. 3)), цитозин и аденин — по три центра, а гуанин характеризуется максимальной энтальпией моногидратации (см. табл. 3). Вопрос о количестве центров сильного связывания гуанина экспериментально до конца не выяснен. Тем не менее, уже из имеющихся данных следует вывод о том, что взаимодействие молекул воды с гидрофильными атомами оснований G и C заметно выше по сравнению с анало-

Таблица 3

Основание	Гидрат			Схема гидратации
	$B \cdot H_2O$	$B \cdot (H_2O)_2$	$B \cdot (H_2O)_3$	
m^1U	46,9	37,7	—	
$m_2^{1,3}U$	54,0	45,2	25,5	
m_1T	43,5	39,8	—	
$m_2^{1,3}T$	36,4	42,7	—	
$et_2^{1,3}T$	45,2	43,1	—	
m^1C	47,7	36,0	—	
m^4C	44,8	44,0	—	
m^5C	48,6	43,1	—	
$m_2^{1,4}C$	50,7	37,7	—	
$m_3^{1,4,4}C$	49,4	29,3	—	
m^7A	46,5	—	—	
m^9A	44,4	32,4	30,1	
$m_2^{5,6}A$	42,3	—	—	
$m_3^{6,6,9}A$	34,7	28,0	24,7	
$m_2^{6,9}A$	38,5	29,5	25,1	
$m_3^{2,2,9}G$	59,0	35,2	—	

гичными взаимодействиями в случае А и Т(У), что согласуется с теорией [20—22, 27].

Наблюдение гидратных комплексов оснований с большим количеством молекул воды ($n_{H_2O} > 3$) стало возможным благодаря разработке низкотемпературного полевого источника ионов [23]. В результате были зарегистрированы гидратные ионы, соответствующие кластерам, включающим до десяти молекул воды вокруг оснований [24]. Из анализа зависимостей «интенсивность гидратного иона — число молекул воды» следует, что среди пиримидиновых оснований гидратная оболочка цитозина из 10 молекул воды характеризуется повышенной стабильностью [14, 24]. Разработка масс-спектрометрической низкотемпературной методики позволила подойти к исследованию гидратации более сложных биологических объектов в вакууме, например, комплементарной пары А·У [25]. С понижением температуры эмиттера до 170 К в полевого масс-спектре механической смеси ($m^9A + m^1U + H_2O$) устойчиво регистрируется ряд пиков, соответствующих кластерам $m^9A \times m^1U(H_2O)_n$, где $n = 1-7$ [25]. Отличительной особенностью низкотемпературных гидратных полевых масс-спектров является характерное

распределение интенсивностей ионов-ассоциатов с различными n [24]. В случае полигидратов $m^1U(H_2O)_n$, $m^9A(H_2O)_n$ и $m^9A \cdot m^1U(N_2O)_n$ (наблюдаемых в одном и том же эксперименте) в распределениях интенсивностей наблюдаются максимумы при $n=2,4(m^1U)$, $2,5(m^9A)$ и $4(m^9A \cdot m^1U)$ (рис. 4). По-видимому, наблюдаемая особенность в случае m^1U для $n=4$ связана с возникновением кольцевой гидратной структуры, стабилизированной цепочкой водородных связей с участием двух CO -групп m^1U . Подобная структура водного мостика может образоваться вокруг молекулы m^9A с участием 4 молекул воды и атомов азота $N(3)$, $N(6)$. Максимум при $n=5$ свидетельствует о том, что

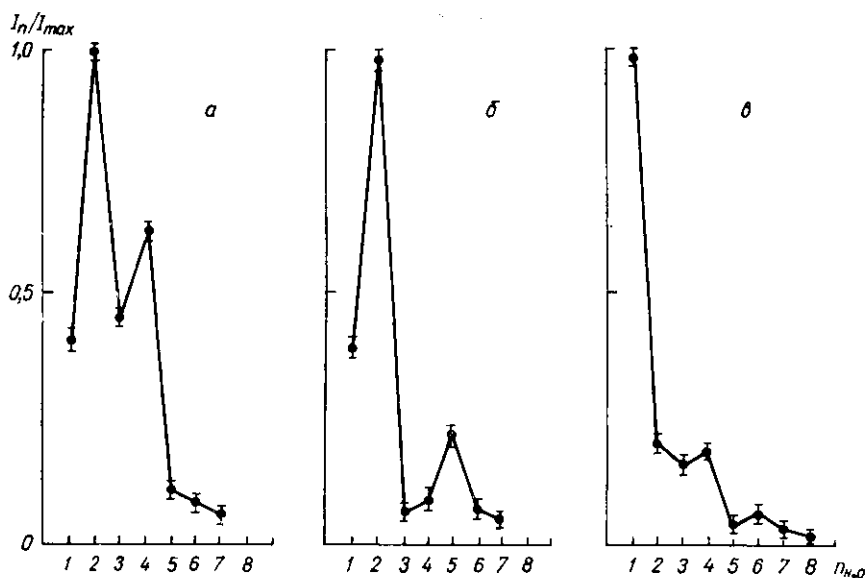


Рис. 4. Распределение интенсивностей пиков гидратного масс-спектра, соответствующих кластерам оснований $U(H_2O)_n$ (а), $A(H_2O)_n$ (б), $A \cdot U(H_2O)_n$ (в) в зависимости от числа молекул воды в кластере. Температура эмиттера $T_s=70$ К

водный мостик образован 2, 3, 4 и 5-й молекулами воды, тогда как первая молекула воды, вероятнее всего, локализована между аминогруппой NH_2 и атомом $N(7)$ [20, 22]. Для пары $m^9A \cdot m^1U$ подобная гидратная структура наблюдается при $n=4$, причем в ее образовании, по-видимому, принимают участие атомы обоих оснований, что отражается на усилении ее стабильности [26]. В связи с полученными данными представляют большой интерес результаты недавней работы [27], в которой методом Монте-Карло моделировали гидратацию гидрофильных центров оснований и комплементарных пар в кластере из 25 молекул воды. Авторы [27] показали, что для гидратных оболочек пар $A \cdot U$ и $G \cdot C$ характерно образование мостиковых связей как между отдельными молекулами воды и гидрофильными атомами оснований, так и между молекулами воды, образуя двух- и трехчленные водные мостики, связывающие полярные атомы двух молекул оснований. Отмечается, что подобные мостиковые структуры усиливают стабильность пар оснований в двухспиральных полинуклеотидах [27].

В заключение отметим, что ценность приведенных данных, полученных с помощью нового экспериментального подхода, значительно возрастает при их дополнении современными теоретическими расчетами, подобными проводимым в [27, 28], с учетом особенностей МС-эксперимента.

Стабильность и взаимодействие лекарственных препаратов с ДНК и ее компонентами. *Фопурин*. При полевой ионизации молекулярный ион M^+ приобретает небольшую избыточную энергию. Это означает, что последующая фрагментация M^+ , вероятнее всего, будет связана с разрывом наиболее лабильных

межатомных связей. В этом случае по виду полевого масс-спектра можно предсказывать пути превращения материнских молекул в ходе участия их в биохимических реакциях. Это предположение было апробировано при изучении противоопухолевого алкилирующего препарата — фопурина [29]. Масс-спектры получали с помощью магнитного прибора модели МИ-1201, снабженного лабораторным источником ионов с игольчатым вольфрамовым эмиттером.

Анализ спектров показал, что пик с m/z 192 структурно полностью соответствует пуриновой части фопурина. Пики с m/z 206, 218 возникли при разрыве N—P-связи с последующим присоединением атомом N(6)

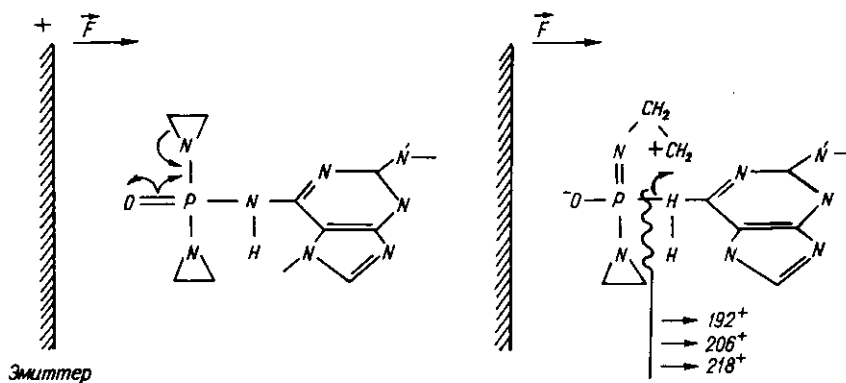


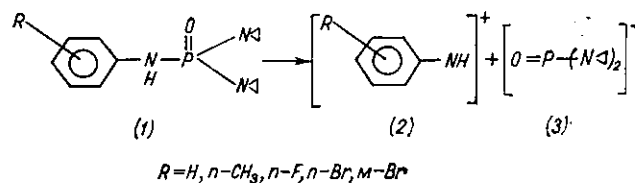
Рис. 5. Предполагаемая схема фрагментации фопурина в электрическом поле (F) с образованием ионов 192^+ , 206^+ , 218^+

групп CH_3 , C_2H_3 соответственно. Этим реакциям, очевидно, предшествует раскрытие одного из этилениминных циклов N \triangleleft вследствие дополнительной поляризации C=O-группы в электрическом поле (рис. 5).

Сопоставляя результаты опытов по фрагментации фопурина с такими, проведенными на клеточных структурах и выявившими один из метаболитов со структурой 2-диметиламино-6-амино-7-метилпурина [30], можно заметить, что обнаруженный в клетке метаболит в точности соответствует наиболее интенсивному пику полевого масс-спектра с m/z 192 [29]. Приведенные данные наталкивают на мысль о направленном поиске метаболитов лекарственных препаратов *in vivo*, предсказываемых полевой фрагментацией их молекулярных ионов. Справедливость этого предположения, мы надеемся, подтвердится в дополнительных исследованиях ряда родственных препаратов с этилениминными группами, которые проводятся в настоящее время в нашей лаборатории.

Арил- и ацилдиэтилентриамиды фосфорной кислоты. Возможности МС-ПД и электронного удара (ЭУ) в идентификации и структурных исследованиях противоопухолевых алкилирующих препаратов были продемонстрированы на примере арил- и ацилдиэтилентриамидов фосфорной кислоты [31, 32].

А. Замененные производные N-фенил-N', N', N'', N''-диэтилентриамида фосфорной кислоты. Масс-спектры ряда лекарственных соединений (схема 1)



получали с помощью двух режимов ионизации: ПД и ЭУ (прибор «VARIAN MAT-711»). Анализ этих данных показал: масс-спектры ЭУ

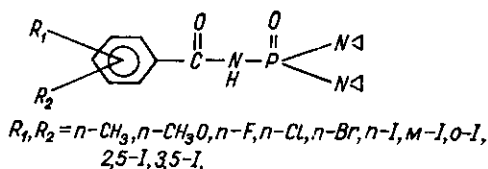
характеризуются значительным распадом молекулярных ионов M^+ ; масс-спектры, полученные в режиме ПД, содержат, как правило, только пики M^+ ; для всех соединений, имеющих заместители в *para*-положении, схема фрагментации качественно одна и та же: максимальную интенсивность имеют ионы M^+ , за исключением соединения с $R=m\text{-Br}$, для которого максимальным пиком в масс-спектре является ион $(M-N\triangle)^+$.

Перечисленные особенности указывают на относительно высокую устойчивость данных соединений к ЭУ, что согласуется с их незначительным гидролизом в водных растворах при pH 8 [33].

Следует отметить, что МС-результаты по фрагментации коррелируют с рентгеноструктурными исследованиями фенидата, согласно которым длина связи N—P меньше таковой между атомом фосфора и этилениминными атомами азота N' и N'' [34].

Согласно квантовохимическим расчетам подобных молекул [35], на атоме азота, связанном с фосфором, сосредоточена повышенная электронная плотность. Один из возможных механизмов ионизации может быть связан с уходом электрона с атома азота с последующим разрывом P—N-связи. При этом положительный заряд должен локализоваться преимущественно на атоме N. В результате интенсивность фрагментных ионов (см. схему 1) (2) по сравнению с комлементарными ионами (3) должна быть выше, что и наблюдается в эксперименте [31].

Б. N-бензол- N' , N' , N'' , N'' -диэтилентриамиды фосфорной кислоты. Масс-спектры ПД и ЭУ ряда препаратов (схема 2),



полученные с помощью прибора «VARIAN MAT-711», имеют следующие характеристики: низкие интенсивности молекулярных ионов M^+ ; качественное совпадение для большинства соединений основных путей фрагментации; различие в интенсивностях фрагментных ионов в зависимости от типа заместителей в бензольном кольце; зависимость путей фрагментации от положения заместителя в кольце. Основными направлениями фрагментации исследуемых соединений являются: а) отщепление этилениминных циклов с образованием ионов $(M-42)^+$, $(M-84-H)^+$, $(N\triangle)^+$; б) разрыв C—N-связи с образованием фрагмента с m/z 174 и ионов $[RC_6H_4CO]^+$; в) разрыв $RC_6H_4\text{—C}$ -связи с образованием ионов с m/z 174 и $[RC_6H_4]^+$; г) появление малоинтенсивного иона $[O=P=(N\triangle)_2]^+$ с m/z 131; д) элиминирование заместителя в *ortho*-положении (*ortho*-эффект).

Сравнение обсуждаемых данных с результатами для арилдиэтилентриамидов показывает, что последние характеризуются повышенной устойчивостью к ЭУ по сравнению с ацилдиэтилентриамидами.

Отметим, что во всех ПД масс-спектрах присутствуют интенсивные молекулярные ионы (100%), причем для *para*- и *meta*-изомеров фрагментация практически отсутствует, а для *ortho*-изомера с йодом (I), так же как и в случае ЭУ, характерен отрыв заместителя с образованием иона $(M-I)^+$ (16%) [32].

В случае дийодзамещенных соединений обнаружено, что пути фрагментации молекулы с $R=2, 5\text{-I}$ (применяющийся в клинике препарат) существенно отличаются от молекулы с $R=3, 5\text{-I}$: максимальную интенсивность в масс-спектре ЭУ молекулы с $R=2, 5\text{-I}$ имеет ион с m/z 376 $(M-I)^+$, тогда как в сравниваемом изомере с $R=3, 5\text{-I}$ молекулярный ион является недетектируемым, а максимальную интенсивность имеет ион с m/z 355, образовавшийся при разрыве C—N-связи. Для данной группы соединений, легко фрагментируемых при вза-

имодействии с ионизирующими электронами, метод ПД весьма полезен для их идентификации: в случае 3, 5- и 2, 5-дигидробензотэфа в масс-спектрах надежно регистрируются молекулярные и квазимолекулярные ионы M^+ и MN^+ соответственно.

Триэтилтиофосфамид (тиоТЭФ). Противоопухолевый препарат тиоТЭФ в клинической онкологии используется около 30 лет. Однако его стабильность и механизмы превращения в водно-солевых растворах до недавнего времени оставались практически неизученными. Литературные данные, касающиеся данного вопроса, немногочисленны и противоречивы. В связи с этим нами выполнена серия работ [36—39] по изучению стабильности тиоТЭФ в физиологических растворах, которую можно рассматривать как первый шаг в последовательном рассмотрении проблемы механизмов взаимодействия данного препарата с ДНК и ее компонентами (см. ниже). Основным инструментальным методом в отмеченной серии работ является МС с полевой ионизацией.

Гидролиз тиоТЭФ в водно-солевых растворах осуществляли при 37 °С и различных значениях рН. Разделение продуктов гидролиза проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) [37—39]. Сорбенты, снятые с пластин, экстрагировали метанолом и после вакуумной сушки получали образцы, пригодные для МС-анализа в режиме ПИ. Содержание этиленминных групп (ЭИГ) в растворе определяли методом потенциометрического титрования, основанного на реакции взаимодействия ЭИГ с тиосульфатом натрия [36].

Проведенные исследования показали, что а) стабильность тиоТЭФ в водных растворах с концентрацией, обычно используемой на практике (~1 мг/мл), сравнительно высока: в течение 72 ч инкубирования титр ЭИГ уменьшился всего лишь на 4 % (этот результат противоречит выводу авторов [40] о быстром разложении препарата при нейтральном значении рН; возможно, это связано с тем, что в [40] стабильность тиоТЭФ изучали в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), который взаимодействует с тиоТЭФ); б) существенное снижение стабильности тиоТЭФ при рН < 7. Так, при рН 4,5 титр ЭИГ за время 4 ч инкубации уменьшился приблизительно на 50 % [37]. Аналогичный результат получен группой Гутерриза [41], изучавшей гидролиз тиоТЭФ в моче и натрий-ацетатном буфере при 37 °С и рН 4,0. Гидролиз тиоТЭФ при рН < 7 происходит с образованием ряда соединений, идентификация которых проведена с помощью ТСХ и МС-ПИ [37, 38]. Хроматограмма, полученная в результате кислотного гидролиза тиоТЭФ, содержит четыре пятна со следующими значениями R_f : 0,16 (А), 0,36 (В), 0,5 (С), 0,6 (D) [37, 38]. Аналогичный распад препарата происходит в моче при рН 4, о чем свидетельствуют соответствующие величины R_f : 0,15 (А), 0,35 (В), 0,52 (С), 0,6 (D) [41]. Из масс-спектров найдено, что пятно А содержит молекулы тиоТЭФ, пятно В — включает группу пиков с m/z 225, 227, соотношение интенсивностей которых равно 3:1. Это указывает на включение в данный продукт атома хлора. Для пятна С характерна группа пиков, среди которых основными являются пики с m/z 261, 263, из соотношения интенсивностей которых

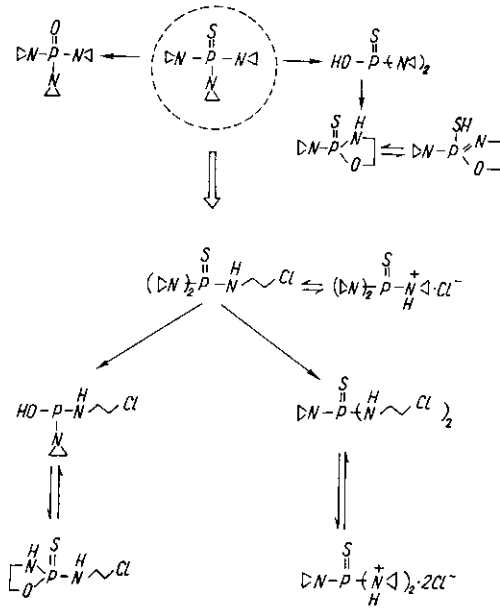


Рис. 6. Схема гидролиза тиоТЭФ в физиологическом растворе

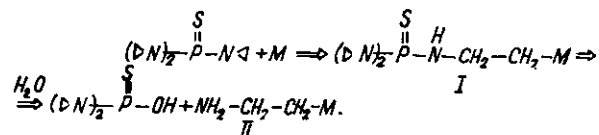
следует, что в данном продукте содержатся два атома хлора [37, 38]. Кроме описанных продуктов, идентифицирован целый ряд других соединений, проявляющихся на начальных стадиях распада препарата (рис. 6).

Продукты алкилирования. А. Взаимодействие тиоТЭФ с азотистыми основаниями. Исследуемая реакционная смесь тиоТЭФ+основание содержала 0,01—0,5 М основание и 0,05—0,15 М лекарственный препарат. Время инкубации 3—5 сут при температуре 37 °С. Для МС-измерений водные растворы реакционных смесей и продукты, выделенные хроматографически, высушивали на роторном испарителе при 35 °С. Причем для съемок в режимах ПИ ББА-образец готовили с максимально возможным удалением влаги, тогда как для режима ПД использовали концентрированные растворы [42]. Вначале были проведены контрольные эксперименты, показавшие, что взаимодействия между реагентами в условиях МС-анализа не наблюдается [42].

При анализе смесей (без разделения) в масс-спектрах ПИ, ПД, ББА помимо пиков, соответствующих исходным компонентам, наблюдался ряд новых пиков, которые можно было отнести к продуктам реакций алкилирования. Заметим, что для каждого метода ионизации подбирались оптимальные условия регистрации в масс-спектре того или иного продукта.

Основные пики с массой $m > M$ (M — масса основания) в масс-спектрах ПИ, ПД следующие [43]: в случае цитозина — $(M+26)^+$, $(M+43)^+$, $(M+66)^+$, $(M+T)^+$, $(M+2T)^+$, $(2M+T)^+$ (T — тиоТЭФ); в случае аденина — $(M+43)^+$, $(M+T)^+$; в случае гуанина — $(M+43)^+$, $(M+T)^+$, $(M+2T)^+$. Для масс-спектров ББА характерны аналогичные ионы только в протонированной форме.

Образование наблюдаемых продуктов происходит по следующему механизму [44, 45] (схема 3)



Из приведенной схемы следует, что в водном растворе происходит раскрытие одного из этиленминных циклов тиоТЭФ с последующим его взаимодействием с нуклеофильным атомом основания. Это приводит к образованию комплекса I. При разрыве связи P—N образуется комплекс II. Таким образом, ионы $(M+T)^+$ в ПД-спектре и $(M+T+H)^+$ — в ББА-спектре в соответствии с предложенной схемой отвечают комплексам I, для которых соотношение биомолекула: лекарственный препарат равно 1 : 1.

Ионы $(M+2T)^+$, $(M+2T+H)^+$ соответствуют комплексам, включающим две молекулы тиоТЭФ на одну молекулу основания. Обнаружение соединений, которым соответствуют ионы $(2M+T)^+$ свидетельствует о принципиальной возможности взаимодействия двух нуклеотидных оснований с тиоТЭФ. Отсюда следует предположение о возможности возникновения двунитчатых «шивков» в ДНК. Отметим, что в первых опытах с использованием ПИ были зарегистрированы только ионы со структурой комплекса II [46, 47]. Отсутствие в масс-спектрах ПИ ионов, отвечающих структуре I, обусловлено высокой лабильностью последних.

Для доказательства того, что в масс-спектрах наблюдаются ионы, соответствующие продуктам, образовавшимся в реакционной смеси, а не в условиях МС-эксперимента, были поставлены опыты по выделению индивидуальных продуктов алкилирования с использованием ТСХ [42, 43]. Так, например, в случае реакционной смеси (С+тиоТЭФ) после хроматографирования выявляются четыре пятна, проявляющихся в парах йода [42]. Анализ МС- и УФ-спектроскопических данных показал, что пятна 1, 4 соответствуют исходным компонентам: С и

тиоТЭФ. Масс-спектры пятна 2 не содержали каких-либо характеристических пиков, тогда как в случае пятна 3 наблюдались интенсивные пики с m/z 300 (ПД) и 301, 258 (ББА), отвечающие комплексу I. Отсутствие в масс-спектрах пятна 3 каких-либо фрагментных ионов, в частности $(M+43)^+$, свидетельствует о том, что последний соответствует индивидуальному соединению, образующемуся в реакционной смеси.

Кроме идентификации продуктов реакций алкилирования в системе «тиоТЭФ+основание», в [46] была предпринята попытка применить МС-ПИ для определения центров алкилирования на молекулах оснований ДНК. Для этой цели использовали набор специально синтезированных метилпроизводных оснований (табл. 4). О взаимодействии судили по интенсивности в масс-спектрах ПИ комплекса II. Из табл. 4 следует, что в случае С взаимодействие с тиоТЭФ, вероятнее всего, происходит по атому N(1). Для тимина таким атомом является N(3), аденина — N(9). Заметим, что при этом не исключаются другие центры алкилирования, а именно: N(1) (Т), N(1), N(6) (А), N(1), O(6), N(7), (G).

Полученные данные о продуктах взаимодействия тиоТЭФ с основаниями имеют самостоятельный интерес, так как свидетельствуют о возможности образования в клетках модифицированных оснований — предшественников синтеза ДНК. Наличие подобных структур может быть одной из причин задержанного мутагенного эффекта [48, 49].

Б. Взаимодействие тиоТЭФ с нуклеотидами. Используя времяпролетный масс-спектрометр с ионизацией осколками деления ^{252}Cf , в последнее время нами проведены исследования по наблюдению высокомолекулярных комплексов тиоТЭФ с нуклеотидами (дезоксигуанозин-5-монофосфат (dGMP) и дезоксицитидин-5-монофосфат (dCMP). Из масс-спектра (рис. 7) следует, что в модельной системе образуется целый набор комплексов с включением до шести (!) молекул тиоТЭФ в случае dGMP: dGMP·Т (m/z 536); dGMP·(Т)₂ (m/z 735); dGMP×(Т)₃ (m/z 915); dGMP·(Т)₄ (m/z 1104); dGMP·(Т)₅ (m/z 1293); dGMP·(Т)₆ (m/z 1482). В случае нуклеотида dCMP получен лишь один комплекс dCMP·Т (m/z 495). Присутствие в среде обоих нуклеотидов dGMP и dCMP показывает предпочтительность связывания тиоТЭФ с dGMP. В настоящее время проводятся исследования по изучению динамики накопления и устойчивости наблюдаемых комплексов, а также механизмов их образования.

Таблица 4

Интенсивности пиков (M^+) и $(M+43)^+$ в масс-спектрах ПИ метилпроизводных оснований после их инкубации с тиоТЭФ и некоторые центры алкилирования, найденные из этих данных

Метилпроизводные оснований	M^+	$(M+43)^+$		Центры алкилирования	
	m/z	m/z	I*	Настоящая работа	Литературные данные [42, 44]
$m^5\text{C}$	125	168	30	N(1)	N(3), N(4)
$m^{1,4}\text{C}$	139	182	0	—	—
$m^1\text{C}$	125	168	0	—	—
$m^{4,4}\text{C}$	139	182	40	—	—
Т	126	169	3	N(3)	N(1), N(3), O(4)
$m^1\text{T}$	140	183	1,5	—	—
$m^{1,3}\text{T}$	154	197	0	—	—
$m^7\text{A}$	149	192	10	N(9)	N(9), N(3), N(7), N(6)
$m^9\text{A}$	149	192	0	—	—
$m^{6,6}\text{A}$	163	206	65	—	—
$m^{2,2,9}\text{G}$	193	236	30	N(7)	N(7), O(6), N(1)

* I — относительная концентрация продуктов, полученная как отношение интенсивностей соответствующих пиков к интенсивности пика M^+ .

В. Взаимодействие тиоТЭФ с ДНК. В данном разделе продемонстрированы возможности МИ-МС в идентификации продуктов взаимодействия тиоТЭФ с ДНК, выделение которых основано на явлении выщелачивания из ДНК модифицированных пуринов при нагреве (депу-

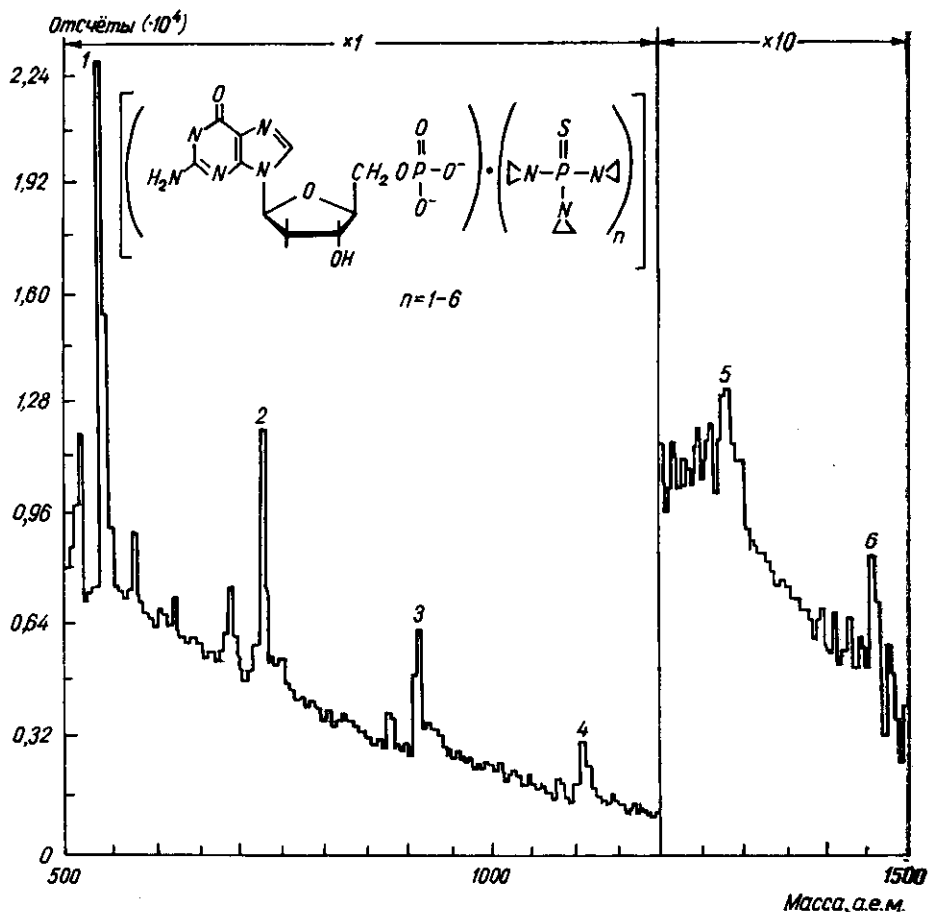


Рис. 7. Масс-спектр инкубационной смеси dGMP с тиоТЭФ (Т), полученный с помощью десорбционной ионизации осколками деления ^{252}Cf ($U_{\text{иск}} = -20$ кВ, время накопления $T_{\text{н}} = 3/10^5$ стартов)

ринизация) [50]. Продукты разделяли с помощью ТСХ, масс-спектры снимали в режиме БА. Кроме того, проводили и УФ-спектрометрические исследования разделенных продуктов.

Реакцию тиоТЭФ с ДНК осуществляли при молярном отношении 20 : 1 в течение 140 мин при 37 °С. Далее раствор унаривали и избыток тиоТЭФ экстрагировали смесью бензол—хлороформ. В результате разделения раствора выделены три фракции, основные характеристики которых приведены в табл. 5 [42]. С помощью масс-спектров БА этих фракций показано, что фракции II соответствует комплекс (G+ТН) (m/z 341), а фракции III — (А+ТН) (m/z 325). Используя данные УФ-спектроскопии, результаты на модельных системах [51, 52] и литературные данные по алкилпроизводным G и А [53], установлено, что реакция алкилирования ДНК тиоТЭФ происходит по N(7)G и N(3)A (схема 4).

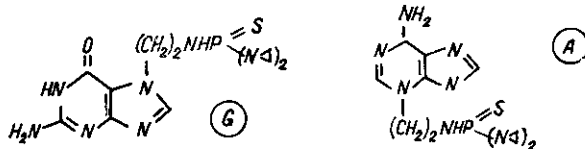


Таблица 5

Выделенные фракции взаимодействия ДНК с тиюТЭФ и их хроматографические, масс-спектрометрические и спектральные характеристики [42]

Характеристика фракции	Номер фракции		
	I	II	III
Объем, мл	82	34	55
m/z (МН) ⁺	—	342	325
R_f основного пятна на ТСХ в системах:			
а*	—	0,52	0,26
б**	—	0,59	0,92
λ_{max} (нм) при рН:			
1,0	—	256	276
7,0	—	285	277
13	—	280	276
λ_{max} (нм) при рН:			
1,0	—	234	240
7,0	—	262	249
13	—	259	250
Выход продуктов, %	—	8,3	3,4
Продукты	Олигодезоксирибонуклеотиды	7-МонотиоТЭФ-производное гуанина	3-МонотиоТЭФ-производное аденина

* н-бутанол — ацетон — вода (2 : 1 : 1); ** — изопропан — 25 %-ный водный раствор аммиака (3 : 2).

Таким образом, из вышесказанного следует, что методика МИ-МС, в частности БА, является вполне пригодной для детектирования продуктов взаимодействия ДНК с тиюТЭФ, минуя стадию гидролиза и препаративного выделения индивидуальных продуктов.

Выводы и перспективы. Цель настоящего обзора — попытка продемонстрировать эффективность использования МИ-МС в молекулярно-биологических исследованиях по двум направлениям: термодинамическом и структурно-аналитическом. Подобное сочетание в литературе встречается впервые.

Внедрение в практику молекулярно-биофизических исследований методики ТЗ-ПМС позволило впервые поставить эксперименты по изучению термодинамических характеристик биологических ассоциатов (уотсон-криковские, «неправильные» и др. пары, комплексы «аминокислота—основание», гидраты оснований и их ассоциаты) в условиях вакуума. Помимо фундаментального значения этих данных для молекулярной биофизики, следует отметить их эффективность для теории, поскольку с их появлением стало возможным проведение корректного сравнения теоретических данных с опытными, измеренными в адекватных условиях.

Однако, несмотря на уникальность МС-данных о стабильности биологических ассоциатов, их перенос на реальные биообъекты следует производить с осторожностью, учитывая, прежде всего, влияние ион-гидратного окружения исследуемого ассоциата на его стабильность.

Модификация предложенной методики, а именно: создание низкотемпературного полевого источника ионов открыла дополнительные возможности в исследовании межмолекулярной ассоциации в условиях, приближенных к биологическим. Нет сомнения в том, что дальнейшее развитие ТЗ-ПМС может быть исключительно полезным в выявлении роли межмолекулярных взаимодействий (на модельном уровне) в таких биосистемах, как гормон—рецептор, нейромедиатор—рецептор, лекарственное вещество—рецептор, антиген—антитело и др.

Подводя краткий итог структурно-аналитическому направлению, затронутому в обзоре, отметим следующее. Весьма перспективными выглядят возможности МИ-МС в идентификации продуктов распада,

включая следовые уровни, лекарственных препаратов и аддуктов их реакций с ДНК. Сочетание этих данных с результатами, полученными традиционными методами [54, 55], приведет к более глубокому пониманию физико-химических механизмов процесса алкилирования.

Заслуживают также внимания результаты по фрагментации лекарственных препаратов в условиях действия сильного электрического поля и связь этих наблюдений с опытами по выявлению метаболитов на клеточных структурах. Вполне возможно, что на этом пути удастся прояснить вопрос о влиянии (по крайней мере для определенной группы препаратов) мембранного потенциала на гидролиз проникающего в клетку лекарственного препарата.

Автор выражает искреннюю признательность М. Ю. Беляевой и В. Д. Чиванову за участие при подготовке рукописи.

Резюме

В огляді зібрано дані, що демонструють можливості м'якоіонізаційної мас-спектрометрії (МІ-МС) в молекулярно-біологічних дослідженнях у двох напрямках: термодинамічному та структурно-аналітичному.

Описано методику температурно-залежної мас-спектрометрії поля, за допомогою якої вперше поставлено експерименти по вимірюванню термодинамічних характеристик ряду біологічних асоціатів: уотсон-кріківських, «неправильних» та інших пар основ, купкові димери основ, комплекси «амінокислота—основа», гідрати основ та їх пар. Зроблено аналіз цих даних в поєднанні з теорією.

Показано перспективи МІ-МС у вивченні продуктів гідролізу (розпаду) лікувальних препаратів у фізіологічному розчині та аддуктів їх взаємодії з ДНК.

Summary

The results which demonstrate the possibilities of the soft-ionization mass-spectrometry (SI-MS) for molecular-biological studies in two direction—thermodynamic and analytical-structural are given.

The method of the temperature-dependent field ionization mass-spectrometry which was the first time used for measuring of the thermodynamic characteristics of the number biological associates: Watson-Crick, mispairing and other base pairs, «aminoacid-base» complexes, hydrates of the bases and their pairs are described.

The possibilities of the SI-MS for study of the hydrolysis the antitumour drugs in the physiological solutions and adducts of their interactions with DNA are shown.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cooks R. G., Hand O. W.* Tandem mass spectrometry at low kinetic energy // *Nucl. Instruments Meth. in Phys. Res.*—1987.— **B29**.— P. 427—436.
2. *Beckey H. D.* Principles of field desorption mass spectrometry.— New York: Pergamon press, 1978.— 348 p.
3. *Физические основы полевой масс-спектрометрии* / Э. Н. Король, В. В. Лобанов, В. А. Назаренко, В. А. Покровский.— Киев: Наук. думка, 1987.— 196 с.
4. *Benninghoven A.* Gaede-Langmuir lecture: static SIMS applications—form silicon single crystal oxidation to DNA sequencing // *J. Vac. Sci. Technol.*—1985.— **A3**, N 3.— P. 451—460.
5. *Хобза П., Заградник Р.* Межмолекулярные комплексы: Роль вандерваальсовых систем в физической химии и биодисциплинах.— М.: Мир, 1989.— 375 с.
6. *Kyogoku J., Lord R. C., Rich A.* An infrared study of the hydrogen-bonding specificity of hypoxanthine and other nucleic acid derivatives // *Biochim. et biophys. acta.*—1969.— **179**, N 1.— P. 10—17.
7. *Chen M. C., Lord R. C.* Re-investigation of specific hydrogen-bonding of certain adenine and uracil derivatives by infrared spectroscopy // *Ibid.*—1974.— **340**, N 1.— P. 90—94.
8. *Petersen S. B., Led J. J.* Watson-Crick base pairing between guanosine and cytidine studied by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy // *J. Amer. Chem. Soc.*—1981.— **103**, N 18.— P. 5308—5313.
9. *Detection of guanine-adenine base pair in a decaoxyribonucleotide by proton mag-*

- netic resonance spectroscopy / L. S. Kan, S. Chandrasegaran, S. M. Pulford, P. S. Miller // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— 80, N 14.— P. 4263—4265.
10. Iwahashi H., Sugeta H., Kyogoky Y. Detection of separated amino proton resonance signal of adenine derivatives at low temperature and its application to estimation population adenine-uracil dimers in solution // Biochemistry.— 1982.— 21, N 4.— P. 631—638.
 11. Sukhodub L. F., Yanson I. K. Mass spectrometric studies of binding energies for nitrogen bases of nucleic acids in vacuo // Nature.— 1976.— 264, N 18.— P. 245—247.
 12. Yanson I. K., Teplitsky A. B., Sukhodub L. F. Experimental studies of molecular interactions between nitrogen bases of nucleic acids // Biopolymers.— 1979.— 18, N 5.— P. 1149—1170.
 13. Суходуб Л. Ф. Взаимодействия в компланарных и стопочных димерах оснований нуклеиновых кислот в вакууме. Масс-спектрометрические исследования // Биофизика.— 1987.— № 6.— С. 994—1005.
 14. Sukhodub L. F. Interactions and hydration of nucleic acid bases in vacuum. Experimental study // Chem. Rev.— 1987.— 87, N 3.— P. 589—606.
 15. Полтев В. И. Невалентные взаимодействия и конформации ДНК: Дис. ... д-ра физ.-мат. наук.— Пушкино, 1985.— 273 с.
 16. Теплицкий А. Б., Суходуб Л. Ф. Энергетика неправильного нуклеотидного спаривания. Масс-спектрометрические исследования в вакууме // Биофизика.— 1990.— 35, № 5.— С. 876—877.
 17. Tautomerism of nucleic acid bases and the effect of molecular interactions on tautomeric equilibria / W. P. Person, K. Szczepaniak, M. Szczesniak et al. // J. Mol. Struct.— 1989.— 194.— P. 239—258.
 18. Poltev V. I., Shulyupina N. V. Simulation of interactions between nucleic acid bases by refined atom/atom potential functions // J. Biomol. and Struct. Dyn.— 1986.— 3, N 2.— P. 739—765.
 19. Теплицкий А. Б., Галетич И. Л., Суходуб Л. Ф. Энергетика образования комплексов аминокислота—основание в вакууме (глутамин, аспарагин—урацил, тимин) // Биофизика.— 1990.— 35, № 5.— С. 709—710.
 20. Шарафутдинов М. Р., Данилов В. И., Полтев В. И. Теоретическое изучение гидратации метилпроизводных аденина в вакууме // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1983.— № 12.— С. 69—72.
 21. Del Bene J. E. Molecular orbital theory of the hydrogen bond. 24. Ground state water-uracil complexes // J. Comput. Chem.— 1981.— 5, N 2.— P. 188—199.
 22. Del Bene J. E. Molecular orbital theory of the hydrogen bonding. 21. Water with the purine bases adenine and guanine // J. Mol. Struct.— 1984.— 108.— P. 179—197.
 23. Гайворонский Д. А., Суходуб Л. Ф. Низкотемпературная приставка к полемому источнику ионов масс-спектрометра МИ 1201 // Приборы и техника эксперимента.— 1983.— № 5.— С. 173—176.
 24. Веркин Б. И., Суходуб Л. Ф., Гайворонский Д. А. Наблюдение полигидратов нуклеотидных оснований в вакууме методом низкотемпературной полевой масс-спектрометрии // Докл. АН СССР.— 1984.— 277, № 5.— С. 1252—1255.
 25. Суходуб Л. Ф., Теплицкий А. Б., Лодяной Ю. М. Гидратация комплементарной пары 9-метилгаденин-1-метилурацил при низких температурах по данным полевой масс-спектрометрии // Биофизика.— 1989.— 34, № 2.— С. 181—186.
 26. Teplitsky A. B., Sukhodub L. F. Polyhydration of associates of nucleotide bases at low temperatures // Stud. biophys.— 1987.— 122, N 1—3.— P. 107—112.
 27. Monte Carlo simulation of hydration of the nucleic acid fragments / A. V. Teplyukhin, V. I. Poltev, N. V. Shulyupina, G. G. Malenkov // J. Biomol. and Struct. Dyn.— 1989.— 7, N 1.— P. 75—99.
 28. Danilov V. I., Tolokh I. S. Hydration of uracil and thymine methyl derivatives: a Monte Carlo simulation // Ibid.— 1990.— 7, N 5.— P. 1167—1183.
 29. Веркин Б. И., Суходуб Л. Ф., Моисеевко А. А. Исследование фрагментации фопурина и его метаболита методом полевой ионизации // Докл. АН СССР.— 1982.— 265, № 1.— С. 115—120.
 30. Лежвичюс Р. К., Слапштите Г. В. // Генетика и селекция народному хозяйству.— Вильнюс; Каунас, 1977.— 98 с.
 31. Масс-спектрометрическое исследование ариaldiэтилентриамидов фосфорной кислоты / Л. Ф. Суходуб, М. В. Косевич, И. Е. Болдескул, Л. Д. Проценко // Укр. хим. журн.— 1989.— 55, № 6.— С. 642—645.
 32. Масс-спектрометрическое исследование ацилдиэтилентриамидов фосфорной кислоты / Л. Ф. Суходуб, М. В. Косевич, И. Е. Болдескул, Л. Д. Проценко // Там же.— № 7.— С. 752—757.
 33. Проценко Л. Д. Исследование в области этиленаминопроводных кислот фосфора и пиримидина: Автореф. дис. ... д-ра хим. наук.— Киев, 1970.— 43 с.
 34. Реброва О. Н., Биюшин В. Н., Малиновский Т. И. Кристаллическая и молекулярная структура N-фенил-N',N'',N'''-диэтилентриамида фосфорной кислоты // Докл. АН СССР.— 1983.— 272, № 4.— С. 870—873.
 35. Пенъковский В. В., Болдескул И. Е. Квантовохимическое изучение амидов 0,0-диметилфосфорной кислоты // Теор. и эксперим. химия.— 1984.— 20, № 2.— С. 198—202.
 36. Изучение стабильности тиофосфамида в водных и водносолевых растворах / Т. Л. Пятигорская, О. Ю. Жилкова, Н. М. Архангелова и др. // Хим.-фарм. журн.— 1984.— 18, № 3.— С. 343—349.
 37. Изучение продуктов превращения тиофосфамида в водных растворах методами

- тонкослойной хроматографии и масс-спектрометрии / Т. Л. Пятигорская, О. Ю. Жилкова, В. С. Шелковский и др. // Там же.— 1985.— 29, N 10.— С. 1235—1241.
38. *Hydrolysis of 1,1,1-phosphinothioylidinetriazidine (Thiotepa) in aqueous solution* / Т. Л. Pyatigorskaya, O. Yu. Zhilkova, V. S. Shelkovsky et al. // *Biomed. Environ. Mass Spectr.*— 1987.— 14, N 4.— P. 143—148.
 39. *Суходуб Л. Ф.* Применение мягкоионизационной масс-спектрометрии в биохимии // *Укр. биохим. журн.*— 1989.— 61, № 4.— С. 16—30.
 40. *Mellet L. B., Wood L. A.* The comparative physiological disposition of the thioTEPA and TEPA in the dog // *Cancer Res.*— 1960.— 20, N 4.— P. 524—532.
 41. *Effects of pH and temperature on the stability and decomposition of N,N,N-triethylenthiothiophosphoramidate in urine and buifer* / B. E. Cohen, M. J. Egorin, M. S. B. Nayyar, P. L. Gutierrez // *Ibid.*— 1984.— 44, N 5.— P. 4312—4316.
 42. *Косевич М. В.* Молекулярный анализ лекарственных препаратов и продуктов их взаимодействия с ДНК и ее компонентами по данным мягкоионизационной масс-спектрометрии: Дис. ... канд. физ.-мат. наук.— Харьков, 1989.— 180 с.
 43. *Прямое наблюдение аддуктов азотистых оснований с тио-ТЭФ с помощью мягкоионизационной масс-спектрометрии* / Л. Ф. Суходуб, М. В. Косевич, В. С. Шелковский и др. // *Биофизика.*— 1990.— 35, № 4.— С. 549—551.
 44. *Химиотерапия злокачественных опухолей* / Под ред. Н. Н. Блохина.— М.: Медицина, 1977.— 320 с.
 45. *Росс У.* Биологические алкилирующие вещества.— М.: Медицина, 1964.— 240 с.
 46. *Масс-спектрометрическое исследование взаимодействия тиофосфамида с основаниями нуклеиновых кислот* / Л. Ф. Суходуб, В. С. Шелковский, М. В. Косевич и др. // *Докл. АН СССР.*— 1985.— 283, № 3.— С. 714—716.
 47. *Nucleic acid base complexes with thioTEPA as revealed by field ionization mass spectrometry* / L. F. Sukhodub, V. S. Shelkovsky, M. V. Kosevich et al. // *Biomed. Environ. Mass Spectr.*— 1986.— 13, N 4.— P. 167—170.
 48. *Дубинин Н. П., Сапрыкина Е. Г.* Цепная реакция при химическом мутагенезе // *Докл. АН СССР.*— 1964.— 158, № 4.— С. 956—959.
 49. *Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н., Андреев В. С.* Высокоактивные вторичные алкилирующие мутагены // *Генетика.*— 1966.— 2, № 4.— С. 269—278.
 50. *Harrap K. R., Gascoigne E. W.* The interaction of bifunctional alkylating agents with the DNA of tumor cells // *Eur. J. Cancer.*— 1976.— 28.— P. 269—278.
 51. *Направления алкилирования дезоксигуанина и дезоксигуаниловой кислоты тио-ТЭФом* / А. М. Серебряный, Г. В. Андриевский, А. П. Беккер и др. // *Биоорг. химия.*— 1986.— 12, № 4.— С. 499—506.
 52. *Строение продуктов модификации нуклеотидов и ДНК этиленимином и тио-ТЭФом* / А. М. Серебряный, Г. В. Андриевский, А. П. Беккер и др. // Там же.— 1987.— 13, № 6.— С. 787—792.
 53. *Singer B.* The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis // *Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.*— 1975.— 15.— P. 219—284.
 54. *Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И.* Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленимина. 1. Алкилирование оснований // *Биоорг. химия.*— 1990.— 16, № 7.— С. 987—989.
 55. *Пацковский Ю. В., Волощук Т. П., Потопальский А. И.* Некоторые особенности реакции полинуклеотидов с тиофосфамидом // *Биополимеры и клетка.*— 1989.— 5, № 5.— С. 64—70.

Отд-ние прикл. физики ин-та металлофизики АН УССР,
Сумы

Получено 30.04.91

УДК 577.3:535.338.41

Г. С. Литвинов

ИНФРАКРАСНЫЕ КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ ФИТОВИРУСОВ И ИХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Исследованы спектры ИК-поглощения белков, РНК и вирионов спирального (вирус табачной мозаики) и сферического (вирус крапчатости гвоздики) типов симметрии. Обнаружено, что характеристики спектров, такие как общее число полос, их группировка в частотные интервалы, наличие характерных по интенсивности, полуширине и частоте полос (амид А, амид В, амид I, амид 2, фосфат 1, фосфат 2 и др.), весьма близки как для целостных вирусных нуклеопротеидов, так и для их биохимических компонентов. Наряду с этим наблюдаются и достоверные различия, по которым возможно дифференцировать между собой и вирионы, и входящие в них биополимеры.

© Г. С. ЛИТВИНОВ, 1991