

УДК 577.3

## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ С НУКЛЕОЗИДАМИ МЕТОДОМ ПЛАЗМЕННО-ДЕСОРБЦИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИОНИЗАЦИЕЙ ОСКОЛКАМИ ДЕЛЕНИЯ Cf-252

В.В. Пилипенко, С.А. Аксенов, А.Н. Калининевич, Л.Ф. Суходуб

*Институт Прикладной Физики, Национальной Академии Наук Украины,*

*244030, Сумы, ул. Петропавловская 58*

Поступила в редакцию 3 ноября 1998 г.

Методом плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления Cf-252 (ПДМС) исследовано взаимодействия стероидных гликозидов Монозида неотигогенина (МН), Биозида неотигогенина (БН) и Петуниозида Д (ПД) с нуклеозидами Ado, Guo, Cyd, Urd, Thd. Изучено также взаимодействие генинов неотигогенина и гитогенина с теми же нуклеозидами. Установлено, что БН и ПД способны образовывать нековалентносвязанные ассоциаты с Urd, а БН также с Cyd.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** стероидные гликозиды, генины, нуклеозиды, плазменно-десорбционная масс-спектрометрия, нековалентносвязанные ассоциаты

Стероидные гликозиды (СГ) являются физиологически активными веществами растительного происхождения. В общем случае молекула СГ состоит из "стероидного ядра" (агликона) и присоединенной к нему углеводной цепи, которая может включать в себя от 1 до 7 моносахаридных мономеров. Согласно структуре агликона СГ подразделяют на производные спиростанового и фураностанового рядов [1]. Известно, что СГ могут проявлять мембранотропную [1], фунгицидную [2,3], противовоспалительную [4], антиоксидантную [1] и другие виды активности. Для СГ характерен также выраженный гипохолестеринемический эффект, что позволило создать на базе СГ, выделенных из *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipronica* Makino, а также из *Tribulus terrestris* L., лекарственные препараты, применяемые для профилактики и лечения ранних стадий атеросклероза [5-7]. Кроме этого лекарственные препараты, включающие в свой состав СГ, широко используются при лечении кардиологических заболеваний [7,8]. Не последнюю роль в интересе, проявляемом исследователями к данным соединениям, играет возможность применять СГ в качестве исходных или промежуточных реагентов для синтеза гормональных препаратов или их производных, а также проявление гормональной активности нативными СГ [1,9-11]. В частности, получены данные по применению препарата трибестана, основой которого являются СГ из *Tribulus terrestris* L., в качестве афродизийного средства для мужчин [12]. В последние годы особое внимание привлекает также противоопухолевая активность СГ. Рядом авторов отмечается высокая ингибирующая способность СГ в отношении пролиферирующих клеточных систем [1,9,13,14], отмечается также, что данную активность проявляют только СГ, содержащие в олигосахаридной цепи более 2 звеньев [13]. Исходя из вышесказанного видно, что информация о реакционной способности СГ по отношению к биологически важным молекулам представляет интерес для создателей новых фармацевтических препаратов, в частности, для объяснения или предвидения нежелательных побочных эффектов.

Масс-спектрометрия, особенно мягкоионизационные методы, давно и весьма эффективно используется для определения, подтверждения или уточнения химической структуры СГ и исследований взаимодействия СГ с различными биомолекулами [15-20]. Результаты, полученные из масс-спектров СГ позволяют существенно расширить объем информации о данной группе веществ, об их реакционной способности в смесях с различными биомолекулами. В литературных источниках высказывается предположение о способности СГ проникать в клетку [2]. В качестве объекта исследования мы взяли функционально наиболее значимые элементы информационных, транспортных и рибосомальных нуклеиновых кислот - нуклеозиды. Данная работа является продолжением исследований по изучению методами мягкоионизационной масс-спектрометрии процессов взаимодействия фармакологических препаратов с различными биомолекулами, проводимых в лаборатории биофизики ИПФ НАНУ под руководством Л.Ф. Суходуба [21].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения взаимодействия СГ с нуклеозидами нами были использованы представители СГ: очищенный препарат Монозида неотигогенина (МН), Биозида неотигогенина (БН), выделенные из семян томатов, а также их агликон неотигогенин, полученный из того же источника, и очищенный препарат Петуниозида Д (ПД), экстрагированный из семян петунии и его агликон гитогенин, также выделенный из семян петунии, и нуклеозиды: Ado, Cyt, Guo, Thd, Urd марки х/ч производства Serva.

Молекула МН и БН включает в себя стероидную (агликоновую) часть, представленную генином ряда спиростана неотигогенином (25S-5a-spirostan-3b-ol), и углеводную часть, состоящую из галактозы у МН и галактозы и глюкозы у БН.

Углеводный компонент присоединяется к агликону по месту 3-ОН связи [1,10]. Структура БН изображена на рис. 1.

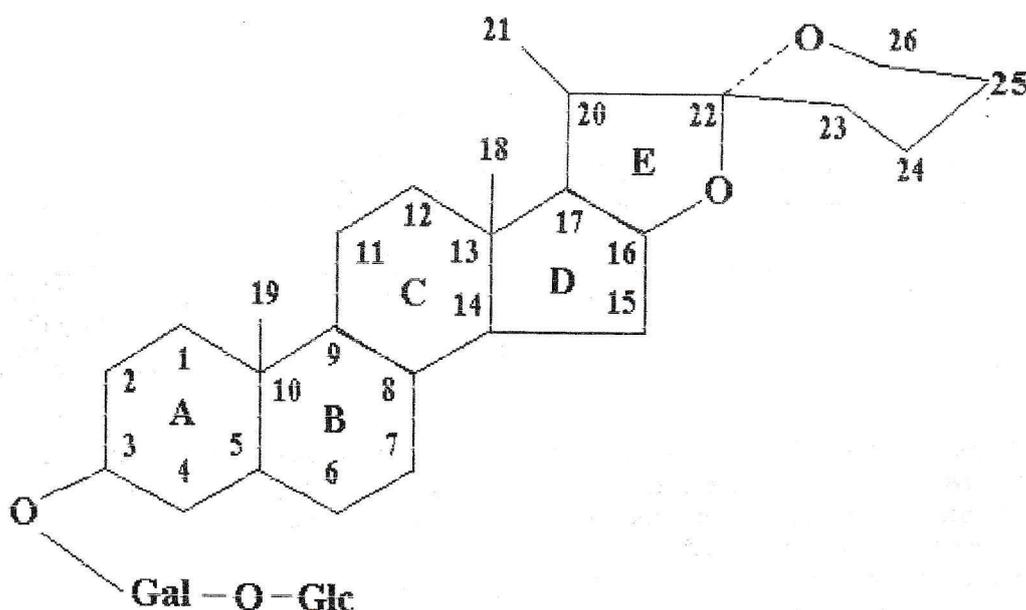


Рис. 1. Химическая структура молекулы Биозида неотигогенина.

ПД также состоит из стероидной составляющей, представленной агликоном гитогенином, химическая структура которого идентична неотигогенину за исключением дополнительной гидроксигруппы в положении 2, и углеводного фрагмента, состоящего из галактозы и глюкозы. Таким образом, ПД также является биозидом спиростанового ряда как и БН [1,10].

Исследование проводили путём приготовления модельных смесей гликозида или агликона с определённым нуклеозидом, в молярном соотношении 1:1. Данную смесь затем растворяли в дистиллированной воде с концентрацией 1 мг/мл в случае смеси гликозида с нуклеозидом или в водно-бутанольном растворе (1:1 по объёму) с той же концентрацией, если это смесь агликона с нуклеозидом.

Далее приготовленный раствор наносили на позолоченный пробонесущий диск в количестве 10-20 мкл. и просушивали в струе тёплого воздуха таким образом, чтобы на диске образовался сухой осадок. Анализ проводили с помощью времяпролётного масс-спектрометра с ионизацией осколками деления Cf-252 МСБХ, разработанного для биохимических исследований и изготовлённого АО SELMI, Сумы, Украина, при ускоряющем напряжении +15kV и -15kV. Разрешение по массам составляло около 250 на уровне 0,1 высоты пика [22,23].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально были получены масс-спектры МН, БН и ПД, а также неотигогенина и гитогенина, с целью изучения путей фрагментации молекул гликозидов и их агликонов, а также для проверки чистоты препаратов. Основные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Основные пики плазменно-десорбционных масс-спектров стероидных гликозидов и генинов. Погрешность измерения  $m/z$  составляет  $\pm 1$  а. е.

Стероидные гликозиды (М)			
№		m/z пика	Соответствующий ион
1.	Монозид неотигогенина	577	$[M + H]^+$
		599	$[M + Na]^+$
		601	$[M + Na + 2H]^+$
		400	$[(Agl-OH) + H]^+$
		416	$[Agl]^+$
2.	Биозид неотигогенина	742	$[M + H]^+$
		765	$[M + Na + 2H]^+$
		781	$[M + K + 2H]^+$
		1505	$[2M + Na + 2H]^+$
		400	$[(Agl-OH) + H]^+$
3.	Петуниозид Д	758	$[M + H]^+$
		781	$[M + Na + H]^+$
		1553	$[2M + K]^+$
		434	$[Agl + 2H]^+$
		416	$[(Agl-OH) + H]^+$
		398	$[Agl-2OH]^+$
Стероидные генины (Agl)			
1.	Неотигогенин	416	$[Agl]^+$
		400	$[(Agl-OH) + H]^+$
2.	Гитогенин	434	$[Agl + 2H]^+$
		416	$[(Agl-OH) + H]^+$
		398	$[Agl-2OH]^+$

В масс-спектрах МН и БН единственными пиками в области молекулярной массы гликозидов ( $M_r = 576$ ,  $M_r = 740$ ) были пики, соответствующие квазимолекулярному иону (КМИ) гликозидов с протоном и ионами натрия или калия. Последние обладают большей интенсивностью, чем пик, отвечающий молекулярной массе МН и БН, особенно пик КМИ с ионом натрия.

В масс-спектрах отмечается также присутствие интенсивных пиков в области молекулярной массы агликона и его фрагмента, последний соответствует иону со следующей структурой:  $[(Agl-OH) + H]^+$ . Другими словами, в процессе фрагментации молекулы СГ происходит разрыв по месту присоединения углеводной части к стероидному ядру с отрывом от агликона гидроксогруппы и последующим протонированием образованного иона. Подобный механизм фрагментации молекулы СГ является типичным и описан ранее в литературе [19-20,24]. В данном случае масс-спектры МН и БН подтверждают ранее полученные данные для подобных по структуре СГ растительного происхождения. В спектре БН также присутствует слабый по интенсивности пик в области масс, отвечающих образованию ассоциата из двух молекул гликозида ( $m/z=1505$ ). Масс-спектр неотигогенина продемонстрировал наличие интенсивных пиков в области молекулярной массы неотигогенина ( $M_r = 416$ ) и в области его фрагмента  $[(Agl-OH) + H]^+$ . При анализе масс-спектров ПД ( $M_r = 757$ ) и гитогенина ( $M_r = 432$ ) мы пришли к выводу, что для них характерен такой же путь фрагментации молекулы гликозида и агликона и следовательно образования пиков в той же области масс, что и для МН и БН, однако в данных масс-спектрах присутствует дополнительный пик в области масс фрагментов агликона, соответствующий иону с двумя отщепленными гидроксигруппами  $[(Agl-2OH)]^+$ , что связано по-видимому с наличием в молекуле гитогенина двух гидроксигрупп. ПД также склонен образовывать КМИ с ионами натрия и калия и пики в области масс данных КМИ также являются более интенсивными чем пик, соответствующий молекулярной массе ПД. В масс-спектре ПД также есть достаточно интенсивный пик в области масс, отвечающих образованию димера из двух молекул данного гликозида ( $m/z = 1553$ ), который более интенсивен чем в масс-спектре БН.

В целом масс-спектры гликозидов и генинов характеризуются небольшим количеством уверенно идентифицируемых пиков и низким уровнем химического шума.

В масс-спектрах нуклеозидов присутствовали интенсивные пики в области молекулярной массы соответствующего нуклеозида, а также очень интенсивные пики в области молекулярной массы азотистого основания. Прослеживалось также наличие не менее интенсивных пиков КМИ нуклеозидов и азотистых оснований с ионами натрия или калия.

## Изучение взаимодействия стероидных гликозидов с нуклеозидами...

Следует также отметить, что для масс-спектра чистого Cud характерно наличие пика, отвечающего образованию иона димерного гомоассоциата. Подобное явление не проявлялось ни в одном из масс-спектров остальных нуклеозидов.

В масс-спектрах смесей МН с рибонуклеозидами мы обнаружили наличие интенсивных пиков характерных для индивидуальных компонентов смесей.

Анализ данных масс-спектров смесей БН и нуклеозидов позволил также обнаружить в них присутствие интенсивных пиков тех же типов, что и в масс-спектрах индивидуальных компонентов смесей. Кроме этого в ряде масс-спектров были обнаружены пики, отвечающие гетерокластерным ассоциатам БН с определенным нуклеозидом по типу [БН+нуклеозид]. При этом в состав данного гетерокластерного ассоциата, наряду с молекулой гликозида и нуклеозида входил также ион натрия или калия. Результаты анализа масс-спектров модельных смесей СГ с рибонуклеозидами представлены в таблице 2.

Таблица 2. Взаимодействие стероидных гликозидов и генинов с рибонуклеозидами по данным плазменно-десорбционной масс-спектрометрии. В таблице представлены формулы нековалентных ассоциатов, в том случае, если молекулы взаимодействуют, и прочерк, если не взаимодействуют. Погрешность измерения  $m/z$  составляет  $\pm 3$  а.е.

№	Стероидные Гликозиды (M <sub>1</sub> )	Нуклеозиды (M <sub>2</sub> )							
		Ado		Cud		Guo		Urd	
		Ион	m/z	Ион	m/z	Ион	m/z	Ион	m/z
1.	Биозид Неотигогенина	-	-	[M <sub>1</sub> +M <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	1009	-	-	[M <sub>1</sub> +M <sub>2</sub> +K] <sup>+</sup>	1026
2.	Монозид неотигогенина	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	Петуниозид Д	-	-	-	-	-	-	[M <sub>1</sub> +M <sub>2</sub> +K] <sup>+</sup>	1042
№	Генины (M <sub>1</sub> )								
1.	Неотигогенин	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	Гитогенин	-	-	-	-	-	-	-	-

Наибольшей интенсивностью такие пики гетероассоциатов обладают в масс-спектре БН с Urd и Cud, что не оставляет сомнений во взаимодействии гликозида с данными нуклеозидами. Масс-спектр модельной смеси БН с Cud представлен на рис. 2. Масс-спектр модельной смеси БН с Urd представлен на рис. 3. Пик гетероассоциата присутствует также в масс-спектре БН с Ado, но его интенсивность очень низка. В масс-спектрах Thd с БН и Guo с БН отсутствуют пики гетероассоциатов, во всяком случае, их невозможно обнаружить при визуальном анализе масс-спектра. Последнее позволяет предположить, что сайтом присоединения СГ к нуклеозиду является не рибоза, а именно азотистое основание.

При анализе масс-спектров модельных смесей ПД с теми же нуклеозидами мы обнаружили также наличие интенсивных пиков тех же типов, что и в масс-спектрах индивидуальных компонентов смесей. Относительно пиков, соответствующих образованию гетерокластерного ассоциата ПД с определенным нуклеозидом по типу [ПД + нуклеозид], можно сказать, что в данном случае мы обнаружили такие пики только в масс-спектре смеси ПД с Urd.

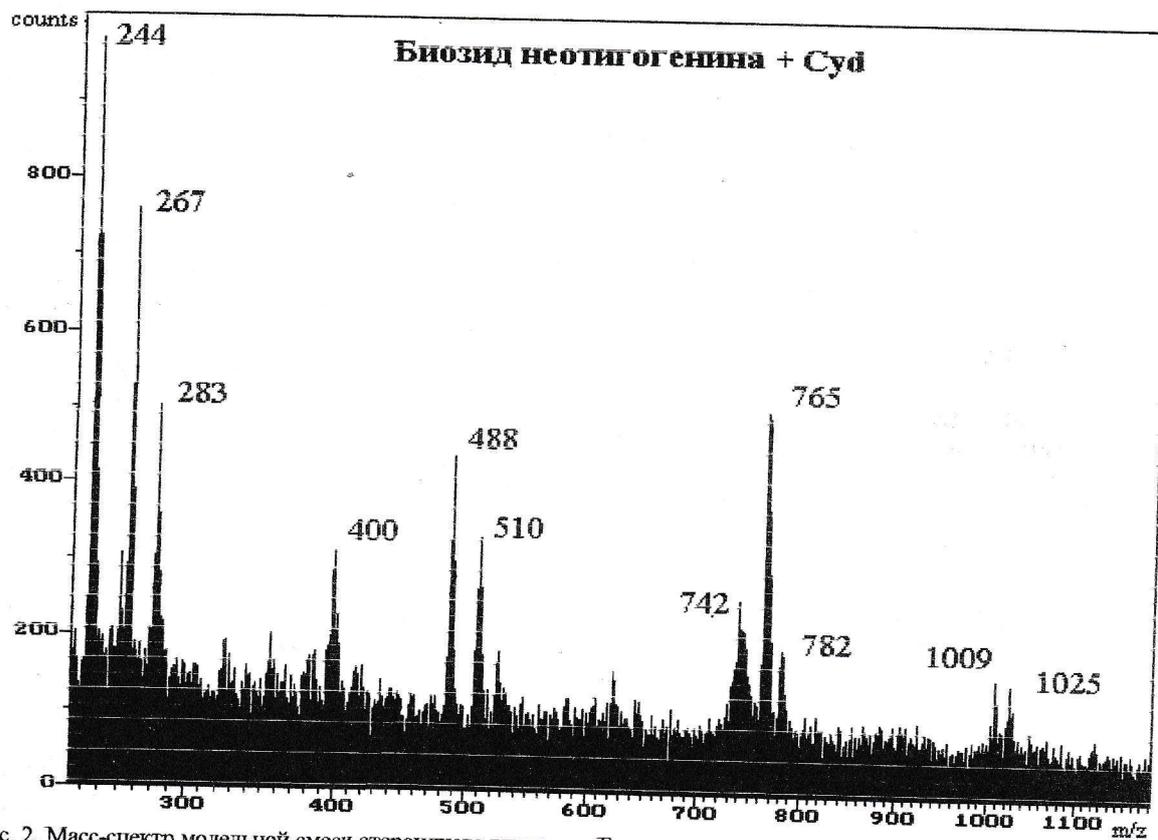


Рис. 2. Масс-спектр модельной смеси стероидного гликозида Биозид неотигогенина и Суд. Расшифровка пиков представлена в Таблице 1 и Таблице 2.

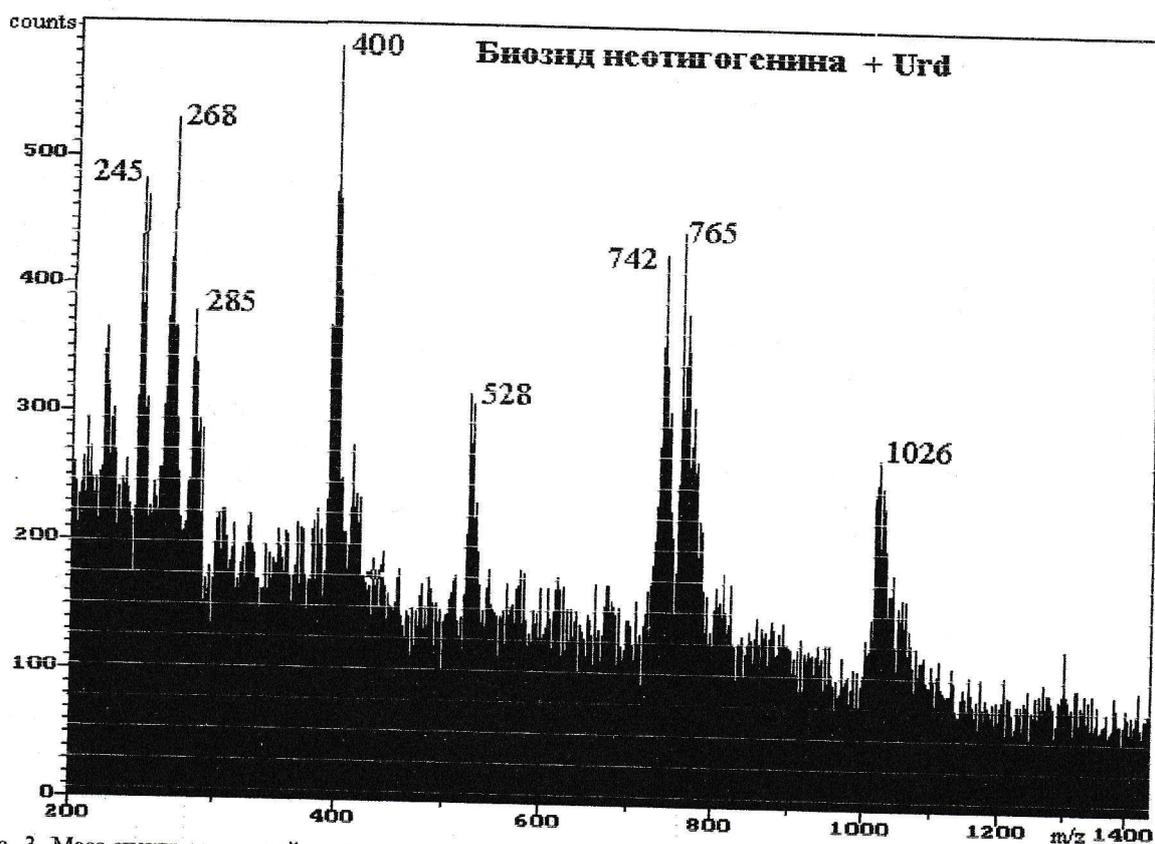


Рис. 3. Масс-спектр модельной смеси стероидного гликозида Биозид неотигогенина и Urd. Расшифровка пиков представлена в Таблице 1 и Таблице 2.

При этом в данном масс-спектре пик в области гетерокластерного ассоциата гликозида и нуклеозида был выражен более интенсивно, чем в масс-спектре БН с тем же нуклеозидом. В состав гетерокластерного ассоциата ПД и Urd входил также ион калия. Масс-спектр модельной смеси ПД с Urd представлен на рис. 4.

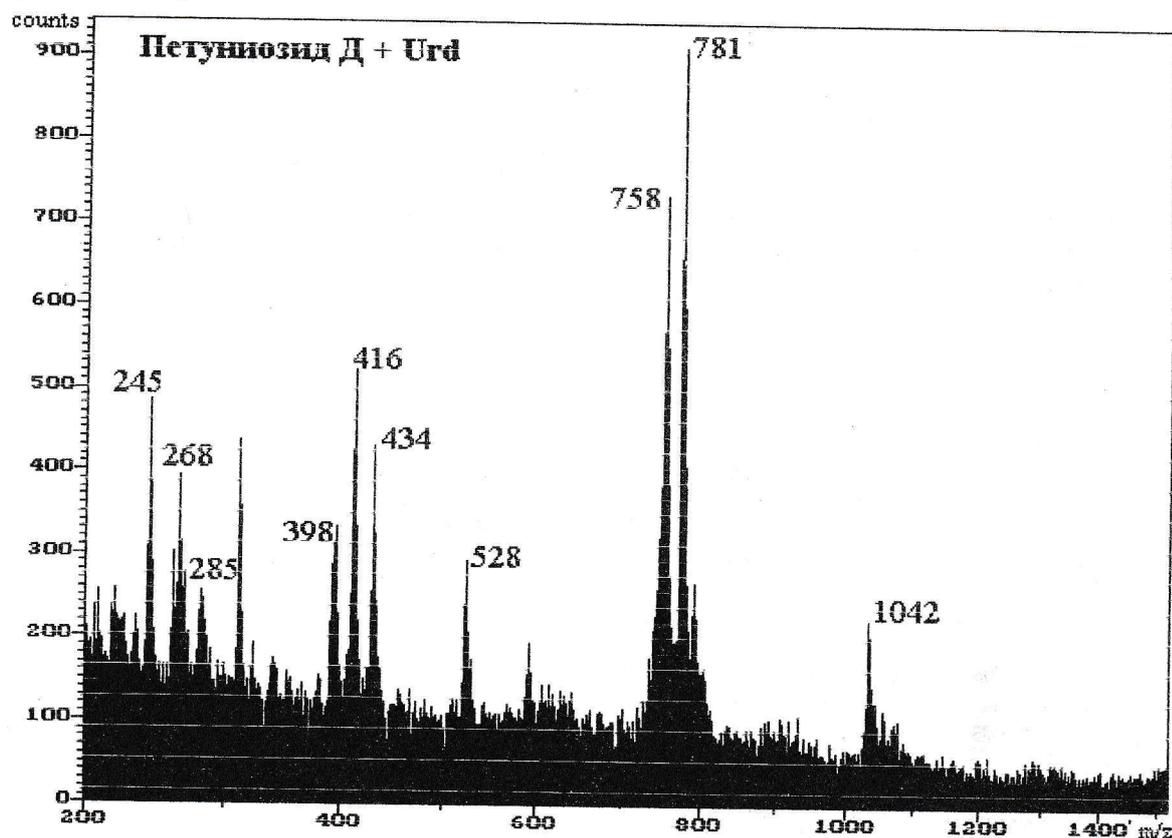


Рис. 4. Масс-спектр модельной смеси стероидного гликозида Петуниозида Д и Urd. Расшифровка пиков представлена в Таблице 1 и Таблице 2.

В масс-спектрах модельных смесей данного гликозида с Ado, Cyt, Guo, Thd пики в области масс образования гетерокластерных ассоциатов не были обнаружены или же имели очень низкую интенсивность.

Таким образом, исследование модельных смесей СГ с нуклеозидами указывает на возможность взаимодействия гликозидов с нуклеозидами путём образования нековалентно связанного гетероассоциата. Как показал анализ полученных масс-спектров МН не вступает во взаимодействие с нуклеозидами, тогда как БН и ПД способны на образование нековалентно связанных гетероассоциатов, при этом наиболее предпочтительным нуклеозидом для взаимодействия является Urd, а для БН также и Cyt. Другими словами, данные гликозиды проявляют большее сродство к нуклеозидам пиримидинового ряда.

Поскольку молекула гликозида состоит, как уже указывалось, из стероидной и углеводной частей, то вполне целесообразным является также исследование модельных смесей агликонов гликозидов с теми же нуклеозидами на предмет проверки возможности образования гетерокластерных ассоциатов с определенными нуклеозидами. С этой целью мы исследовали модельные смеси неотигогенина и титогенина с теми же нуклеозидами соответственно.

В полученных масс-спектрах мы обнаружили наличие интенсивных пиков, относящихся к индивидуальным компонентам смеси, но пиков, даже очень низкой интенсивности, которые бы соответствовали образованию гетерокластерных ассоциатов агликонов с нуклеозидами, эти спектры не продемонстрировали. Очевидно, что генины, как и МН, не вступали во взаимодействие с нуклеозидами в данных модельных смесях. Полученный результат хорошо коррелирует с литературными данными о более низкой химической активности генинов и монозидов по сравнению с гликозидами с разветвленной олигозидной цепью [9-11,13].

### ВЫВОДЫ

1. Исследование модельных смесей СГ МН, БН и ПД и генинов неотигогенина и гитогенина с нуклеозидами Ado, Cyd, Guo, Thd, Urd показало возможность вступления во взаимодействие СГ с нуклеозидами.
2. Данное взаимодействие выражается в образовании нековалентно связанных ассоциатов СГ с нуклеозидами по типу [СГ + нуклеозид] с присоединением иона натрия или калия. Способность к образованию нековалентно связанных ассоциатов выражена у СГ БН и ПД. БН может взаимодействовать с Cyd и Urd, ПД - только с Urd.
3. МН и генины не проявили способности к взаимодействию с нуклеозидами.

БЛАГОДАРНОСТИ: Авторы благодарят проф. П.К.Кинтя, к.б.н. С.А.Швеца, к.б.н. В.А.Бобейко (Институт генетики Академии наук республики Молдова) за любезно предоставленные препараты стероидных гликозидов и генинов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кинтя П.К., Лазуревский Г.В., Балашова Н.Н., Балашова И.Т., Суружи А.И., Лях В.А. Структура и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана. Штиинца, Кишинев 1987, 240 с.
2. Jurzysta M., Waller G.R. Adv. in experim. med. and biol., 1996, V. 404, p. 565-575.
3. K. Gruiz Adv. in experim. med. and biol., 1996, V. 404, p. 527-537.
4. Сыров В.Н., Кравец С.Д., Хушбактова З.А., Набиев А.Н., Воллернер Ю.С., Горовиц М.Б.// Хим- Фарм. журн. N 5, 1992, с. 71-75.
5. Кемертилидзе Э.П., Пхеидзе Т.А., Качухашвили Т.Н., Умикашвили Р.С., Турова А.Д., Соколова Л.Н.// Хим-Фарм. журн. N 1, 1982, с. 119-121.
6. Рыф И.М., Крепкова Л.В., Арзамасцева Е.В., Руджянская А.Ф., Пучкова В.А., Петрусенко А.Н.// Бюллетень эксперим. биол. N 9, 1988, с. 365-368.
7. Гацура В.В., Кудрин А.Н. Сердечные гликозиды в комплексной терапии недостаточности сердца. М. Медицина, 1983, 204 с.
8. H. Achenbach, H. Hubner, M. Reiter Adv. in experim. med. and biol. 1996, V. 404, p.357-371.
9. Камерницкий А.В., Абубакиров Н.К., Горовиц М.Б. и др. Химия спирастанолюв. М., Наука, 1986, с. 176.
10. Физер Л., Физер М. Стероиды. М. Мир, 1964, 982 с.
11. Heftman E. Biochemistry of steroidal saponins and glycoalkaloids. Lloydia, 30,209,1967.
12. GJulemetowa R., Tomowa M., Simowa M. Pharmazie 1982, N 4, p. 296.
13. Ахов Л.С., Головки Э.А. Физиология и биохимия культ. растений 1998, т. 30, N 2 с.112-123.
14. Takao Konoshima Adv. in experim. medicine and biol., 1996, V. 404, p. 87-101.
15. Maillard M.P., Hastetmann K. J. Chem. 647 N 1, 1993, p. 137-146.
16. Maillard M.P., Hastetmann K. A 673, Planta Medica, N 7, 1992, V. 58,
17. Catherine E. Costello Adv. in experim. med. and biol. , 1996, V. 405, p. 317-331.
18. Waller G.R., Chou C.H., Cheng C.S., West Paul R., Kuei J.C.H., Lai N.N. Proc. Int. Symposium in 1992 on the Adaptation of Food Crops to Temperature and Water Stress (1993) p. 419-426.
19. Lee M.K., Ling Y.C., Jurysta M., Waller G.R. Adv. of experim. med. and biol. , 1996, V. 405, p. 353-365.
20. West P.R., Waller G.R., Geno P.W., Oleszek W., Jurzysta M. Adv. of experim. med. and biol. , 1996, V. 405, p. 339-353.
21. Sukhodub L.F. Mass Spectrom. Rev., 1995, V. 14, p. 235-254.
22. Калиниченко Т.Г., Аксенов С.А., Чиванов В.Д., Суходуб Л.Ф. Науч.-техническая конф. "Техника и физика электронных систем и устройств", тезисы докладов, Сумы, 1995.
23. Пилипенко В.В., Аксенов С.А., Калинкевич А.Н., Суходуб Л.Ф. II съезд УБФТ, тезисы докладов, Харьков, 1998.
24. Waller G.R., West P.R., Cheng C.S., Ling Y.C., Chou C.H. Bot. Bull. Acad.Sin. (1993) 34: 323-334.