

Огляд

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-02>

УДК 577.32+615.28+577.323+577.323+577.113.7+544.173+535.34+535.372

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.

1. Противоопухолевые и противовирусные препараты (Обзор)

М.В. Косевич, О.А. Рязанова, В.А. Пашинская

Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,

пр. Науки, 47, Харьков, Украина, 61103

e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 4 октября 2018 г.

Принята 19 ноября 2018 г.

Актуальность. Установление молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов создает научную основу для направленного поиска эффективных фармакологических средств. Предполагаемые пути взаимодействия химиотерапевтических препаратов, воздействующих на возбудителей инфекционных заболеваний и злокачественные новообразования, с их потенциальными молекулярными мишенями требуют прямых доказательств на молекулярном уровне. Эти доказательства могут быть получены средствами молекулярной биофизики, которая имеет мощный арсенал новых физических методов для изучения межмолекулярных взаимодействий биомолекул и лекарственных агентов.

Цель работы. Целью настоящего обзора явилось обобщение результатов многолетних исследований молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов в биофизических отделах Физико-технического института низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины (ФТИНТ). В первой части обзора рассмотрены противоопухолевые и противовирусные препараты, предполагаемой молекулярной мишенью которых являются нуклеиновые кислоты.

Материалы и методы. Масс-спектрометрическое исследование молекул термически нестабильных фармакологических препаратов и их комплексов с биомолекулами значительно продвинулось благодаря разработке мягких методов ионизации/десорбции, заметный вклад в развитие которых внесли специалисты ФТИНТ. В комплексных исследованиях были применены методы молекулярной спектроскопии и компьютерное моделирование средствами квантовой химии.

Результаты. Объектами исследования были системы, состоящие из химиотерапевтических препаратов – тиофосамида, производных феназина и модифицированных ими антигенных/антисмысловых олигонуклеотидов, четвертичных соединений, тилорона – и их молекулярных мишеней – ДНК, олиго- и полинуклеотидов и компонентов нуклеиновых кислот. На модельном молекулярном уровне установлены механизмы действия этих препаратов, состоящие в специфических и неспецифических невалентных или ковалентных взаимодействиях молекул препаратов с нуклеиновыми кислотами и их компонентами, и в образовании стабильных комплексов препарата с молекулой-мишенью.

Выводы. Опыт исследований, проводившихся в течение нескольких десятилетий во ФТИНТ, продемонстрировал эффективность применения молекулярно-биофизических подходов и методов к установлению молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов. Полученные фундаментальные результаты имеют практическое значение для дальнейшей разработки новых лекарственных средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: межмолекулярные взаимодействия; химиотерапевтические препараты; противоопухолевые препараты; нуклеиновые кислоты; масс-спектрометрия; молекулярная спектроскопия.

БІОФІЗИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАΝІЗМІВ ДІЇ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ.

1. Протипухлинні та протівірусні препарати (Огляд)

М.В. Косевич, О.О. Рязанова, В.А. Пашинська

Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,

пр. Науки, 47, Харків, Україна, 61103

Актуальність. Встановлення молекулярних механізмів дії лікарських препаратів створює наукову базу для спрямованого пошуку ефективних фармакологічних засобів. Ймовірні шляхи взаємодії хіміотерапевтичних препаратів, які впливають на збудників інфекційних захворювань та злоякісні новоутворення, з їх потенційними молекулярними мішенями потребує прямих доказів на молекулярному рівні. Ці докази можна отримати засобами молекулярної біофізики, яка має потужний арсенал нових фізичних методів для вивчення міжмолекулярних взаємодій біомолекул та лікарських агентів.

Мета роботи. Метою огляду є узагальнення результатів багаторічних досліджень молекулярних механізмів дії хіміотерапевтичних препаратів у біофізичних відділах Фізико-технічного інституту низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України (ФТІНТ). У першій частині огляду розглянуто протипухлинні та противірусні препарати, ймовірною молекулярною мішенню яких є нуклеїнові кислоти.

Матеріали та методи. Мас-спектрометричне дослідження молекул термічно нестабільних фармакологічних препаратів та їх комплексів з біомолекулами значно просунулося завдяки розробці м'яких методів іонізації/десорбції, значний внесок у розвиток яких внесли фахівці ФТІНТ. У комплексних дослідженнях було застосовано методи молекулярної спектроскопії та комп'ютерне моделювання засобами квантової хімії.

Результати. Об'єктами дослідження були системи, які склалися з хіміотерапевтичних препаратів – тіофосфаміду, похідних феназину та модифікованих ним антигенних/антисенсових олігонуклеотидів, четвертинних сполук, тилорону – та їх молекулярних мішеней - ДНК, оліго- та полінуклеотидів, компонентів нуклеїнових кислот. На модельному молекулярному рівні встановлено механізми дії цих препаратів, які полягають у специфічних і неспецифічних невалентних та ковалентних взаємодіях молекул препаратів з нуклеїновими кислотами та їх компонентами, та в утворенні стабільних комплексів препаратів з молекулою-мішенню.

Висновки. Досвід досліджень, які проводилися протягом кількох десятиріч у ФТІНТ, продемонстрував ефективність застосування молекулярно-біофізичних підходів та методів до встановлення молекулярних механізмів дії лікарських препаратів. Отримані фундаментальні результати мають практичне значення для подальшої розробки нових лікарських засобів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: міжмолекулярні взаємодії; хіміотерапевтичні препарати; протипухлинні препарати; нуклеїнові кислоти; мас-спектрометрія; молекулярна спектроскопія.

BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS OF MOLECULAR MECHANISMS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS ACTION.

1. Chemotherapeutic and antiviral agents (Review)

M.V. Kosevich, O.A. Ryazanova, V.A. Pashynska

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauky Avenue, Kharkiv, Ukraine, 61103

Background: Determination of molecular mechanisms of action of drugs forms a scientific basis for the directed search of efficient medications. Assumed pathways of interactions of chemotherapeutic drugs which affect infectious agents and malignant neoplasm with their potential molecular targets require direct evidences at the molecular level. Such evidences can be obtained by means of molecular biophysics which possesses an arsenal of new powerful physical techniques for studying the intermolecular interactions of biomolecules and pharmaceutical agents.

Objectives: The aim of this review is the generalization of the results of long standing investigations on the molecular mechanisms of action of chemotherapeutic agents performed in the biophysical departments of B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering (ILTPE) of the NAS of Ukraine. The first part of the review is devoted to anticancer and antiviral agents targeted presumably at nucleic acids.

Materials and methods: Mass spectrometric studies of molecules of thermally unstable drugs and their complexes with biomolecules have been advanced significantly due to the development of soft ionization/desorption techniques; the researchers of ILTPE have made noticeable contribution to this field. The methods of molecular spectroscopy and computer modeling by means of quantum chemistry were applied in the combined investigations.

Results: The objects of study were the systems composed of chemotherapeutic drugs – thiophosphamide, phenazine derivatives and phenazine-modified antigene/antisense oligonucleotides, quaternary compounds, tilorone – and their molecular targets – DNA, oligo- and polynucleotides and nucleic acids components. The mechanisms of action of these drugs established at the model molecular level consisted

in the specific and nonspecific noncovalent or covalent interactions of the drugs' molecules with nucleic acids and their components and in the formation of stable drug-target complexes.

Conclusions: The experience of investigations conducted during several decades at the ILTPE has demonstrated the efficiency of the application of the methods and approaches of molecular biophysics to establishing of molecular mechanisms of drugs action. The basic results obtained are of practical importance for the further development of new efficient pharmaceuticals.

KEY WORDS: intermolecular interactions; chemotherapeutic agents; anticancer drugs; nucleic acids; mass spectrometry; molecular spectroscopy.

Информация о молекулярных механизмах действия биологически активных соединений с доказанной или потенциальной фармакологической активностью необходима для разработки более эффективных и менее токсичных лекарственных препаратов, а также для усовершенствования терапевтических схем применения лекарственных агентов. По объекту воздействия лекарственные средства разделяют на две группы: фармакотерапевтические и химиотерапевтические. В то время как фармакотерапевтические препараты воздействуют на функционирование организмов человека или животного, объектами химиотерапевтических препаратов являются возбудители заболеваний – бактерии, вирусы, грибы, а также чуждые организму опухолевые клетки [1]. Для разработки способов воздействия на простейшие патогены на уровне отдельных клеток особое значение приобретает определение молекул-мишеней, взаимодействие с которыми химиотерапевтических препаратов блокирует жизненные функции возбудителей заболеваний. Наряду с биохимическими реакциями, механизмы действия многих химиотерапевтических препаратов основываются на невалентных межмолекулярных взаимодействиях с молекулами-мишенями, изучение которых попадает в сферу задач, решаемых молекулярной биофизикой. Для исследований на уровне отдельных молекул и их невалентных (супрамолекулярных) комплексов необходима разработка соответствующих экспериментальных методов, дополняемых теоретическими расчетами и компьютерным моделированием.

В данном обзоре обобщен опыт изучения молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов в биофизических отделах Физико-технического института низких температур (ФТИНТ) им. Б.И. Веркина НАН Украины [2]. Молекулярно-биофизические исследования в ФТИНТ, инициированные его основателем, академиком АН УССР Веркиным Борисом Иеремиевичем (1919-1990), проводились в нескольких подразделениях института под руководством профессора Благого Юрия Павловича (1929-2018), академика НАН Украины Янсона Игоря Кондратьевича (1938-2011), чл.-корр. НАН Украины Суходуба Леонида Федоровича. Далее биофизические исследования лекарственных препаратов были продолжены их сотрудниками и учениками Пятигорской Т.Л., Зозулей В.Н., Андриевским Г.В., Лиманской (Жилковой) О.Ю., Шелковским В.С., Косевич М.В., Пашинской В.А., Боряком О.А., Степаньяном С.Г., Волошиным И.М., Рязановой О.А.

В течение почти сорока лет одним из актуальных направлений исследований являлось систематическое изучение биофизических аспектов действия различных классов химиотерапевтических препаратов: противоопухолевых, противомикробных и противогрибковых, противомаларийных и противовирусных. Разрабатывались и усовершенствовались соответствующие экспериментальные спектроскопические методы исследования; значительные успехи были достигнуты в развитии современного метода изучения биомолекул – мягкоионизационной масс-спектрометрии [3]. Моделирование структуры и расчет термодинамических параметров межмолекулярных взаимодействий использовались как для интерпретации полученных экспериментальных данных, так и как самостоятельное компьютерное исследование. Часть работ

выполнялась в рамках международных проектов в сотрудничестве с учеными Бельгии, Германии, Венгрии, США, а также из других научных организаций Украины.

В обзоре рассмотрены вопросы разработки экспериментальных методик для биофизических исследований с акцентом на мягкоионизационную масс-спектрометрию и результаты установления с их помощью спектроскопических, масс-спектрометрических, структурных и термодинамических характеристик фармакологических препаратов и их невалентных комплексов с молекулами-мишенями. Первая часть обзора посвящена изучению механизмов действия химиотерапевтических противоопухолевых и противовирусных препаратов, основными молекулярными мишенями которых считаются нуклеиновые кислоты и их компоненты. Во второй части обзора будут рассмотрены механизмы действия противомикробных и противомаларийных агентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Разработка масс-спектрометрических методов исследования биомолекул

В семидесятых-восемидесятых годах прошлого века актуальной задачей, инициированной потребностями развития молекулярной биологии и молекулярной биофизики, стала разработка методов исследования на уровне отдельных биомолекул. Наиболее ярко прогресс в этом направлении проявился на примере масс-спектрометрии, которая проделала путь от узкоспециализированного инструмента фундаментальных ядерно-физических исследований до метода, широко применяемого для решения разнообразных молекулярно-биологических и биомедицинских задач [4-6]. Самой сложной задачей на этом пути явилась разработка методов перевода в газовую фазу без разложения ионизированных молекул термически нестабильных соединений, каковыми является большинство биомолекул и фармакологически активных веществ. Успешное решение этой задачи имело настолько важное значение для прогресса науки в целом, что было отмечено Нобелевской премией 2002 года «за создание мягких методов десорбции/ионизации для масс-спектрометрического анализа биологических макромолекул» (“for their development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules” [7]).

Исследователи ФТИНТ внесли свой вклад в развитие масс-спектрометрических методик для биофизических исследований [2, 3, 8]. Были внедрены и усовершенствованы методы полевой ионизации (ПИ), (Field Ionization, FI) [3, 9, 10], полевой десорбции (ПД), (Field Desorption, FD) [11, 12], бомбардировки быстрыми атомами (ББА), (Fast Atom Bombardment, FAB) и низкотемпературной (НТ) версии вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС), (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS) [13-15].

Возможности, предоставляемые центром коллективного пользования НАН Украины при Институте химии поверхности (ИХП) НАН Украины (г. Киев) [8], были использованы для экспериментов с использованием методов лазерной десорбции/ионизации (ЛДИ), (Laser Desorption/Ionization, LDI) и матрично-активированной ЛДИ (МАЛДИ), (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI). В рамках международных проектов в сотрудничестве с Институтом органической химии Исследовательского центра естественных наук Венгерской академии наук (ИОХ ИЦЕН ВАН, г. Будапешт, Венгрия) и Антверпенским университетом (г. Антверпен, Бельгия) проводили масс-спектрометрические эксперименты с ионизацией электрораспылением (ИЭР) растворов, (Electrospray Ionization, ESI).

2. Спектроскопические и расчетные методы

Свойства биологически активных соединений и их комплексов с молекулами-мишенями (нуклеиновые кислоты) исследовали методами молекулярной спектроско-

пии, такими как абсорбционная спектроскопия в видимой и УФ области, флуоресцентная спектроскопия с использованием поляризационных измерений, термическая денатурация с абсорбционной и флуоресцентной регистрацией кривых плавления. При определении термодинамических параметров перехода спираль-клубок в комплексах нуклеиновых кислот использовали модель «двух состояний». Разработанные молекулярно-биофизические подходы и полученные с их помощью результаты изучения структурных и термодинамических параметров нуклеиновых кислот и их комплексов с биологически-активными веществами обобщены в монографии Благого Ю.П. с соавторами [16].

Компьютерное моделирование выполняли методами квантовой химии в сотрудничестве с Аризонским университетом (США).

3. Объекты исследования

Объектами исследования служили модельные системы, состоящие из химиотерапевтических противоопухолевых и противовирусных препаратов и их биомолекулярных мишеней – нуклеиновых кислот и их компонентов.

В табл. 1 представлены структурные формулы веществ, используемых в качестве химиотерапевтических препаратов, и ряда их производных, исследовавшихся в работах, цитируемых в данном обзоре. Названия, структурные формулы, физико-химические и фармакологические свойства препаратов, а также ссылки на наиболее информативные литературные источники можно найти в базе данных PubChem [17].

Таблица 1. Структурные формулы и названия исследовавшихся химиотерапевтических препаратов

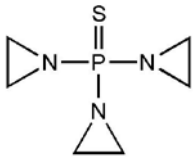
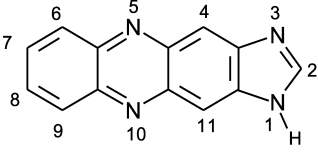
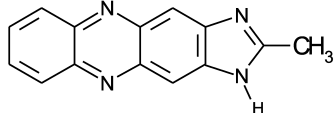
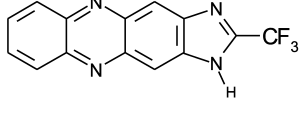
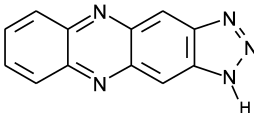
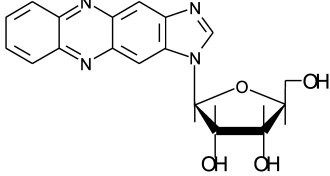
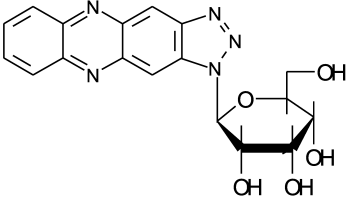
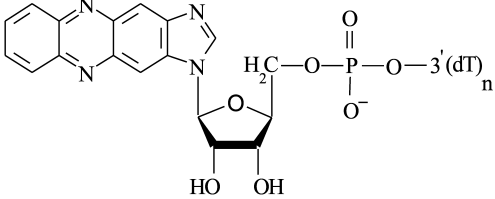
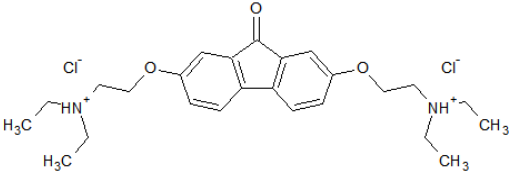
Структурные формулы молекул препаратов	Название, ссылка в базе данных PubChem
	Тиофосфамид, ТиоТЭФ, Thiotepa https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5453
	Имидазо-(4,5-d)-феназин, (F1), 1H-Imidazo[4,5-b]phenazine https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5998849
	2-метилимидазо-(4,5-d)-феназин (F2)
	2-трифторметилимидазо-(4,5-d)-феназин, (F3)
	1,2,3-триазоло-(4,5-d)-феназин, (F4)

Таблица 1 (продолжение). Структурные формулы и названия исследованных химиотерапевтических препаратов

	имидазо-(4,5-d)-феназин-N1-β-D-рибофуранозид, (F1rib)
	1,2,3-триазоло-[4,5-d]-феназин-N1-β-D-глюкопиранозид, (F4gl)
	Конъюгат феназинового красителя с олигонуклеотидом F1rib-(dT) _n (n = 10, 14, 15)
	Тилорон дигидрохлорид, Tilorone dihydrochloride https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/33958

Были исследованы следующие модельные системы, состоящие из химиотерапевтического препарата и его молекулярной мишени:

- химиотерапевтический противоопухолевый препарат тиофосфамид (ТиоТЭФ) и его мишень в опухолевых клетках – ДНК и ее компоненты (азотистые основания, нуклеотиды);
- производные феназина и их гликозиды (потенциальные антибиотические, противораковые, противомаларийные, антипаразитарные, противогрибковые агенты) и олигонуклеотиды;
- модифицированные имидазофеназином антигенные/антисмысловые олигонуклеотиды и синтетические олиго- и полинуклеотиды;
- имидазофеназин-порфириновый конъюгат, его металлизированные производные и синтетические олиго- и полинуклеотиды (в том числе теломерные, образующие G-квадруплексы), а также клеточные культуры легочной карциномы Льюиса мышей;
- бисчетвертичные аммониевые соли и ДНК;
- противовирусный препарат тилорон и компоненты нуклеиновых кислот ДНК и РНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение химиотерапевтических препаратов масс-спектрометрическими, спектроскопическими и расчетными методами

1.1. Противоопухолевые алкилирующие препараты

Разработка мягкоионизационных масс-спектрометрических методик для исследования низколетучих термически нестабильных молекул обеспечила значительный прогресс в изучении химиотерапевтических препаратов, поскольку позволила впервые зарегистрировать информативные масс-спектры, содержащие неразрушенные молекулярные ионы.

Для химиотерапевтического противоопухолевого препарата тиофосфамида впервые были зарегистрированы масс-спектры в режимах ПИ [18, 19] и БА [20]. Данные о продуктах гидролиза препарата, полученные сочетанием методов тонкослойной хроматографии и ПИ [18, 19], представляли интерес для фармакологов, занимающихся разработкой алкилирующих агентов. Расчетными методами были выявлены различия в структуре молекулы тиофосфамида в кристаллической и газовой фазе [21], на основании чего сделаны рекомендации относительно выбора конформации молекулы при проведении корреляций структура-активность и моделировании процессов «узнавания» при взаимодействии препарата с мишенью. Проведен конформационный анализ, определивший параметры вращения азиридиновых колец тиофосфамида, определяющих возможность его подстраивания к молекуле-мишени [22]. В рамках вопросов фундаментальных основ масс-спектрометрии актуальными были исследования влияния электрического поля высокой напряженности в условиях ПИ на перераспределение электронной плотности в молекуле тиофосфамида, вызывающее явление полевой полимеризации [21], и обусловленные этим эффекты образования достаточно экзотических двухзарядных фрагментных ионов [23].

Также были получены масс-спектрометрические характеристики для серий разрабатывавшихся в свое время соединений с потенциальной противоопухолевой активностью на основе производных арил- и ариaldiэтилентриамидов фосфорной кислоты [24, 25].

Вклад работ биофизиков ФТИНТ в международную копилку знаний о свойствах и механизмах действия химиотерапевтических препаратов отмечен включением работ [10, 19, 21, 23] в обобщающую монографию 2006 года «Novel Anticancer Agents. Strategies for Discovery and Clinical Testing» [26].

1.2. Четырехциклические производные феназина

Многие органические красители, гетероциклические молекулы которых имеют планарную структуру, относятся к противоопухолевым агентам, основным механизмом действия которых является интеркаляция (встраивание) между парами оснований в двуспиральной ДНК. Наряду с такими невалентными взаимодействиями, некоторые механизмы биологического действия этих гетероциклических соединений обусловлены их химическими окислительно-восстановительными (редокс) свойствами.

Ряд новых четырехциклических производных феназина – нейтральных амфотерных соединений, отличающихся различными заместителями в пятичленном кольце и являющихся потенциальными химиотерапевтическими агентами с антибиотическим, противораковым, противомаларийным, противопаразитическим и противогрибковым действием – был всесторонне исследован с использованием спектроскопических и

теоретических методов [27-30]. Было проведено комплексное изучение зависимости спектроскопических (в том числе флуоресцентных) свойств производных (соединения F1-F4 в табл. 1), а также их гликозидов (соединения F1gib и F4gl в табл. 1) от pH [27], полярности и протондонорной способности растворителя [28, 29]. Установлены диапазоны существования и спектроскопические характеристики ионных форм красителей, определены места и константы их протонирования/депротонирования [27]. Сделаны выводы о влиянии заместителей в пятичленном кольце на спектроскопические и электронные свойства феназинов. Квантовохимическими методами определены конфигурации их изолированных молекул, распределение зарядов на атомах, рассчитаны величины дипольных моментов молекул в основном состоянии (показано, что дипольные моменты молекул лежат в плоскости молекулы и направлены практически перпендикулярно ее длинной оси), онзагеровских радиусов и молекулярного объема [28]. По изменениям спектров определены изменения дипольных моментов феназиновых производных при оптическом возбуждении, рассчитаны энергии электронных $S_1 \leftarrow S_0$ переходов в различных растворителях, построена энергетическая диаграмма, иллюстрирующая влияние заместителей в имидазольном кольце [28]. Обнаружено, что при переходе от кислых растворов к нейтральным наблюдается шестидесятикратный рост интенсивности флуоресценции имидазофеназина (F1), что позволило предложить использование данного красителя в качестве pH-сенсора в диапазоне pH от 1 до 7 [27]. Также был обоснован выбор красителя для ковалентной модификации им антисмысловых/антигенных олигонуклеотидов с целью повышения их терапевтической эффективности.

Методом ИК спектроскопии были впервые изучены спектры поглощения производных феназина в низкотемпературной аргоновой матрице (10 K) [30]. Анализ спектров, проведенный с использованием частот и интенсивностей гармонических колебаний, рассчитанных квантово-механическим методом DFT, показал хорошее согласие экспериментальных и расчетных данных.

Масс-спектрометрические характеристики для серии красителей – производных имидазофеназина (соединения F1-F5 в табл. 1), были получены с использованием набора десорбционно-ионизационных методов БА, ЛДИ, МАЛДИ [31-33]. Новизной этих работ стало наблюдение в условиях масс-спектрометрических экспериментов редокс превращений красителей.

Продукты восстановления красителей путем присоединения одного и двух атомов водорода легко идентифицировали по изменению массы исходного соединения. На основании анализа интенсивностей пиков этих продуктов в масс-спектрах с БА был построен ряд эффективности восстановления для серии производных имидазофеназина с различными заместителями, который хорошо коррелировал со значениями энергии низшей вакантной молекулярной орбитали (НВМО), рассчитанной квантово-химическими методами [31]. Учитывая эти результаты, была предложена методика экспресс-скрининга восстановительной активности красителей по данным масс-спектрометрического контроля, обычно проводимого при синтезе новых веществ [31, 33]. Также были установлены зависимости интенсивности редокс-процессов в зависимости от варьирования условий масс-спектрометрического эксперимента с использованием методик МАЛДИ, ЛДИ с металлической или графитовой поверхности, ИЭР, низкотемпературной ВИС и БА в режимах положительных и отрицательных ионов [32]. С точки зрения функциональной активности красителей, полученные результаты указывали на высокую чувствительность их редокс-активности к балансу электронов и протонов в реакционной системе. С точки зрения развития фундаментальных основ масс-спектрометрии, обнаруженные эффекты позволили провести оценку вклада

процессов ПИ и ПД в механизм генерации ионов при ЛДИ с наноструктурированных графитовых поверхностей [34].

2. Взаимодействие алкилирующих противоопухолевых препаратов с компонентами нуклеиновых кислот

Разработка новых противоопухолевых средств во второй половине прошлого века была активизирована осознанием того факта, что их основной молекулярной мишенью может являться ДНК пролиферирующих клеток. При конструировании химиотерапевтических препаратов испытывались вещества с разной структурой, которые могли воздействовать на ДНК по различным механизмам. Выделяют три основных вида взаимодействия противораковых агентов с ДНК: модификация азотистых оснований ДНК посредством химических реакций, невалентные взаимодействия путем встраивания (интеркаляции) плоских частей молекул препаратов между парами оснований и/или укладки молекул в бороздки двойной спирали ДНК [26]. В рамках междисциплинарных комплексных исследований, проводившихся во всем мире, необходимо было получить прямые доказательства ковалентных или невалентных взаимодействий препаратов с молекулой ДНК, и биофизики ФТИНТ приняли активное участие в решении этой задачи.

При создании препаратов, вызывающих химическую модификацию азотистых оснований ДНК, использовали соединения, способные к реакции алкилирования – присоединения к основаниям алкильных групп, препятствующих комплементарному спариванию и узнаванию оснований. Поскольку результаты ранних исследований действия алкилирующих препаратов, проводившихся во ФТИНТ, уже обсуждались в ряде обзоров [10, 11, 35], здесь мы приведем лишь наиболее значимые результаты. В работах исследователей ФТИНТ, благодаря использованию новых возможностей мягкоионизационной масс-спектрометрии, впервые были получены данные о результатах взаимодействия препарата алкилирующего действия – тиофосфамида – с ДНК и ее компонентами [11, 36-41]. На уровне модельных систем (азотистое основание + тиофосфамид) были обнаружены продукты ковалентного взаимодействия препарата со всеми основаниями ДНК. С помощью методов ПИ, ПД, ББА впервые была проведена прямая идентификация продуктов, представлявших собой комплексы оснований с одной и двумя присоединившимися молекулами препарата, комплексы с этиленимином, источником которого являются азиридиновые кольца тиофосфамида, и ряд других продуктов алкилирования оснований [11, 36-39]. Также были зарегистрированы комплексы одной молекулы препарата с двумя молекулами оснований, что может моделировать образование сшивок между двумя нитями ДНК. С использованием набора метилпроизводных оснований, в которых метильные группы блокируют определенные реакционноспособные атомы, удалось установить центры связывания препарата с основаниями, каковыми являются N1 цитозина, N3 тимина, N9 аденина. Данные относительно отдельных оснований имеют самостоятельную ценность, поскольку свидетельствуют о возможности образования в клетках модифицированных оснований – предшественников синтеза ДНК, существование которых было ранее предложено для объяснения задержанного мутагенного эффекта препарата.

Далее были проведены исследования на уровне молекул ДНК с использованием методов тонкослойной хроматографии, УФ-спектроскопии и ББА масс-спектрометрии [40, 41]. Было обнаружено выщепление из ДНК алкилированных пуриновых оснований (так называемая депуринизация) – N3-монотиотэфпроизводного аденина и N7-монотиотэфпроизводного гуанина. Такие продукты алкилирования оснований, образуясь в

ДНК, могут служить структурным фактором, обуславливающим терапевтический эффект тиофосфамида.

Существенный вклад в установление механизмов взаимодействия алкилирующих препаратов этиленимина и тиофосфамида с ДНК внесли работы Андриевского Г.В., выполненные в сотрудничестве с Институтом химической физики АН СССР [43-44] и продолженные во ФТИНТ [40].

Масс-спектрометрические исследования взаимодействия химиотерапевтических препаратов с компонентами нуклеиновых кислот были продолжены Суходубом Л.Ф. и его учениками в Институте прикладной физики НАН Украины (г. Сумы) [10, 35, 45-50] и Сумском государственном университете МОН Украины [51, 52].

3. Взаимодействие производных феназина с нуклеиновыми кислотами

Другим типом потенциальных противораковых агентов, исследовавшихся во ФТИНТ, являлись гетероциклические соединения – интеркаляторы, молекулы которых имеют плоскую структуру. К таким веществам относятся производные феназина. В исследование механизмов действия этих агентов большой вклад внес Зозуля В.Н., многие годы возглавлявший группу флуоресцентной спектроскопии в отделе молекулярной биофизики ФТИНТ.

3.1. Взаимодействие феназиновых производных с ДНК и синтетическими полинуклеотидами различного состава и структурной организации

Методами поляризованной флуоресценции и абсорбционной спектроскопии было изучено взаимодействие производных феназина, относящихся к гликозидам и четвертичным солям, с нативной ДНК [53, 54] и синтетическими одно- и двухнитевыми полинуклеотидами poly(A), poly(G), poly(A,G), poly(dA)·poly(dT), poly(A)·poly(U), poly(dG)·poly(dC), poly(G)·poly(C) [54]. Определены спектроскопические характеристики свободных красителей и их комплексов с нуклеиновыми кислотами, константы связывания с ДНК и полинуклеотидами при низкой ионной силе растворов и условиях, близких к физиологическим. Показано, что основным типом связывания феназинов с нейтральной формой хромофора является интеркаляция молекул красителя между плоскостями оснований двойной спирали ДНК. Для катионных красителей, помимо интеркаляционного механизма, существенный вклад в комплексообразование вносит кооперативное электростатическое взаимодействие с фосфатными группами нуклеиновых кислот, проявляющееся за счет гидрофобных эффектов как при низкой, так и при умеренной ионных силах. При анализе процесса связывания использовали уравнения МакГи и ван Хиппела, модифицированные для учета энергии кулоновского отталкивания между адсорбированными молекулами красителя, что позволяет с хорошей точностью описать экспериментальные изотермы связывания.

Было установлено, что при интеркаляции в двухнитевые полинуклеотиды, образованные G·C парами, наблюдается тушение флуоресценции феназиновых красителей, а при связывании с A·T и A·U последовательностями – ее усиление. Для протяженных двухнитевых дезоксирибонуклеотидов связывание феназинов с G·C парами было предпочтительнее, чем с A·T, в то время как для полирибонуклеотидов связывание с G·C последовательностями слабее, чем с A·U. При связывании с однонитевыми полинуклеотидами наблюдался стэкинг хромофоров красителей с нуклеотидными основаниями. При этом гуаниновые основания тушили флуоресценцию катионного феназина, а остальные приводили к увеличению ее квантового выхода. Для нейтрального хромофора наблюдалось тушение его флуоресценции обоими пуриновыми основаниями. Противоположные изменения интенсивности

флуоресценции присоединенного имидазофеназина, наблюдаемые при его связывании с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, позволяют использовать его в качестве флуоресцентного зонда корректности молекулярной гибридизации антисмысловых олигонуклеотидов.

Эти исследования выполнялись в сотрудничестве с коллегами из Института молекулярной биотехнологии (г. Йена, Германия) и Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины (г. Киев).

3.2. Влияние феназинового красителя, ковалентно присоединенного к концу антисмыслового олигонуклеотида, на стабильность образуемых им двух- и трехспиральных комплексов с полинуклеотидами

Высокая биологическая активность феназиновых красителей, обусловленная, в частности, их способностью интеркалировать между основаниями нуклеиновых кислот, дает возможность использовать эти вещества для повышения эффективности лекарственных препаратов для противораковой и противовирусной терапии на основе антисмысловой и антигенной стратегии. Суть этой стратегии состоит в том, что антисмысловые олигонуклеотиды, образующие двухспиральные комплексы с РНК, и антигенные олигонуклеотиды, образующие трехспиральные комплексы с ДНК, действуют как блокировщики экспрессии генетического кода. Модификация олигонуклеотидов интеркалирующими флуоресцентными красителями повышает сродство связывания антисмысловых и антигенных олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами (мишенями) при сохранении высокой сиквенс-специфичности, что позволяет эффективно регулировать экспрессию генов, блокируя процессы репликации, транскрипции или трансляции, а также облегчает доставку олигонуклеотидов в клетки и существенно улучшает их резистентность к действию экзонуклеазы *in vivo*.

В работах [55-59] методами молекулярной спектроскопии и термической денатурации с регистрацией по поглощению и флуоресценции изучены комплексы антисмысловых олигонуклеотидов $(dT)_n$ ($n = 10, 14, 15$), модифицированных имидазофеназиновым производным F1rib, с комплементарными биополимерами - мишенями: олигонуклеотидом $(dA)_{15}$, однонитевыми полинуклеотидами $poly(rA)$, $poly(dA)$, двухнитевым $poly(dA) \cdot poly(dT)$. Установлено, что ковалентное присоединение красителя к 3'-концу олигонуклеотидной последовательности существенно повышает термостабильность образуемых двух- и трехспиральных структур за счет интеркаляции хромофора между плоскостями адениновых оснований, что обеспечивает дополнительную энергию связывания (рис. 1, рис. 2). При этом повышение температуры перехода спираль-клубок в олигонуклеотид-полинуклеотидных комплексах тем больше, чем короче олигонуклеотид.

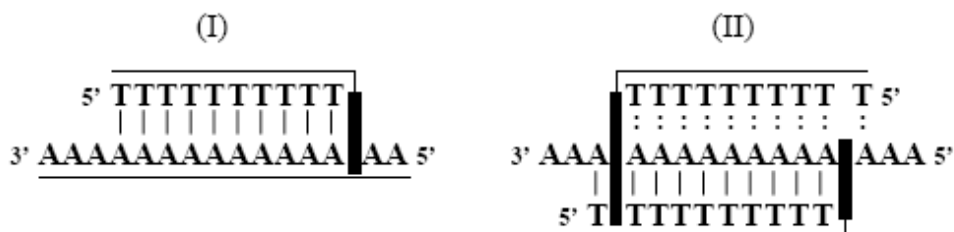


Рис. 1. Схемы комплексов, которые могут быть образованы конъюгатом $(dT)_{10}F1rib$ с олигонуклеотидом $(dA)_{15}$: дуплекс $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}F1rib$ (I) и триплекс $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}F1rib$ (II). Черным прямоугольником обозначен хромофор имидазофеназина. Рисунок воспроизведен из работы [56] по лицензии издательства John Wiley and Sons.

Данный способ модификации имеет преимущество по сравнению с присоединением красителя через гибкий линкер, так как обеспечивает предопределенное положение хромофора в нуклеотидной последовательности при комплексообразовании. Оценено влияние присоединенного к олиготимидилату, (dT)_n, феназинового красителя на изменение термодинамических потенциалов ΔH , ΔS , ΔG при конформационном переходе спираль – клубок. Предложенный метод модификации антисмысловых олигонуклеотидов существенно повышает эффективность их терапевтического действия. Эти исследования выполнялись в сотрудничестве с коллегами из Отдела синтетических биорегуляторов Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины (г. Киев).

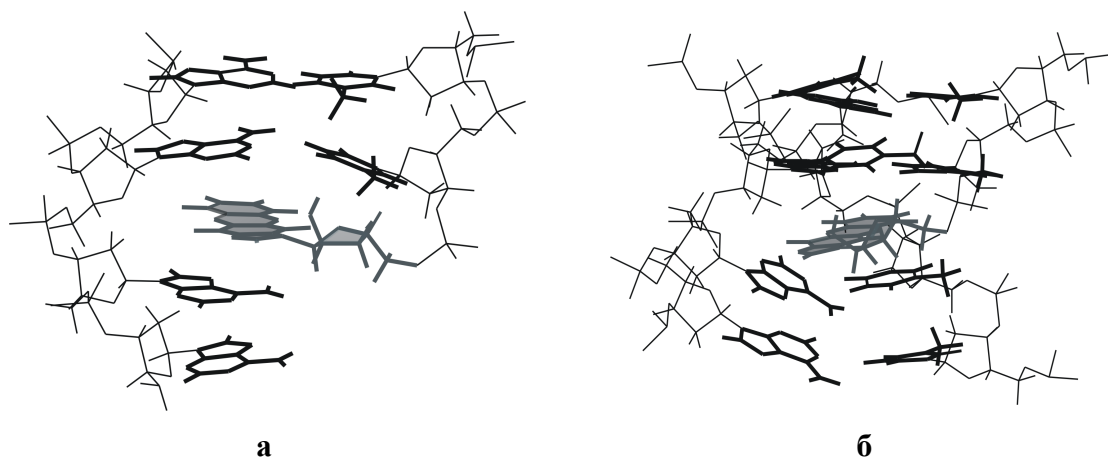


Рис. 2. Вид минимизированных по энергии структур дуплекса (dA)₁₅·(dT)₁₀F1rib (A) и триплекса (dA)₁₅·(dT)₁₅·(dT)₁₀F1rib (B), где показаны сегменты спиралей, содержащие интеркалированный краситель F1rib (затемнен). Рисунок воспроизведен из работы [56] по лицензии издательства John Wiley and Sons.

Приведенный в работах [55-59] способ 3'-модификации олигонуклеотидов может быть применен для повышения эффективности молекулярной гибридизации олигонуклеотидов. Данные о стабилизирующем влиянии феназинового красителя, ковалентно присоединенного к олигонуклеотиду, могут быть использованы при разработке терапевтических противораковых и противовирусных препаратов ген-направленного действия на основе синтетических антисмысловых и антигенных олигонуклеотидов.

3.3. Взаимодействие порфирин-феназиновых конъюгатов с G-квадруплексами

С целью поиска новых противораковых препаратов нашими коллегами из Отдела синтетических биорегуляторов Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины (г. Киев) были синтезированы конъюгат имидазофеназина с трехкатионным производным мезо-порфирина TMPyP4 (TMPyP³⁺-ImPzn, Рис. 3) и его металлизированные ионами Zn²⁺ и Mn³⁺ производные, в которых флуоресцирующие гетероароматические молекулы соединены гибким алкиламидным линкером [60] (рис. 3).

Известно, что TMPyP4 селективно накапливается в раковых клетках и является фотосенсибилизатором для фотодинамической терапии рака, а также стабилизатором G-квадруплексов. Предполагалось, что при связывании с теломерной ДНК порфириновая часть конъюгатов будет стабилизировать G-квадруплексы, тогда как имидазофеназин усилит эффект путем интеркаляции в двухспиральный участок нуклеиновой кислоты.

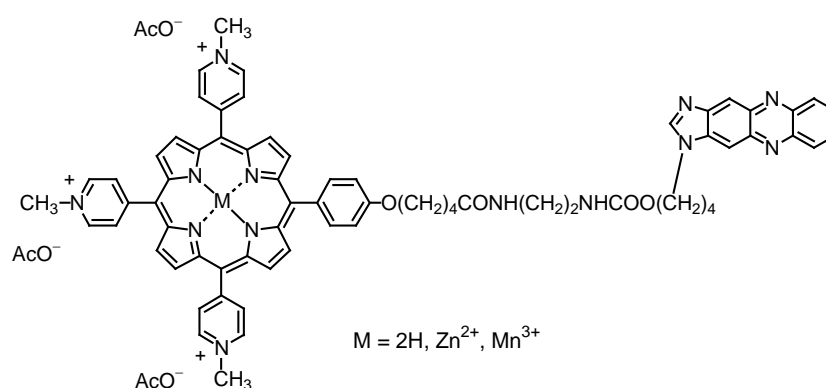


Рис. 3. Структурная формула конъюгата $TMPyP^{3+}-ImPzn$ и его металлопроизводных.

Тестирование антипролиферативной активности конъюгатов *in vitro* на клеточных культурах легочной карциномы Льюиса мышей (LLC) подтвердили их высокую биологическую активность (табл. 2). Самая высокая IC_{50} 5,9 мкМ наблюдалась для цинкового конъюгата, что в 3,7 раза выше, чем для неметаллизированного [60].

Таблица 2. Ингибирование опухолевых клеток LLC порфириновыми конъюгатами [60]

Конъюгат	IC_{50}^* , мкМ
$TMPyP^{3+}-ImPzn$	$21,8 \pm 5,2$
$Zn(II) TMPyP^{3+}-ImPzn$	$5,9 \pm 1,1$
$Mn(III) TMPyP^{3+}-ImPzn$	$11,2 \pm 2,4$

* IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования – показатель эффективности лиганда при ингибирующем биохимическом или биологическом взаимодействии. IC_{50} является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования биологического процесса на 50 %.

Методами молекулярной спектроскопии и термической денатурации было проведено исследование спектроскопических свойств синтезированных конъюгатов и их комплексов с олигонуклеотидом теломерной последовательности человека, Tel22, образующим мономолекулярный G-квадруплекс [61], а также с модельным тетрамолекулярным квадруплексом, образованным синтетическим полинуклеотидом poly(G) [62, 63]. Показано, что все соединения имеют высокое сродство к квадруплексам Tel22 и poly(G). В зависимости от соотношения молярных концентраций полимер/краситель наблюдается два конкурирующих типа связывания, которые характеризуются существенным изменением формы, интенсивности и положения полос в спектрах поглощения и флуоресценции. В рамках модели двух состояний определены изменения термодинамических параметров образования квадруплексов, вызванные связыванием с конъюгатами. Показано, что металлоконъюгаты стабилизируют структуру квадруплекса Tel22, десятикратно увеличивая равновесную константу его формирования при физиологической температуре.

Установлено, что оба компонента неметаллизированного $TMPyP^{3+}-ImPzn$ образуют внутримолекулярный гетеродимер, который встраивается в бороздку квадруплексной poly(G) как единое целое. Металлизированные конъюгаты димер не образуют (Zn^{2+} и Mn^{2+} ионы образуют координационную связь с молекулами воды, которые препятствуют формированию гетеродимеров), что позволяет обеим частям конъюгата по отдельности связываться с нуклеиновыми кислотами. Предполагается, что

порфириновая часть встраивается в бороздку poly(G), а феназиновая – интеркалирует между ее основаниями (рис. 4).

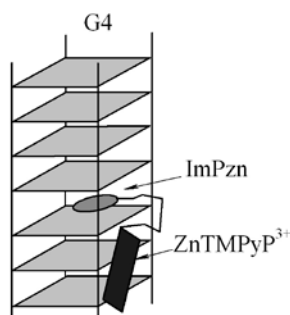


Рис. 4. Схематическое изображение встраивания $ZnTMPyP^{3+}$ части конъюгата в бороздку poly(G) и интеркаляция ImPzn части между гуаниновыми основаниями. Рисунок из работы [63] воспроизведен по лицензии издательства Springer Nature.

Усиленная стабилизация квадруплексной ДНК обеими компонентами металлоконъюгата может быть причиной их повышенной антипролиферативной активности, которая проявляется в нарушении теломеразной активности и угнетении роста раковых клеток.

4. Взаимодействие бисчетвертичных аммониевых соединений с нуклеиновыми кислотами

Молекулы соединений, выбираемых для взаимодействия с ДНК путем укладки в бороздки двойной спирали, должны иметь вытянутую (протяженную) структуру и нести положительный заряд, способствующий электростатическим взаимодействиям с фосфатными группами ДНК. Этим критериям удовлетворяют бисчетвертичные аммониевые соединения (БЧАС) декаметоксин и этоний, относящиеся к противомикробным препаратам. Основным механизмом их действия, как будет показано во второй части обзора, считается взаимодействие с мембранами бактериальных клеток. Особый интерес к БЧАС обусловлен тем, что они, как было установлено ранее, являются малотоксичными для человека и не обладают мутагенным или тератогенным действием. Однако не исключена возможность их взаимодействия (в определенных условиях) с нуклеиновыми кислотами патогенов. Предполагалось, что воздействие БЧАС на ДНК должно проходить по неинтеркаляционному механизму путем укладки их дикатионов в бороздки двунитевой ДНК. Для проверки этой гипотезы был проведен ряд исследований взаимодействия этония [64, 65] и декаметоксина [66, 67] с ДНК с использованием спектроскопических методик, разработанных ранее Благим Ю.П. с сотрудниками для изучения взаимодействия ионов металлов с нуклеиновыми кислотами [16]. Обнаружено влияние этих БЧАС на параметры плавления ДНК, доказывающее их связывание с нуклеиновыми кислотами. Обнаружена специфичность дикатионов БЧАС к участкам ДНК, обогащенным А-Т парами.

Оценивая достижения современной масс-спектрометрии, следует отметить, что бельгийскими исследователями Э. Де По и В. Габеликой был предложен метод получения в условиях масс-спектрометрии с ИЭР зависимостей, подобных кривым плавления ДНК [68, 69]. Этот метод был применен для исследования термодинамики связывания химиотерапевтических препаратов с бороздками двунитевых ДНК. Мы приводим данный пример как показательную демонстрацию возможностей нестандартных применений масс-спектрометрии в решении биофизических задач, а также дополнения данных о физико-химических параметрах нуклеиновых кислот в конденсированном состоянии данными об их свойствах в газовой фазе [69].

5. Исследования межмолекулярных взаимодействий противовирусного препарата тилорона с биомолекулами-мишенями и их компонентами

Наряду с исследованиями молекулярных механизмов действия противоопухолевых и противомикробных препаратов, наше внимание привлекают и исследования противовирусных агентов. Среди таких объектов – интерферон-индуцирующий агент тилорон, молекулярные механизмы антивирусного действия которого остаются предметом научной дискуссии, несмотря на его активное использование в качестве действующего вещества ряда современных фармакологических препаратов. Для прояснения этого вопроса совместно с сотрудниками Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины было проведено исследование взаимодействий тилорона с потенциальными биомолекулами-мишенями: нуклеиновыми кислотами и их компонентами – нуклеозидами, содержащими как пуриновые, так и пиримидиновые азотистые основания [70].

С целью изучения возможной агрегации тилорона с его потенциальными мишенями - одноцепочечными РНК (ssRNA), полученными из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, методом динамического светорассеяния была исследована система (тилорон + РНК) в растворе натрий-фосфатного буфера с добавлением 10% сыворотки крови телят, т.е. в условиях, приближенных к физиологическим. Было обнаружено, что введение тилорона в раствор РНК вызывало формирование в модельной системе агрегатов тилорон + ssRNA, которые более чем в 10 раз превышали по размеру частицы, присутствовавшие в исходном растворе РНК.

Метод масс-спектрометрии с ИЭР применялся для исследования межмолекулярных взаимодействий в модельных бинарных системах «тилорон + нуклеозид» (Ado или Thd, или Urd) и трехкомпонентной системе «тилорон + Ado + Urd», растворенных в полярном растворителе метаноле. Масс-спектры всех исследованных бинарных систем «тилорон+нуклеозид» содержали пики ионов, характерных для индивидуальных компонентов смеси, а в спектре системы (тилорон + Urd) наряду с этим обнаружен достаточно интенсивный сигнал стабильного супрамолекулярного комплекса $Urd \cdot Til \cdot 2H^{2+}$. Исследование трехкомпонентной модельной системы «тилорон + Ado + Urd» подтвердило данные о возможной селективности связывания тилорона с нуклеозидами, поскольку при наличии в спектре системы пика нековалентного комплекса $Urd \cdot Til \cdot 2H^{2+}$ пики кластеров Ado с тилороном в спектре не обнаружены. Полученные данные свидетельствуют о возможности формирования стабильных нековалентных комплексов тилорона с одноцепочечными РНК и их компонентами в биологических системах и указывают на Urd как на один из потенциальных центров специфического связывания тилорона с молекулами РНК [70].

ВЫВОДЫ

Опыт исследований, проводившихся в течение нескольких десятилетий во ФТИНТ, продемонстрировал эффективность применения молекулярно-биофизических подходов и методов к установлению молекулярных механизмов действия ряда лекарственных препаратов, молекулярными мишенями действия которых в живых системах являются нуклеиновые кислоты и их компоненты.

Показано, что в каждой из перечисленных выше систем «химиотерапевтический препарат – предполагаемая мишень» такие механизмы состоят в специфических или неспецифических невалентных или ковалентных взаимодействиях и в формировании стабильных супрамолекулярных комплексов молекул лекарственного агента и биомолекулы-мишени. Методы мягкоионизационной масс-спектрометрии позволили зарегистрировать такие комплексы молекул лекарственных препаратов с компонентами

нуклеиновых кислот. Методы молекулярной спектроскопии и квантово-химические расчеты позволили установить структурные, электронные и энергетические характеристики препаратов и их комплексов с нуклеиновыми кислотами.

Полученные результаты могут представлять практический интерес для поиска новых эффективных химиотерапевтических препаратов, а также при разработке новых методик лечения различных заболеваний, включая вирусные и онкологические.

БЛАГОДАРНОСТИ

Этот обзор авторы посвящают памяти многолетнего руководителя отдела молекулярной биофизики ФТИНТ, одного из основателей Харьковской школы биофизики, видного украинского физика и биофизика профессора Благого Юрия Павловича. Его активная преподавательская деятельность на кафедре молекулярной и прикладной биофизики Харьковского национального университета, эффективное научное руководство аспирантами и сотрудниками отдела, полученные весомые научные результаты внесли неоценимый вклад в развитие биофизической науки в Украине, включая исследования, которым посвящен данный обзор. Авторы обзора благодарны всем соавторам цитируемых работ за вдохновляющее творческое сотрудничество.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Authors' ORCID ID

M.V. Kosevich  <http://orcid.org/0000-0003-0257-4588>
 O.A. Ryazanova  <https://orcid.org/0000-0002-8277-8611>
 V.A. Pashynska  <https://orcid.org/0000-0001-9786-6828>

REFERENCES

1. Mashkovskii, M. D. (2011) *Lekarstvennye sredstva: posobie dlia vrachei [Medicines: A Handbook for Physicians]*. Moskva: Novaia volna. (in Russian)
2. Gnatchenko, S. L. (Ed). (2010). *Fiziko-tehnicheskij institut nizkih temperatur im. B.I. Verkina NAN Ukrainy. 50 let [Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine. 50 years]*. Kiev: Naukova dumka. (in Russian)
3. Verkin, B. I., Yanson, I. K., Sukhodub, L. F., Teplitsky, A. B. (1985). *Vsaimodejstviia biomolekul. Novye eksperimental'nye podhody i metody. [Interactions of biomolecules. New experimental approaches and methods]*. Kiev: Naukova dumka. (in Russian)
4. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S. (2000) Progress of mass spectrometric technique for biomedical experiments as an example of influence of social demands on the advancement of science. *Visnyk Kharkivskoho universytetu No 497. Biofizychnyi visnyk [Biophysical Bulletin]*, (7), 84–99. (in Russian)
5. Vékey, K. (2012). Applications to small biomolecules and developments in Central and Eastern Europe. In K. R. Jennings (Ed.), *A History of European Mass Spectrometry* (pp. 195-212). Chichester: IM Publications
6. Siuzdak, G. (2003). *The expanding role of mass spectrometry in biotechnology*. San Diego: MCC Press.
7. Nobelprize.org. Nobel Media AB (2002). The 2002 Nobel Prize in Chemistry - Advanced Information. Retrieved from <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/advanced-information/>
8. Pokrovskiy, V. A. (2012). Desorption mass spectrometry: physics, physical chemistry, surface chemistry. *Visnyk Natsionalnoi Akademii Nauk Ukrainy [Visnyk of the National Academy of Sciences of Ukraine]*, (12), 28-43. (in Ukrainian)
9. Sukhodub, L. F. (1977). *Mass-spektrometricheskoe issledovanie mezhmolekuliarnyh vzaimodeistvii azotistyh osnovanii nukleinovykh kislot v vacuume [Mass spectrometric study of intermolecular interactions of nitrogen bases in vacuum]* (PhD dissertation). Retrieved from <https://search.rsl.ru/ru/record/01009515558> (OD Дк 77-1/765). (in Russian)

10. Sukhodub, L. F. (1995). Soft-ionization mass spectrometry study of deoxynucleoside bioclusters and deoxynucleoside-antitumor medicinal preparation clusters // *Mass Spectrometry Reviews*, 14(4-5), 235-254. doi: 10.1002/mas.1280140402
11. Kosevich, M. V. (1989). *Molekuliarnyi analiz lekarstvennykh preparatov i produktov ih vzaimodeistviia s DNK i ee komponentami po dannym miagkoionizatsionnoi mass-spektrometrii* [Molecular analysis of medicines and products of their interaction with DNA and its components according to soft ionization mass spectrometry]. (PhD dissertation). Retrieved from <https://search.rsl.ru/ru/record/01008471022> (OD 61 89-1/1884). (in Russian)
12. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Pashynska, V. A. (1993). Novyi tip emitterov na osnive poverkhnosti izloma grafita dlia mass-spektrometrii s polevoi ionizatsiei i polevoi desorbtsiei [New type of emitters based on graphite fracture surface for mass spectrometry with field ionization and field desorption]. *Doklady AN Ukrainy* [Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine], (9), 75-79. (in Russian)
13. Kosevich, M.V. (2001). *Physical mechanisms of secondary emission of clusters from condensed matter at low temperatures*. (Doctor of Sciences dissertation). Retrieved from Vernadsky National Library of Ukraine, Kiev. (JC71291). (in Russian)
14. Kosevich, M. V. (1998) Low temperature secondary emission mass spectrometry. Cryobiological applications. *European Mass Spectrometry*, 4(4), 251-264. doi: 10.1255/ejms.218
15. Blagoi, Yu. P., Sheina, G. G., Ivanov, A. Yu., Radchenko, E. D., Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A., Rubin, Yu. V. (1999). Low-temperature experimental studies in molecular biophysics: a review. *Low Temperature Physics*, 25(10), 747-760. doi:10.1063/1.593810
16. Blagoi, Yu. P., Galkin, V. L., Gladchenko, G. O., Kornilova, S.V., Sorokin, V. A., Shkorbatov, A. G. (1991). *Metallokompleksy nukleinykh kislot v rastvorah* [Metal complexes of nucleic acids in solutions]. Kiev: Naukova Dumka. 269 p. (in Russian)
17. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (2018). PubChem Compound Database. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
18. Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Y., Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Grizodub, A. I., Sukhodub, L. F. (1985). Izuchenie produktov prevrashhenija tiofosfamida v vodnykh rastvorah metodami tonkoslojnoj hromatografii i mass-spektrometrii [Study of thiophosphamide transformation products in water solutions by means of thin layer chromatography and mass spectrometry]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* [Pharmaceutical Chemistry Journal], 19(10), 1235--241. (in Russian)
19. Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Y., Shelkovsky, V. S., Arkhangelova, N. M., Grizodub, A. I., Sukhodub, L. F. (1987). Hydrolysis of 1, 1', 1''-phosphinothiolydinetrizaziridine (thiotepa) in aqueous solution. *Biological Mass Spectrometry*, 14(4), 143-148. doi: 10.1002/bms.1200140402
20. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A., Stepanov, O. I. (1991). Fast atom bombardment mass spectra of thiotepa. *Organic Mass Spectrometry*, 26(6), 619-620. doi: 10.1002/oms.1210260615
21. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Stepanyan, S. G. (1996). Dependence of the biological activity and mass spectrometric pattern on the structure peculiarities of the molecule of alkylating drug thiotepa. *Biophysical Chemistry*, 57(2-3), 123-131. doi: 10.1016/0301-4622(95)00053-6
22. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Stepanyan, S. G., Boryak, O. A., Tretiak, S. M., Telezhenko, Yu. V. (1991). Vozmozhnosti izucheniia fiziko-khimicheskikh kharakteristik veshstva s ispolzovaniem mass-spektrometrii s razlichnymi vidami ionizatsii na primere preparata TioTEF. [Possibilities of study of physico-chemical characteristics of substances by means of mass spectrometry with different ionization modes exemplified by ThioTEPA drug]. *Preprint of Institute for Low Temperature Physics, Kharkov*. (3-91). 1-46. (in Russian)
23. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S. (1990). On the formation of doubly charged fragment and cluster ions of oxygen- and sulfur-containing substances in field ionization and field desorption mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 4(12), 493-494. doi: 10.1002/rcm.1290041202
24. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Boldeskul, I. E., Protsenko, L. D. (1989). Mass-spektrometricheskoe issledovanie arildijetilentriamidov fosfornoj kisloty [Mass spectrometric study of aryldiethylenetriamides of phosphoric acid]. *Ukrainskii Khimicheskii Zhurnal*, 55(6), 642-645. (in Russian)
25. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Boldeskul, I. E., Protsenko, L. D. (1989). Acildijetilentriamidy fosfornoj kisloty: mass-spektrometricheskoe issledovanie [Acyldiethylenetriamides of phosphoric acid: mass-spectrometric investigation]. *Ukrainskii Khimicheskii Zhurnal*, 55(7), 752-757. (in Russian)
26. Powers, R., Siegel, M. M. (2006). *Applications of nuclear magnetic resonance and mass spectrometry to anticancer drug discovery*. In A. A. Adjei, J. K. Buolamwini (Eds.), *Novel Anticancer Agents. Strategies for Discovery and Clinical Testing* (pp. 107-190). Amsterdam: Academic Press. doi: 10.1016/B978-012088561-9/50006-5

27. Ryazanova, O.A., Voloshin, I. M., Makitruk, V. L., Zozulya, V. N., Karachevtsev, V.A. (2007). pH – induced changes in electronic absorption and fluorescence spectra of phenazine derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66(4-5), 849-859. doi: 10.1016/j.saa.2006.04.027
28. Ryazanova, O. A., Zozulya, V. N., Voloshin, I. M., Karachevtsev, V. A., Makitruk, V. L., Stepanian, S. G. (2004). Absorption and fluorescence spectral studies of imidazophenazine derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60(8-9), 2005-2011. doi:10.1016/j.saa.2003.10.020
29. Ryazanova, O. A., Zozulya, V. N., Voloshin, I. M., Karachevtsev, V. A., Makitruk, V. L. (2003). Spekttralno-fluorestsentnyie svoystva potentsialnyh fluorestsentnyh zondov molekulyarnoy gibridizatsii nukleinykh kislot na osnove proizvodnykh fenazina. *Visnyk Kharkivskoho universytetu No 593. Biofizychnyi visnyk [Biophysical Bulletin]*, (12), 49-52. (in Russian)
30. Zarudnev, E. S., Karachevtsev, V. A., Plokhotnichenko, A. M., Stepan'yan, S. G., Adamovich, L. (2009). IR Spectroscopy and ab initio calculations of imidazophenazine and its derivatives in a low-temperature argon matrix. *Low Temperature Physics*, 35(6), 491-502. doi: 10.1063/1.3151996
31. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Shelkovsky, V. S., Chagovets, V. V., Stepanian, S. G., Karachevtsev, V. A., Adamowicz, L. (2006). Evaluation of the reduction of imidazophenazine dye derivatives under fast atom bombardment mass spectrometric conditions. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(1), 113-123. doi:10.1002/jms.974
32. Kosevich, M. V., Chagovets, V. V., Shmigol, I. V., Snegir, S. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Shelkovsky, V. S., Pokrovskiy, V. A., Gomory, A. (2008). Sensitivity of redox reactions of dyes to variations of conditions created in mass spectrometric experiments. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(10), 1402–1412. doi: 10.1002/jms.1421
33. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Chagovets, V. V., Shelkovsky, V. S., Pokrovskiy, V. A. (2016). Chapter Seven: Interactions of biologically active redox-sensitive dyes with nanomaterials: mass spectrometric diagnostics. In V. A. Karachevtsev (Ed.). *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications*. (pp. 193–233). Singapore: Pan Stanford Publishing
34. Shelkovskii, V. S., Kosevich, M. V., Chagovets, V. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Snegir', S. V., Shmigol', I. V., Pokrovskii, V. A. (2009). About the plausible contribution of field ionization in the mechanisms of the formation of dyes of ions under conditions of laser desorption/ionization from a nanostructured graphite surface. *Mass-Spectrometria*, 6(4), 271-279
35. Sukhodub, L. F. (1991). The possibilities of the soft-ionization mass-spectrometry in the molecular-biological studies. *Biopolymers & Cell*, 7(6), 15-32. (in Russian) doi: 10.7124/bc.0002FC
36. Sukhodub, L. F., Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu. (1985). Mass spectrometric study of thiophosphamide interaction with nucleic acid bases. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 283(10), 714-716. (in Russian)
37. Sukhodub, L. F., Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu. (1986). Nucleic acid base complexes with thiotepa as revealed by field ionization mass spectrometry. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 13(4), 167-170. doi: 10.1002/bms.1200130403
38. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A. (1987). Nablyudenie produktov alkilirovaniya osnovaniy nukleinykh kislot metodom polevoj mass-spektrometrii [Observation of alkylation products of nucleic acids bases by means of field mass spectrometry]. *Aktual'nye Problemy Eksperimental'noj Khimioterapii Opuholej*, (2), 94-96. (in Russian)
39. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu. (1990). Direct observation of adducts between nitrogen bases and thio-TEPA using soft ionization mass spectrometry. *Biofizika*, 35(4), 549-551. (in Russian)
40. Sukhodub, L. F., Andrievskiy, G. V., Pyatigorskaya, T. L., Kosevich, M. V., Zhilkova, O. Yu. (1988). Use of the method of fast atom bombardment mass spectrometry for identification of products of the interaction of thiophosphamide with DNA. *Bioorganicheskaya Khimiya [Russian Journal of Bioorganic Chemistry]*, 14(12), 1698-1699. (in Russian)
41. Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu., Murav'eva, L. M., Sukhodub, L. F. (1986). DNA interaction with the antitumor agent thiophosphamide. *Molekulyarnaya Biologiya*, 20(2), 423-429. (in Russian)
42. Serebryanyj, A. M., Andrievskiy, G. V., Bekker, A. R., Sibeldina, L. A., Povolotskaya, M. I. (1986). Directions of deoxyguanosine and deoxyguanylic acid alkylation by thio-TEPA. *Bioorganicheskaya Khimiya [Russian Journal of Bioorganic Chemistry]*, 12(4), 499-506. (in Russian)
43. Serebryanyi, A. M., Andrievskii, G. V., Bekker, A. R., Sibeldina, L. A., Sharova, O. L. (1987). The structure of the products of nucleotides and DNA modification by ethyleneimine and thio-TEPA. *Bioorganicheskaya Khimiya [Russian Journal of Bioorganic Chemistry]*, 13(6), 786-792. (in Russian)
<http://rjbc.ru/arc/13/6/0786-0792.pdf>

44. Andrievskii, G. V. (1988). *Modifikatsiia nukleotidov i DNK etileniminom i tiotefom* [Modification of DNA nucleotides by ethyleneimine and thiotepa]. (PhD dissertation). Retrieved from <https://search.rsl.ru/ru/record/01008273270> (OD 61 89-2/440). (in Russian)
45. Sukhodub, L. F., Chivanov, V. D., Grebenik, L. I., Bondarenko, P. V., Zubarev, R. A., Knysh, A. N. (1991). Observation of thiotepa-deoxyguanosine-5'-phosphate modification products by mass spectrometry with isolation of Californium-252 fragments. *Bioorganicheskaya Khimiya* [Russian Journal of Bioorganic Chemistry], 17(7), 999–1001. (in Russian)
46. Sukhodub, L. F., Chivanov, V. D., Grebenik, L. I., Bondarenko, P. V., Zubarev, R. A., Knysh, A. N. (1992). Study of the interaction of triethylenethiophosphamide with nucleotides by mass spectrometry with ionization by fission fragments of californium-252. *Ukrainskii Biokhimiicheskii Zhurnal* [The Ukrainian Biochemical Journal], 64(1), 41-49. (in Russian)
47. Sukhodub, L. F., Grebenik, L. I., Chivanov, V. D. (1994). Use of time-of-flight mass spectrometry with ionization division fragments of californium-252 for studying the mechanisms of action of drugs on DNA and its components. *Biofizika*, 39(2), 289-293. (in Russian)
48. Sukhodub, L. F., Grebenik, L. I., Chivanov, V. D. (1994). Study of anticancer drug interaction with DMA by means of particle-induced desorption mass spectrometry: Prospidine and deoxyguanosine-5'-monophosphate. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8(2), 195-198. doi: 10.1002/rcm.1290080214
49. Grebenik, L. I. (1996). *Vyvchennia mizhmolekuliarnykh vzaemodii protypukhlynnnykh preparativ (tiotefa, prospidina, doksorubitsyna, farmorubitsyna) z deiakymy strukturnymy komponentamy nukleinovykh kyslot ta bilkiv metodom mas-spektrometrii* [Study of intermolecular interactions of anticancer drugs (thioTEPA, prospidine, doxorubicine, farmorobicine) with some structural components of nucleic acids and proteins by means of mass spectrometry]. (PhD dissertation). Retrieved from <https://dlib.rsl.ru/viewer/01000775262#?page=1> (in Ukrainian)
50. Kalinkevich, A. N., Pilipenko, V. V., Kalinichenko, T. G., Sukhodub, L. F. (2002). Mass spectrometry (252Cf-PDMS) study of aminoglycoside antibiotics interaction with nucleic acid components. *Biopolymers & Cell*, 18(2), 114-116. (in Russian) doi: 10.7124/bc.0005F1
51. Nikolaienko T. Yu., Bulavin L. A., Sukhodub L. F. (2014). The complexation of the anticancer drug ThioTEPA with methylated DNA base guanine: combined ab initio and QTAIM investigation. *Molecular Informatics*, 33(2), 104-114. doi: 10.1002/minf.201300059
52. Samtsevych, A. I., Bulavin, L. A., Sukhodub, L. F., Nikolaienko, T. Yu. (2014). Interaction of DNA nucleotide bases with anticancer drug ThioTEPA: molecular docking and quantum-mechanical analysis. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 86(2), 50-59. (in Russian) doi: 10.15407/ubj86.02.050
53. Zozulya, V., Blagoi, Yu., Löber, G., Voloshin, I., Winter, S., Makitruk, V., Shalamay, A. (1997). Fluorescence and binding properties of phenazine derivatives in complexes with polynucleotides of various base compositions and secondary structures. *Biophysical Chemistry*, 65(1), 55-63. doi: 10.1016/S0301-4622(96)02247-8
54. Blagoi, Yu. P., Zozulya, V. N., Voloshin, I. M., Makitruk, V. L., Shalamay, A. S., Shcherbakova, A. S. (1997). Investigation of phenazine derivatives interaction with DNA by polarized fluorescence method. *Biopolymers & Cell*, 13(1), 22-29. (in Russian) doi: 10.7124/bc.000462
55. Zozulya, V., Shcherbakova, A., Dubey, I. (2000). Calculating helix-to-hoile transitions of duplexes formed by phenazine-conjugated oligonucleotide, using fluorescence melting data. *Journal of Fluorescence*, 10(1), 49-53. doi: 10.1023/A:1009487613659
56. Zozulya, V., Blagoi, Yu., Dubey, I., Fedoryak, D., Makitruk, V., Ryazanova, O., Shcherbakova, A. (2003). Anchorage of an oligonucleotide hybridization by a tethered phenazine nucleoside analogue. *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 72(4), 264-273. doi: 10.1002/bip.10403
57. Ryazanova, O. A., Dubey, I. Ya., Zozulya, V. N. (2008). Investigation of the effect of covalently attached phenazine dye on helix-to-coil transition in mixed poly(rA)-(dT)₁₄ system. *Biophysical Bulletin*, 20(1), 17-23. (in Russian)
58. Ryazanova, O. A., Dubey, L. V., Dubey I. Ya., Zozulya V. N. (2012). Spectroscopic study on the effect of imidazophenazine tethered to 5'-end of pentadecathymidilate on stability of poly(dA)·(dT)₁₅ duplex. *Journal of Fluorescence*, 22(6), 1431-1439. doi: 10.1007/s10895-012-1080-y
59. Dubey, L., Ryazanova, O., Zozulya, V., Fedoryak, D., Dybey, I. (2011). Postsynthetic modification of oligonucleotides with imidazophenazine dye and its effect on duplex stability. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30(7-8), 585-596. doi: 10.1080/15257770.2011.598489
60. Dubey, L. V., Ilchenko, M. M., Zozulya, V. N., Ryazanova, O. A., Pogrebnoy, P. V., Dubey, I. Ya. (2011). Synthesis, structure and antiproliferative activity of cationic porphyrin - imidazophenazine conjugate. *International Review of Biophysical Chemistry*, 2(4), 147 152

61. Zozulya, V. N., Ryazanova, O. A., Voloshin, I. M., Dubey, L. V., Dubey I. Ya. (2011). Spectroscopic studies on binding of porphyrin-phenazine conjugate to intramolecular G-quadruplex formed by 22-mer oligonucleotide. *International Review of Biophysical Chemistry*, 2(4), 112-119
62. Ryazanova, O., Zozulya, V., Voloshin, I., Dubey, L., Dubey, I., Karachevtsev, V. (2015). Spectroscopic studies on binding of porphyrin-phenazine conjugate to four-stranded poly(G). *Journal of Fluorescence*, 25(4), 1013-1021. doi: 10.1007/s10895-015-1585-2
63. Ryazanova, O., Zozulya, V., Voloshin, I., Dubey, L., Dubey, I., Karachevtsev, V. (2015). Binding of metallated porphyrin-imidazophenazine conjugate to tetramolecular quadruplex formed by poly(G): a spectroscopic investigation. *Journal of Fluorescence*, 25(6), 1897-1904. doi: 10.1007/s10895-015-1682-2
64. Kukhar', V. P., Sorokin V. A., Blagoi, Yu. P., Sukhodub, L. F. (1989). Observation of AT-nucleotide specificity during the interaction of dexamethoxin with native DNA. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 305(4), 997-999. (in Russian) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/journals/dokl-akad-nauk-sssr/>
65. Sorokin, V. A., Blagoi, Yu. P., Valeev, V. A., Gladchenko, G. O., Sukhodub, L. F., Volianskiĭ, Iu. L. (1990). The study of complex-formation of DNA with the antimicrobial drug decamethoxine. *Molekuliarnaia Biologiya*, 24(1), 214-219. (in Russian)
66. Sorokin, V. A., Valeev, V. A., Gladchenko, G. O., Blagoi, Yu. P., Sukhodub, L. F. (1994). Interaction between antimicrobial ethonium drug and natural DNA. *Biopolymers & Cell*, 10(1), 82-89. (in Russian) doi: 10.7124/bc.000396
67. Sorokin, V. A., Valeev, V. A., Gladchenko, G. O., Blagoi, Yu. P., Ryazanova, O. A., Sukhodub, L. F. (1994). Ethonium interaction with single-chain homopolynucleotides. *Biopolymers & Cell*, 10(2), 61-68. (in Russian) doi:10.7124/bc.0003A6
68. Rosu F., De Pauw E., Gabelica V.(2008). Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie*, 90(7), 1074-1087. doi: 10.1016/j.biochi.2008.01.005
69. Gabelica, V. (Ed.). *Nucleic acids in the gas phase*. Berlin: Springer-Ferlag. doi: 10.1007/978-3-642-54842-0
70. Pashynska V. A., Zholobak N. M., Kosevich M. V., Gomory A., Holubiev P. K., Marynin A. I. (2018). Study of intermolecular interactions of antiviral agent tilorone with RNA and nucleosides. *Biophysical Bulletin*, 39(1), 15-26. doi: 10.26565/2075-3810-2018-39-02