

КВАНТОВОХІМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ АНІОНОУТВОРЕННЯ В ТИМІДИНІ ТА 5-БРОМУРИДИНІ

І. А. Петрушко, М. І. Суховія

Ужгородський державний університет, 294000, Ужгород, вул.Волошина, 54

Напівемпіричним квантовохімічним методом AM1 досліджено електронну структуру та коливні спектри тимідину та 5-бромуридину в нейтральній та аніонній формах. На основі отриманих даних уточнені молекулярні механізми геномодифікуючого та радіосенсибілізуючого ефекту заміщення тимідину 5-бромуридином в клітинній ДНК. Виконане порівняння отриманих теоретичних результатів з експериментальними.

ВСТУП

Пошук нових досконаліших методик для боротьби з канцерогенезом є однією з найактуальніших проблем сучасних радіобіологічних та медичних досліджень. Перспективною в цьому відношенні є радіотерапія в поєднанні із застосуванням радіосенсибілізаторів. Незважаючи на значний досвід медиків у цій галузі, механізми процесів залишаються недостатньо з'ясованими. Формулюючи біофізичну задачу, слід мати на увазі два аспекти. По-перше, те, що в результаті радіаційного впливу в клітинах ефективно утворюються вторинні електрони: 10^4 електронів на 1 МеВ падаючої енергії [1]. Біля 90% вторинних електронів є повільними [2], тобто розподіл за енергіями таких електронів, наприклад, у воді має максимум біля 0 еВ і експоненціально спадає, досягаючи практично нульового значення при енергіях 30 еВ [3]. Таким чином, радіаційно-індуковані процеси у живих клітинах можуть бути змодельовані взаємодією повільних електронів з біомолекулами. Роботи, присвячені вивченню таких взаємодій з компонентами нуклеїнових кислот, вказують, що повільні електрони ефективно спричиняють дисоціативне збудження та іонізацію молекул [4-6], а також утворення тимчасових негативних іонів через

електронне захоплення [7-10]. Отже, аніоноутворення в компонентах нуклеїнових кислот, яке найбільш імовірно при мінімальних енергіях, може служити адекватною моделлю для опису первинних процесів радіаційно-індукованого мутагенної загибелі.

В контексті вищесказаного логічно припустити, що природа геномодифікуючого та радіосенсибілізуючого ефектів заміщення тимідину на 5-бромуридин проявляється через відмінності в електронній та коливній структурах канонічного та модифікованого нуклеозидів, а також через відмінності в процесах, що супроводжують аніоноутворення. Метою даної роботи є порівняльний аналіз відмінностей параметрів електронної та коливної структур тимідину та 5-бромуридину, а також порівняльний аналіз відмінностей в процесах аніоноутворення в тимідині та 5-бромуридині.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для виконання розрахунків використано комерційний пакет програм Nupur Chem 6.0. Можливості даного програмного продукту дозволяють отримати кількісну інформацію про параметри електронної структури досліджуваної молекули: величини зарядів на атомах, порядки зв'язків тощо.

В даній роботі використано напівемпіричний метод АМ1, який належить до методів самоузгодженого поля [15]. АМ1 добре зарекомендував себе для теоретичного вивчення нуклеозидів та азотистих основ [16, 17].

Об'єктами досліджень були молекули канонічного та модифікованого нуклеозидів в нейтральній та аніонній формах: тимідин в нейтральній формі (TdR), в аніонній формі (TdR⁻); 5-бромуридин в нейтральній формі (5-BrUdR), в аніонній формі (5-BrUdR⁻). Дані молекули являють собою тимін та 5-бромурацил, відповідно, з'єднані з дезоксирибозою через N1-глікозидний зв'язок (Рис. 1). В ДНК по атомах C3* та C5* приєднуються атоми фосфатної групи, а в нуклеозидах, які ми і розглядаємо, - атоми водню. Досліджувані молекули відрізняються лише боковою групою біля атома C5 – це метильна група в тимідині та атом бром у 5-бромуридині. Просторова конфігурація нуклеозидів відповідає В-формі ДНК, яка найчастіше реалізується у клітинних. При побудові 5-бромуридину метильна група тимідину замінюється атомом Br із збереженням довжини та просторового положення зв'язків.

Наступним кроком були безпосередні розрахунки параметрів структури нуклеозидів, а саме: порядків зв'язків в TdR, TdR⁻, 5-BrUdR та 5-BrUdR⁻, які відображають ступінь перекривання хвильових функцій електронної густини сусідніх атомів і служить показником енергетичної міцності зв'язку. Розраховано характеристики коливних спектрів даних сполук: частоти ν (см⁻¹) та інтенсивності I, (в. о.) нормальних коливань .

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В роботі вивчались відмінності електронної та коливної структури молекул тимідину (TdR) та 5-бромуридину (5-BrUdR) а також особливості їх змін внаслідок аніоноутворення, виконано порівняння отриманих розрахункових даних з

експериментальними, обговорено біологічну значущість отриманих результатів.

Структурні формули молекул тимідину (TdR) та 5-бромуридину (5-BrUdR), просторова конфігурація яких є еквівалентною В-формі ДНК, зображено на рис. 1 а, б. В таблиці 1 представлені величини порядків зв'язків нейтральної та аніонної форм досліджуваних сполук. Значення розрахованих коливних смуг, їх інтерпретація та коментарі для TdR, TdR⁻, 5-BrUdR та 5-BrUdR⁻ приведені в таблиці 2.

Аналізуються отримані результати за такими критеріями:

1) вплив Br-заміщення на порядки зв'язків та коливну структуру нуклеозиду відображає молекулярні механізми мутагенного (генотоксичного) ефекту такого заміщення;

2) аніоноперетворення в тимідині відображає (або моделює) молекулярні механізми генотоксичної дії іонізуючої радіації;

3) відмінності аніоноутворення в тимідині та 5-бромуридині відображають молекулярні механізми радіосенсибілізуючої здатності заміщення тимідину 5-бромуридином

Апроксимація отриманих даних на умови клітинної ДНК дасть можливість уточнити та поглибити відомості про молекулярні механізми геномодифікуючого ефекту заміщення в клітинній ДНК тимідину на 5-бромурацил.

Проаналізуємо перерозподіл в енергетичній міцності зв'язків в тимідині та 5-бромуридині, спричинений переходом в аніонну форму (табл.1). Аніоноутворення в тимідині супроводжується суттєвим послабленням глікозидного N1-C1*, O5*-H та O3*-H-зв'язків. Деякі зв'язки, наприклад N3-C4, N3-H та інші, зазнають незначного посилення. Отже, внаслідок аніоноутворення зростає імовірність втрати тимінової основи в ДНК внаслідок руйнування глікозидного зв'язку. В клітинній ДНК O5*-H та O3*-H-зв'язкам відповідають O5*-P та O3*-P-зв'язки [18]. Тому можна очікувати, що послаблення зв'язків

O5*-H та O3*-H означатиме односторонній розрив.

Внаслідок аніоноутворення в 5-бромуридині суттєво послаблюється зв'язок C5-Br, порядки інших зв'язків не зазнають суттєвих змін. Такі дані узгоджуються з результатами експериментів відносно взаємодії молекул 5-бромуридину з повільними електронами в газовій фазі [7], згідно з якими руйнування C5-Br та глікозидного зв'язків є основними наслідками аніоноутворення при захопленні повільного електрона даною молекулою. Отже, в умовах клітинної ДНК слід очікувати розриву цього зв'язку, внаслідок чого утвориться вільний радикал бромоводню безпосередньо всередині ДНК.

У табл. 2 приведено розраховані частоти ν (cm^{-1}) та інтенсивності I, (в. о.) нормальних коливань нейтральної та аніонної форм тимідину та 5-бромуридину. Оскільки при аніоноутворенні, як в тимідині, так і в 5-бромуридині, має місце перерозподіл положень та інтенсивностей коливальних смуг (особливо в 5-бромуридині), то можна стверджувати, що електронне захоплення в даних сполуках відбувається за механізмом коливально-збудженого Фешбахівського резонансу [19]. Такий перерозподіл положень та інтенсивностей коливальних смуг можна трактувати як збурення коливної структури молекули. Деформаційне коливання C2-O в площині піримідинового кільця (табл. 2) при заміщенні атомом бромометильної групи суттєво активізується та зсувається в область вищих енергій. В 5-бромуридині має місце змішування коливань C2-O- та C4-O-груп. Аніоноутворення в тимідині не змінює суттєво ні інтенсивність, ні положення даної смуги, а в 5-бромуридині спостерігається деактивація даного коливання. Якщо апроксимувати виявлені ефекти на клітинну ДНК, то слід очікувати порушення високодетермінованих в часі і просторі процесів молекулярного впізнавання, в реалізації яких беруть участь коливання ДНК та її складових.

Бром-заміщення метильної групи в структурі нуклеозиду викликає суттєву активацію деформаційного коливання C4-O-групи, а також частотний зсув в область вищих енергій (маємо на увазі, що саме C4-O та N3-H-групи беруть участь в утворенні правильних Уотсон-Криківських пар).

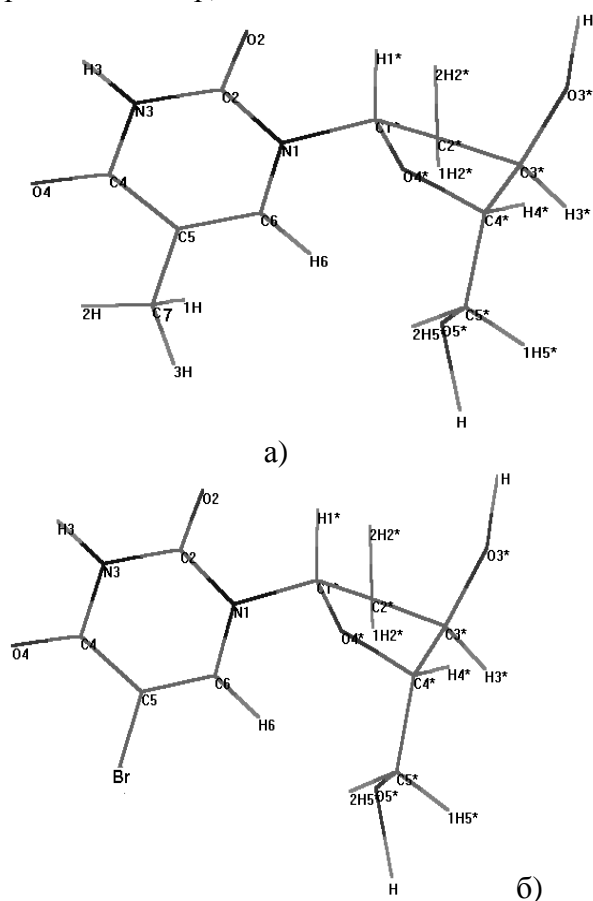


Рис. 1. Просторова будова молекул: а) тимідину (TdR) та б) 5-бромуридину (5-BrUdR)

Тому логічно припустити, що в умовах клітинної ДНК утворення правильних Уотсон-Криківських пар внаслідок бром-заміщення сильно ускладниться. Має місце змішування коливань C2-O- та C4-O-груп, як і в попередньому випадку. Аніоноутворення в тимідині супроводжується зсувом даної смуги в область вищих енергій на 4 cm^{-1} при незмінній інтенсивності. В 5-бромуридині спостерігається деактивація даного коливання при аніоноутворенні.

Таблиця 1. Порядки зв'язків у нейтральній та аніонній формах молекул тимідину (TdR, TdR⁻) та 5-бромурідину (5-BrUdR, 5-BrUdR⁻).

Зв'язок	Порядок зв'язку			
	TdR	TdR ⁻	5-BrUdR	5-BrUdR ⁻
N1-C2	1,0025	1,0219	0,9917	1,0798
C2-N3	1,0548	1,0318	1,0573	1,0570
N3-C4	0,9295	0,9391	0,9330	0,8908
C4-C5	1,0005	1,0206	0,9768	0,9757
C5-C6	1,6908	1,6337	1,6067	1,523
C6-N1	1,1078	1,1570	1,1476	0,9838
C2-O	1,7011	1,7023	1,7087	1,6022
N3-H	0,8535	0,8622	0,8519	0,8742
C4-O	1,8094	1,7697	1,8384	1,7944
C6-H	0,9280	0,9256	0,9227	0,9340
C5-C7 (Br)	0,9831	0,9856	1,023	0,4627
C7-H	0,9713 0,9715 0,9708	0,9724 0,9740 0,9722	-	-
N1-C1*	0,8415	0,7864	0,8358	0,8909
C1*-C2*	0,9529	0,9590	0,9533	0,9487
C2*-C3*	0,9555	0,9095	0,9548	0,9589
C3*-C4*	0,9357	0,8777	0,9355	0,9332
C4*-O4*	0,9511	0,9419	0,9494	0,9664
O4*-C1*	0,9907	1,0012	0,9941	0,9606
C4*-C5*	0,9408	0,9308	0,9418	0,9381
C5*-O5*	1,0167	1,0128	1,0051	1,0223
O5*-H	0,8624	0,8111	0,8615	0,8856
C1*-H	0,9210	0,9206	0,9204	0,9261
C2*-H1	0,9500	0,9529	0,9495	0,9525
C2*-H2	0,9536	0,9632	0,9660	0,9673
C3*-O3*	1,0187	1,1164	1,0212	1,0123
O3*-H	0,8018	0,1764	0,8484	0,8673
C3*-H	0,9477	0,9334	0,9476	0,9381
C4*-H	0,9392	0,9395	0,9390	0,9433
C5*-H1	0,9536	0,9528	0,9543	0,9539
C5*-H2	0,9507	0,9548	0,9504	0,9673

Таблиця 2. Найбільш інтенсивні ІЧ смуги тимідину (TdR), 5-бромуридину (5-BrUdR) та їх аніонів (TdR⁻ та 5-BrUdR⁻).

Віднесення	Розраховані частоти ν (см ⁻¹) та інтенсивності I (в. о.) нормальних коливань			
	TdR	TdR ⁻	5-BrUdR	5-BrUdR ⁻
C2-O, str., в площині піримід. кільця	2146,8 (0,1)	2146,4 (0,2)	2153,6 (27,6) 2092,7 (84,0) 2078,1 (87,3)	2151,0 (6,0)
C4-O, str., в площині піримід. кільця	2084,0 (0,4)	2088,8 (0,4)	2092,7 (84,0) 2078,1 (87,3)	2084,4 (2,3)
C5-C6-str. в площині піримід. кільця	1903,0 (0,3)	1900,4 (0,2)	1930,1 (4,2)	1814,1 (8,6)
N3-H, позаплощинні	-	-	-	1931,9 (111,5)

Отримані розрахункові дані про деформаційне коливання C5-C6-групи в площині піримідинового кільця (табл. 1) вказують, що бром-заміщення метильної групи в структурі нуклеозиду викликає активацію даного коливання, а також частотний зсув в область вищих енергій. Аніоноутворення в тимідині супроводжується зсувом даної смуги в область нижчих енергій приблизно на 3 см⁻¹, а також зменшенням інтенсивності. В 5-бромуридині при аніоноутворенні спостерігається зсув даної смуги в область менших енергій при зростанні інтенсивності.

Пам'ятаємо, що саме C4-O та N3-H-групи беруть участь в утворенні правильних Уотсон-Криківських пар. Важливо, що в нейтральній та аніонній формах тимідину, а також в нейтральній формі 5-бромуридину деформаційне позаплощинне коливання N3-H-групи неактивне. І лише в аніонній формі 5-бромуридину воно проявляється з винятково великою інтенсивністю. В умовах клітинної ДНК це означатиме неможливість утворення правильних Уотсон-Криківських пар.

Таким чином, молекулярним механізмом, що відповідає за геномодифікуючий

ефект заміщення тиміну на 5-бромурацил є спровоковане таким заміщенням тотальне збурення коливної структури без руйнування хімічних зв'язків. Внаслідок цього утруднюється координація (взаємозгодження) високодетермінованих в часі і просторі процесів молекулярного впізнання, в яких саме коливання ДНК та її компонентів відіграють роль далекодіючих регулюючих сигналів – збої в роботі біомолекулярних систем контролю за цілісністю спадкової інформації – різке зростання кількості випадкових мутацій.

Геномодифікуючий ефект дії іонізуючої радіації, на думку авторів, може реалізовуватися через імовірне руйнування глікозидного або O3*-P-зв'язку у поєднанні зі збуренням коливної структури і всіма наслідками з такого збурення, описаними вище.

Молекулярним механізмом, що відповідає за радіосенсибілізуючий ефект заміщення тиміну на 5-бромурацил, є спровоковане таким заміщенням руйнування C5-Br-зв'язку та селективне збурення позаплощинного коливання N3-H-групи – утворюється вільний радикал бром у середині ДНК. Запускається каскад деструк-

тивних реакцій, блокування яких стає утрудненим внаслідок подавлення систем контролю коливним збудженням. Іншими словами, дані два деструктивні впливи (руйнування зв'язку C5-Br та селективне коливне збудження) синергетично підсилюють один одного.

Захоплення вільного електрона молекулами тимідину та 5-бромуридину відбувається за механізмом коливально-збудженого Фешбахівського резонансу.

ВИСНОВКИ

З використанням апарату квантовохімічних напівемпіричних розрахунків виконане порівняльне дослідження електронної та коливної структури нормального (тимідин) та галоген заміщеного (5-бромуридин) нуклеозидів, а також їх зміни при аніоноутворенні.

ЛІТЕРАТУРА

1. International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report 31. ICRU: Washington, DC (1979).
2. А. Чердзби, Ядерные излучения и полимеры (Наука, Москва, 1962).
3. V. Cobut, Rad. Phys. Chem. 51, 229 (1998).
4. М. И. Суховия, И. И. Шафраньош, В кн. Механизмы радиационных повреждений и восстановления нуклеиновых кислот (Пушино-на-Оке, 1980), с. 51.
5. М. И. Суховия, В. Н. Славик, И. И. Шафраньош, Л. Л. Шимон, Биополимеры и клетка 7, 77 (1991).
6. І.І. Шафраньош, І.А. Петрушко, В.М. Славик, М. І. Суховія, Науковий вісник Ужгородського університету. Серія фізика. 6, 259 (2000).
7. Н. Abdoul-Carime, P. Limão-Vieira, S. Gohlke, I. Petrushko, N. J. Mason, E. Il-lenberger, Chem. Phys. Letters. 393, 442 (2004).
8. I. Shafranyosh, M. I. Sukhoviya, J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys., 39, 4155 (2006).
9. K. Aflatoon, G. A. Gallup, P. D. Burrow, J. Phys. Chem. A. 102, 6205 (1998).
10. F. Martin, P. D. Burrow, Z. Cai, P. Cloutier, D. Hunting, L. Sanche, Phys. Rev. Lett. 93, 068101 (2004).
11. М. Е. Лобашев, Генетика (Изд. ЛГУ, Ленинград, 1969).
12. Д. М. Гродзинський, Радіобіологія (Либідь, Київ, 2001).
13. J. P. Henderson, J. Byun, J. Takeshita, J. W. Heinecke, J. Biol. Chem. 278, 23522 (2003).
14. S. A. Krasnokutski, A. Yu. Ivanov, V. Izvekov, G. G. Sheina, Yu. P. Blagoi, J. Mol. Str. 482, 249 (1998).
15. M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, J. Am. Chem. Soc. 107, 3902 (1985)
16. D.N. Govorun, Ya. R. Danchuk, Ya. R. Mishchuk, I. V. Kondratyuk, N. F.

Отримані дані вказують на те, що для реалізації генотоксичного ефекту дії іонізуючої радіації та заміщення в структурі ДНК тимідину 5-бромуридином значну роль відіграє порушення узгодженості в коливній структурі ДНК (для двох різних факторів один і той же механізм генотоксичного впливу).

Радіосенсибілізуючий ефект заміщення тимідину 5-бромуридином в клітинній ДНК полягає в синергетичному поєднанні двох факторів: висока імовірність руйнування C5-Br-зв'язку та *селективне* збудження позаплощинного коливання N3-N-групи.

Захоплення вільного електрона молекулами тимідину та 5-бромуридину відбувається за механізмом коливально-збудженого Фешбахівського резонансу.

Автори вдячні професору Б. П. Мінаєву за допомогу при виконанні роботи.

- Radomsky, N. V. Zheltovsky, J. Mol. Str. 267, 99 (1992).
17. І. А. Петрушко, М. І. Суховія, Біополім. кліт. 21, 440 (2005).
18. Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов, Молекулярная биология. (Медицинское информационное агентство, Москва, 2003).
19. В. И. Хвостенко, Масс-спектрометрия отрицательных ионов в органической химии (Наука, Москва, 1981).

QUANTUM CHEMICAL STUDY OF THE ANIONFORMATION IN THYMIDINE AND 5-BROMOURIDINE

I. A. Petrushko, M. I. Sukhovija

Uzhgorod State University, 294000, Uzhgorod, Voloshin, 54

Electronic structure and vibration spectra of thymidine and 5-bromouridine and their transformation under anion formation were investigated by the AM1 semiempirical method. Based on the data obtained, the molecular mechanisms of the genotoxic and radiosensitization effect of the 5-bromouridine embedding into sellular DNA were specified. The comparison of the theoretical and experimental results was made.