

МЕТОД ПРЕПАРАТИВНОГО СИНТЕЗА 8-ОКСО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНА ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Н.В. Мармий[@], Д.С. Есипов

Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва 117449, Россия

[@]Автор для переписки, e-mail: marmiynv@gmail.com

Предложен препаративный метод синтеза 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-охо-dG), дающий высокий, до 80%, выход и подходящий для лабораторного применения. Актуальность разработки этого метода связана с возникшей необходимостью получения больших количеств 8-охо-dG для исследования биологической и фармацевтической активности. Свидетельства о наличии таковой были получены в последние десятилетия, когда были открыты механизмы сопряжения репарации ДНК с внутриклеточной сигнализацией через 8-охо-dG и обнаружено его противовоспалительное и протекторное действие. Предложенный нами метод основывается на схеме, используемой для получения 8-охо-dG-содержащих олигонуклеотидов, но имеет ряд важных модификаций. Использование N,N-диметилформамида в качестве растворителя позволяет увеличить выход реакции нуклеофильного замещения и обойтись без применения дорогостоящего и осложняющего дальнейшую очистку ацетата серебра. Контроль кинетики реакции позволяет добиться максимальных выхода и чистоты продукта. Щелочной гидролиз, в отличие от аммонолиза, обеспечивает полное и быстрое удаление ацильных групп, а обращенно-фазовая хроматография на силанизированном силикагеле является эффективным и недорогим методом очистки. Такая схема очистки сводит к минимуму загрязнение продукта остаточными органическими растворителями, что немаловажно для биологических экспериментов. С экономической точки зрения, она выгодна из-за отсутствия дорогостоящих растворителей и возможности многократного использования носителя. Метод позволяет получать чистый 8-охо-dG в препаративных количествах и превышает по итоговому выходу как свой прототип, так и иные существующие методики. Описаны некоторые промежуточные соединения и значимые методические особенности проведения реакции.

Ключевые слова: 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, 8-охо-dG, синтез, модифицированные нуклеозиды.

METHOD OF PREPARATIVE SYNTHESIS OF 8-OXO-2'-DEOXYGUANOSINE FOR LABORATORY USING

N.V. Marmiy[@], D.S. Esipov

Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 117449, Russia

[@]Corresponding author e-mail: marmiynv@gmail.com

A preparative method for the synthesis of 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-охо-dG) giving a high yield up to 80% and suitable for laboratory use is suggested. The urgency of the development of this method is associated with the need to obtain large quantities of 8-охо-dG for the study of biological and pharmaceutical activity. Evidence of this need was obtained in the last decades, when the mechanisms of the interface of DNA repair with intracellular signaling through 8-охо-dG were discovered and its anti-inflammatory and protective effects were revealed. The suggested method is based on the scheme used to prepare 8-охо-dG-containing oligonucleotides, but has a number of important modifications. The use of N,N-dimethylformamide as a solvent makes it possible to increase the yield of the nucleophilic substitution reaction and avoid expensive and

complicated further purification of silver acetate. Control of the reaction kinetics allows achieving the maximum yield and purity of the product. Alkaline hydrolysis, in contrast to ammonolysis, provides complete and rapid removal of acyl groups, and reversed-phase chromatography on silanized silica gel is an effective and inexpensive method of purification. Such a purification scheme minimizes contamination of the product with residual organic solvents, which is important for biological experiments. From the economic point of view, it is advantageous because of the absence of expensive solvents and the possibility of reusing the carrier. The method makes it possible to obtain pure 8-oxo-dG in preparative amounts and exceeds both its prototype and other existing techniques in the final output. Some intermediate compounds and significant methodological features of the reaction are described.

Keywords: 8-oxo-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-dG, synthesis, modified nucleosides.

Введение

8-Оксо-2'-дезоксигуанозин (8-оксо-dG) – окисленное производное гуанозина, которое в течение длительного времени используется в качестве биомаркера окислительного стресса [1]. Его содержание в клеточной ДНК и биологических жидкостях возрастает на фоне воспалительных, аллергических, онкологических, нейродегенеративных и некоторых других заболеваний [2].

Измерение содержания 8-оксо-dG в биоматериале пациентов в таких случаях полезно для оценки прогрессирования заболевания и эффективности лечения. В ряде стран подобный анализ уже внедрен в клиническую практику. Это вызвало необходимость синтеза высокочистого 8-оксо-dG в качестве стандарта для хроматографии и иммунохимических методов. Однако калибровка высокоточного аналитического оборудования требует очень малых количеств 8-оксо-dG, для получения которых пригодны методы синтеза даже с невысоким выходом. Например, в некоторых работах [3, 4] 8-оксо-dG в качестве аналитического стандарта получают путем окисления dG в реакции Фентона, дающего выход около 5%.

В последнее десятилетие появились исследования, сообщающие о вероятной значимой биологической роли 8-оксо-dG [5] и открывающие перспективы применения его в качестве лекарственного препарата. В частности, были показаны выраженные противовоспалительный [6] и иммунорегулирующий [7] эффекты этого соединения, а также выдвинута гипотеза о его важной роли в регуляции репарации ДНК и ее сопряжении с внутриклеточной сигнализацией [8].

В своих биологических экспериментах по изучению влияния этого соединения на культуры клеток [9] мы столкнулись с необходимостью быстрого получения 8-оксо-dG в препаративных (граммовых) количествах. Так, эффективные дозировки для мышей составляют примерно 30 мг/кг массы тела, а в экспериментах с клеточными культурами используется 1 мкМ раствор. В ближайшей перспективе, так как 8-оксо-dG обладает выраженными биологическими эффектами, может потребоваться и масштабный его

синтез для испытаний в качестве потенциального лекарственного препарата.

Существующие методы синтеза 8-оксо-dG оказались для этого неудобны. Самый первый из предложенных для данного соединения метод получения [10, 11] основан на превращении 8-Br-dG в 8-бензилокси-dG с последующим гидрированием на палладиевом катализаторе. Этот метод не дает высокого выхода, кроме того, используются металлический натрий и газообразный водород, применение и хранение которых сопряжено с высокими производственными рисками. Методы, основанные на окислении производных гуанозина [3, 4] в водных средах, дают крайне низкие выходы из-за быстрой дальнейшей деградации 8-оксо-dG. Это соединение имеет еще более низкий потенциал окисления, нежели dG (0.7 В против 1.3), поэтому нередко оказывается нестабильным в реакционной смеси. При этом гидантоины, продукты дальнейшего окисления с раскрытием цикла, плохо поддаются детекции электрохимическими и спектрофотометрическими методами. Это осложняет контроль степени протекания подобных реакций и чистоты полученного продукта. В целом, реакцию Фентона [3, 4] и используемую для получения 8-оксо-dA реакцию с меркаптоэтанолом [12] сложно назвать перспективными путями препаративного синтеза 8-оксо-dG.

Представляющим интерес нам показался метод ацилирования, который ранее предлагался для получения 8-оксо-dG-содержащих олигонуклеотидов [13]. Он основан на ацилировании 8-Br-dG смесью уксусного ангидрида и ацетата натрия в безводном пиридине, при кипячении, в присутствии *N*-метилимидазола и ацетата серебра. Следующей стадией является аммонолиз ацильных групп. Авторы применяли методику для получения *N*-ацилированного 8-оксо-dG с последующим включением его в олигонуклеотиды. Цели получить препаративные количества соединения перед ними не стояло. При попытках реализовать метод в граммовых масштабах мы столкнулись со сложностью выделения и очистки продуктов на всех стадиях, а также с низкими суммарными выходами.

Кроме того, использование ацетата серебра в препаративных масштабах сильно удорожает синтез.

Целью нашей работы было создание лабораторного метода препаративного и полупрепаративного синтеза 8-охо-dG, который давал бы максимальные выход и чистоту продукта при минимальных рисках и затратах.

Результаты и их обсуждение

Для получения 8-охо-dG мы использовали реакцию ацилирования 8-бromo-2'-дезоксигуанозина смесью ацетата натрия и уксусного ангидрида (см. рис. 1). Авторы предшествующей методики [13] рекомендуют внесение в реакционную смесь эквива-

лента ионов одновалентного серебра для повышения выхода. Связывая и выводя из реакции бромид, последние должны сдвинуть константу равновесия в сторону продуктов реакции. Однако в препаративных масштабах использование солей серебра не окупается как из-за его дороговизны, так и из-за проблем с дальнейшей очисткой и детекцией продукта. Серебро импрегнирует носители на хроматографических колонках и затрудняет качественное разделение продуктов. В еще одной похожей методике [14] авторы предлагают сдвигать равновесие с помощью добавления уксусной кислоты спустя 3 ч после начала реакции. Однако это приводит к образованию значительных количеств побочных продуктов и низкому (12%) выходу целевого соединения.

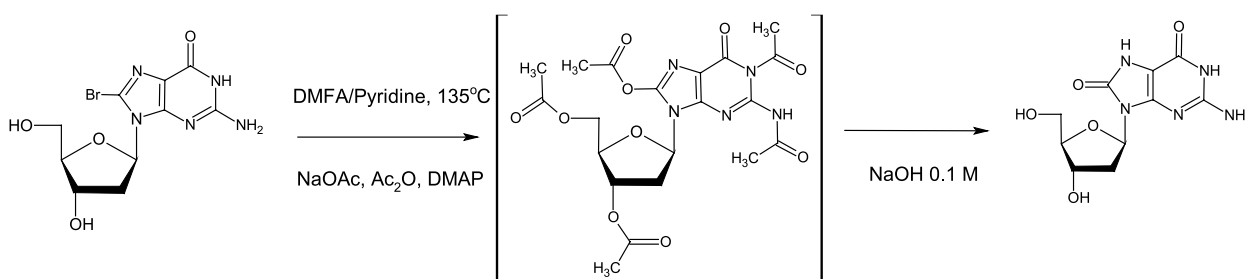


Рис. 1. Схема получения 8-оксо-2'-дезоксигуанозина.

Отказавшись от использования серебра и уксусной кислоты, мы пошли по пути увеличения выхода продукта за счет повышения температуры реакционной смеси.

Для этого взамен пиридина в качестве растворителя был взят *N,N*-диметилформамид. Он имеет более высокую температуру кипения (153 °C по сравнению со 114 °C для пиридина) и, являясь полярным апротонным растворителем, сам по себе обеспечивает более высокие скорости нуклеофильного замещения галогена. Однако у пиридина есть одно важное преимущество – он проявляет выраженную основность и способен связывать уксусную кислоту, которая образуется при разложении ангидрида. Присутствие в реакционной смеси кислоты легко приводит к отщеплению остатка углевода от ацилированного дезоксигуанозина, в результате чего продуктом реакции становится окисленное основание, а не нуклеозид. Экспериментально мы выяснили, что для протекания реакции требуются и ацетангидрид, и ацетат натрия, в отсутствие любого из этих компонентов целевого продукта не образуется. Поэтому, небольшое количество пиридина (2 экв. по отношению к ангидриду) мы добавляли в реакционную смесь. Были протестированы и варианты смесей пиридин – ДМФА в пропорциях 1:1 или 1:2. Реакция в них шла медленнее, чем в ДМФА с минимальным присутствием пиридина.

Оптимальным температурным диапазоном по результатам экспериментов оказался интервал 125–

135 °C. При более высоких температурах возрастало количество побочных продуктов, при более низких – снижались скорость реакции и выход.

Полноту протекания реакции оценивали с помощью тонкослойной хроматографии и обращенно-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией. По данным ТСХ ацилированный по восьмому положению продукт имеет большее значение *R_f*, нежели bromированный, по данным ОФ-ВЭЖХ – меньшее время удерживания (см. табл. 1, рис. 2). Следует отметить, что данные ВЭЖХ показывают несколько пиков как ацилированного 8-Br-dG (полупродукты 1–5 из табл. 1), так и предшественника 8-охо-dG (полупродукты 6–7 из табл. 1). Каждая группа полупродуктов характеризуется практически идентичными спектрами поглощения, но различными временами выхода. После удаления ацильных групп вещества 1–5 дают 8-Br-dG, а предшественники 6 и 7 – 8-охо-dG. Можно предположить, что различаются они только количеством ацильных остатков.

Пояснения к обозначениям и спектральные характеристики соединений см. табл. 1.

Динамику ацилирования 8-Br-dG несложно проследить с помощью ВЭЖХ. На ход реакции большое влияние оказывает температура. Зафиксировать полупродукты 1–3 (вероятно, моно-, ди- и триацильные производные) при температуре 50 °C можно в течение 20–30 мин с момента начала реакции, к 40-ой минуте в реакционной смеси, как правило, присутствуют

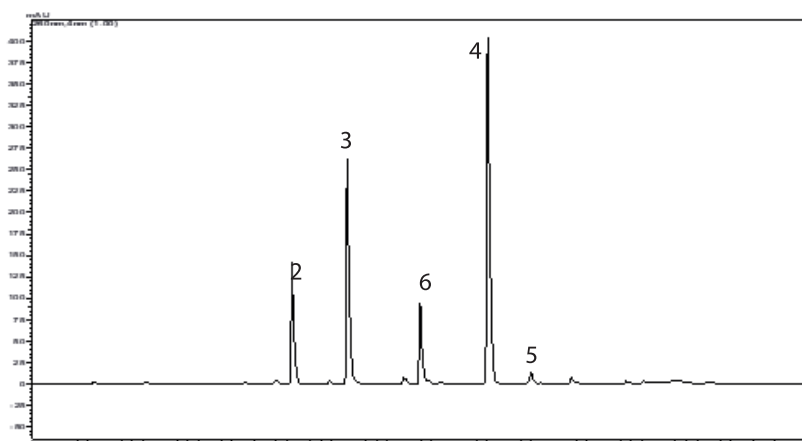


Рис. 2. Пример ВЭЖХ-хроматограммы продуктов и полупродуктов стадии ацилирования. Элюент А – 0.05 М ортофосфорная кислота, В – ацетонитрил. Градиент: 5–40% CH_3N за 35 мин. Колонка: Phenomenex Luna C18 (2), скорость потока – 1 мл /мин. «6» – предшественник 8-охо-dG, «2», «3», «4», «5» – продукты ацилирования 8-Br-dG.

Таблица 1. Хроматографические и спектральные характеристики продуктов, полупродуктов и реагентов

Обозначение	Продукт	На какой стадии синтеза наблюдается	Время удерживания, мин	УФ-спектр, λ_{max} нм
8-Br-dG	8-Br-dG	Исходное соединение	8.75	262
dG	dG	Исходное соединение	4.8	$\lambda_{\text{max1}} = 256$ λ_{max2} («плечо») = 280
8-охо-dG	8-Охо-dG	Конечный продукт	5.7	$\lambda_{\text{max1}} = 247$ $\lambda_{\text{max2}} = 294$
1	Ацилированный 8-Br-dG *	Ацилирование, начальный этап	10.5	$\lambda_{\text{max1}} = 262$
2	Ацилированный 8-Br-dG *	Ацилирование, начальный этап	12.2	262
3	Ацилированный 8-Br-dG *	Ацилирование, начальный этап	14.8	262
4	Ацилированный 8-Br-dG *	Ацилирование, 125 °C	20.5	262
5	Ацилированный 8-Br-dG *	Ацилирование, 125 °C	22.5	$\lambda_{\text{max1}} = 262$ $\lambda_{\text{max2}} = 288$
6	Предшественник 8-охо-dG (вероятно, 8-ацил)**	Ацилирование, 125 °C	17.5	$\lambda_{\text{max1}} = 258$, λ_{max2} («плечо») = 283
7	Предшественник 8-охо-dG (вероятно, 8-ацил)**	Ацилирование, 125 °C	18.5	$\lambda_{\text{max1}} = 256$ λ_{max2} («плечо») = 283
8	Ацилированный 8-охо-dG (не до конца удалены защиты) **	Аммонолиз/щелочной гидролиз	10.0	$\lambda_{\text{max1}} = 256$ $\lambda_{\text{max2}} = 295$
9	Ацилированный 8-охо-dG (не до конца удалены защиты) **	Аммонолиз/щелочной гидролиз	6.6	$\lambda_{\text{max1}} = 247$ $\lambda_{\text{max2}} = 299$

* Структура веществ не определена, но при аммонолизе/щелочном гидролизе они дают 8-Br-dG.

** Структура веществ не определена, но при аммонолизе/щелочном гидролизе они дают 8-охо-dG.

только соединения **3** и **4**. При более высоких температурах реакционной смеси к моменту проведения анализа (первые минуты с того времени, как установится необходимая температура) детектируется уже только полупродукт **4**. Дополнительное ацилирование триацил-8-Br-dG (образование соединения **5**), так же как и замещение бромидов на ацилы (с образованием предшественников **6** и **7**), происходит только при температурах свыше 100 °C. Полиацелированный продукт (соединение **5**), по-видимому, более склонен к апуринизации под действием кислой среды и высокой температуры.

При 135 °C в реакционной смеси его в среднем в три раза меньше, чем триацелированного 8-Br-dG, и он также подвергается замещению брома на ацил (с образованием предшественника **7**). Но при доведении растворителя до кипения он становится преобладающим и распадается с образованием многочисленных побочных продуктов.

После того, как ВЭЖХ и ТСХ показывали исчезновение исходного соединения, реакцию завершали. Излишки ангидрида нейтрализовали водным раствором триэтиламоний бикарбоната, после чего растворитель отгоняли на ротаторном испарителе.

После этого реакционную смесь подвергали щелочному гидролизу. Исходная методика предполагала аммонолиз, однако даже при температуре 60 °C он не обеспечивает эффективного снятия ацильного остатка с аминогруппы во втором положении (образуются продукты **8** и **9** из табл. 1, сохранившие одну или несколько ацильных групп). В случае применения щелочного гидролиза в течение 1-2 ч обеспечивается полное деацилирование продукта.

Для очистки целевого продукта нами успешно применен метод хроматографии на силанизированном силикагеле. Метод позволяет выделить целевой продукт с чистотой 94-96%. При необходимости более качественной очистки можно применить обращенно-фазовую ВЭЖХ.

Выход целевого продукта по массе относительно 8-Br-dG составляет в среднем 80%.

Преимущества и недостатки метода по сравнению с альтернативными представлены в табл. 2.

Выводы

Нами был оптимизирован и модифицирован для препаративных целей метод синтеза и очистки 8-охо-dG. Целевой продукт получен с итоговым выходом 80% и чистотой свыше 94% по данным ВЭЖХ. В сравнении с предшествующей методикой [12] нами достигнуты четырехкратное увеличение выхода и сокращение очистки на несколько ступеней. Полученный метод удобен для лабораторного применения.

Таблица 2. Сравнение существующих методов синтеза 8-охо-dG

Метод	Суть метода	Продукт	Выход (по массе к 8-Br-dG)	Очистка продукта
Lin T., Cheng J. et al., 1985 [9]	На первой стадии получают 8-бензилокси-гуанозин путем обработки 8-Br-dG металлическим натрием и бензиловым спиртом. Далее продукт очищается и подвергается каталитическому гидрированию на палладии, в результате которого и получают 8-охо-dG	8-охо-dG	49%	Перекристаллизация
Cheng K.C., Cahill D.S., 1992 [3]	Окисление dGTP в водной среде, в условиях реакции Фентона (взаимодействие аскорбиновой кислоты с FeSO ₄)	8-охо-dGTP	5.8%	Сорбция на угле, хроматография на сефадексе
Мармий Н.В., Невредимова Т.С., Есипов Д.С., 2015 [4]	Окисление dG в водной среде, в условиях реакции Фентона (взаимодействие аскорбиновой кислоты с FeSO ₄)	8-охо-dG	7.2%	Сорбция на угле, ОФ-ВЭЖХ
Geiger A., Selige H. et al., 1993 [12]	В безводном пиридине при кипячении проводится реакция 8-Br-dG со смесью ацетангидрида, ацетата натрия и ацетата серебра в присутствии <i>N</i> -метилимидазола. Продукты экстрагируются хлористым метиленом, разделяются колоночной хроматографией, далее подвергаются аммонолизу.	2- <i>N</i> -ацетил-8-охо-dG	22%	Экстракция, хроматография на силикагеле на промежуточной стадии, перекристаллизация
Roelen H.C.P.F., Saris C.P et al., 1991 [13]	В безводном пиридине при кипячении проводится реакция 8-Br-dG со смесью ацетангидрида, ацетата натрия, уксусной кислоты и этанола. Продукты экстрагируются хлористым метиленом, разделяются колоночной хроматографией.	2- <i>N</i> ,3'- <i>O</i> ,5'- <i>O</i> -триацетил-8-охо-dG	12%	Хроматография на силикагеле
Предлагаемый метод	В смеси безводного пиридина и ДМФА при кипячении проводится реакция 8-Br-dG со смесью ацетангидрида и ацетата натрия в присутствии <i>N</i> -метилимидазола. Продукты подвергаются щелочному гидролизу.	8-охо-dG	80%	Хроматография на силанизированном силикагеле

Экспериментальная часть

Растворители и жидкие реагенты (*N,N*-диметилформамид, пиридин, *N*-метилимидазол, уксусный ангидрид, триэтиламин) были перегнаны для очистки и обезвоживания согласно стандартным методикам. Сухие вещества были многократно соупарены с

пиридином и высушены под вакуумом, ацетат натрия – предварительно прокален для разрушения гидратов.

ВЭЖХ с УФ-детекцией и снятием спектров поглощения выполнялись на хроматографической системе Shimadzu, оснащенной насосом LC-20AD, детектором SPD-M20A, блоком дегазации DGU-20A, автосамплером SIL-20A, термостатом CTO-10AS.

Использовали колонку Phenomenex Luna C18 (2) и программный пакет LcSolution версия 1.25 для обработки хроматограмм. Растворители: А – 0.05 М орто-фосфорная кислота, В – ацетонитрил. Использовался градиент 5–20% ацетонитрила за 15 мин для неацилированных нуклеотидов и 5–40% ацетонитрила за 35 мин для ацилированных, скорость потока 1 мл/мин.

Препаративную хроматографию выполняли с помощью системы Isolera Four, $\lambda_1 = 254$ нм, $\lambda_2 = 300$ нм. Использовалась стеклянная колонка с адаптором, носитель – силикагель 60 silanased (0.063-0.2 mm), производитель Merck.

Тонкослойную хроматографию выполняли на пластинках TLC Silica gel 60 F 254 (Merck KGaA), в системах $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH}$, 9:1 для неацилированных нуклеотидов и 92:8 – для ацилированных.

^1H -ЯМР-спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре Bruker-400 с рабочей частотой 400 МГц; в качестве растворителей использовали дейтерированные хлороформ (CDCl_3) и диметилсульфоксид ($\text{DMSO}-d_6$), внутренний стандарт – сигналы остаточных хлороформа и диметилсульфоксида.

Для определения молекулярной массы использовали LC/MS-хроматограф 1100 LC (Agilent Technologies) с УФ- (254 нм) и масс-детектором – 1100 LCMSD (Agilent Technologies), APCI (с положительной ионизацией). HPLC: колонка Опух C18 (50×4.6 мм), растворитель А – 0.1% TFA в ацетонитриле/ H_2O (2.5:97.5), растворитель Б – 0.1% TFA в ацетонитриле, элюирование – градиент “В” 2.4 мин → “А” (удержание 0.2 мин) → 0.2 мин → “В”, скорость потока 3.75 мл/мин;

8-Бромо-2'-дезоксигуанозин (8-Br-dG) был получен по описанной ранее [10] реакции 2'-дезоксигуанозина с бромной водой. Выход: 96%. УФ-спектр (рН 3): $\lambda_{\text{max}} = 261$ нм. ^1H -ЯМР-спектр ($\text{DMSO}-d_6$, δ , м.д.): 3.46-3.75 (2 H, 5'-H), 3.75-4.01 (1 H, 4'-H), 4.01-

4.31 (1 H, 3'-H), 4.82-5.38 (4 H, 2'-H; 2'-, 3'-, 5'-OH), 5.75 (1 H, 1'-H), 6.48 (2 H, 2-NH₂), 10.81 (1-NH). R_f 0.2. ВЭЖХ, время удерживания 12 мин (градиент 5–20% ацетонитрила за 15 мин).

8-Оксо-2'-дезоксигуанозин (8-oxo-dG)

В 25 мл безводного *N,N*-диметилформамида суспендировали 800 мг (2.5 ммоль) сухого 8-бромо-2'-дезоксигуанозина и 2 г (25 ммоль) безводного ацетата натрия. Добавляли 0.5 мл безводного пиридина, 2 мл уксусного ангидрида и 20 мкл *N*-метилимидазола. При перемешивании реакционную смесь нагревали на глицериновой бане до 135 °С и поддерживали данную температуру.

Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ и ТСХ. Реакцию вели до исчезновения триацил-8-бромо-2'-дезоксигуанозина, в течение 28 ч.

После этого нейтрализовали остатки уксусного ангидрида, добавляя 20 мл 5% триэтиламмоний бикарбоната, и отгоняли растворитель на ротаторном испарителе.

Осадок заливали 0.1 М NaOH, перемешивали, оставляли на 1-2 ч. Ход гидролиза контролировали методами ВЭЖХ и ТСХ. Когда ацилированные производные переставали детектироваться, щелочь нейтрализовали 0.1 М уксусной кислотой до нейтрального pH, растворитель удаляли на ротаторном испарителе.

Сухой остаток несколько раз переупаривали с водой для удаления остаточного растворителя, растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и наносили на колонку с силанизированным силикагелем. Растворители – вода и этанол, градиент 0–5% этанола за 10 объемов колонки. Выход: 80%. УФ-спектр (рН 3): $\lambda_{\text{max}1} = 247$ нм, $\lambda_{\text{max}2} = 294$ нм. М 283. ^1H -ЯМР-спектр ($\text{DMSO}-d_6$, δ , м.д.): 3.41-3.66 (2 H, 5'-H), 3.67-3.98 (1 H, 4'-H), 3.98-4.21 (1 H, 3'-H), 4.71-5.22 (4 H, 2'-H; 2'-, 3', 5'-OH), 5.58 (1 H, 1'-H), 6.46 (2 H, 2-NH₂). R_f 0.43. ВЭЖХ, время удерживания 6.2 мин (5–20% ацетонитрила за 15 мин).

Список литературы:

1. Lee S.F., Pervaiz S. Assessment of oxidative stress-induced DNA damage by immunofluorescent analysis of 8-oxo-dG // *Methods Cell Biol.* 2011. V. 103. P. 99–113.
2. Невредимова Т.С., Мармий Н.В., Есипов Д.С. Есипова О.В., Швец В.И. 8-Оксо-2'-дезоксигуанозин – биомаркер окислительного стресса // *Вестник МИТХТ*. 2014. Т. 9. № 5. С. 3–10.
3. Cheng K.C., Cahill D.S. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, cause G-T and A-C substitutions // *J. Biol.Chem.* 1992. V. 267. № 1. P. 166–172.
4. Мармий Н.В., Невредимова Т.С., Есипов Д.С. Влияние мелатонина на образование 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в условиях реакции Фентона // *Тонкие химические технологии*. 2015. Т. 10. № 1. С. 50–55.

References:

1. Lee S.F., Pervaiz S. Assessment of oxidative stress-induced DNA damage by immunofluorescent analysis of 8-oxo-dG // *Methods Cell Biol.* 2011. V. 103. P. 99–113.
2. Nevredimova T.S., Marmiy N.V., Esipov D.S. Esipova O.V., Shvets V.I. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine – biomarker of oxidative stress // *Vestnik MITHT (Fine Chem. Technol.)*. 2014. V. 9. № 5. P. 3–10. (in Russ.).
3. Cheng K.C., Cahill D.S. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, cause G-T and A-C substitutions // *J. Biol.Chem.* 1992. V. 267. № 1. P. 166–172.
4. Marmiy N.V., Nevredimova T.S., Esipov D.S. Influence of melatonin on the formation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine under the conditions of the Fenton reaction // *Tonkie khimicheskie tekhnologii (Fine Chem. Technol.)*.

5. Мармий Н.В., Есипов Д.С. Биологическая роль 8-оксо-2'-дезоксигуанозина // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2015. № 4. С. 19–23.
6. Kim D.H., Cho I.H., Kim H.S., Jung J.E., Kim J.E., Lee K.H., Park T., Yang Y.M., Seong S.Y., Ye S.K., Chung M.H. Anti-inflammatory effects of 8-hydroxydeoxyguanosine in LPS-induced microglia activation: suppression of STAT3-mediated intercellular adhesion molecule-1 expression // *Exp. Mol. Med.* 2006. V. 38. № 4. P. 417–427.
7. Hong G.U., Kim N.G., Jeoung D., Ro J.Y. Anti-CD40 Ab- or 8-oxo-dG-enhanced Treg cells reduce development of experimental autoimmune encephalomyelitis via downregulating migration and activation of mast cells // *J. Neuroimmunol.* 2013. V. 260. № 1. P. 60–73.
8. Hajas G., Bacsı A., Aguilera-Aguirre L., Hegde M., Tapas H., Sur S., Radak Z., Ba X., Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1 // *Free Rad. Biol. Med.* 2013. V. 61. P. 384–394.
9. Мармий Н.В., Моргунова Г.В., Есипов Д.С., Хохлов А.Н. 8-Оксо-2'-дезоксигуанозин: биомаркер клеточного старения и окислительного стресса или потенциальное лекарство против возрастных болезней? // *Клиническая геронтология.* 2016. Т. 22. № 9-10. С. 46–47.
10. Lin T., Cheng J., Ishiguro K., Sartorelli A. 8-Substituted guanosine and 2'-deoxyguanosine derivatives as potential inducers of the differentiation of friend erythroleukemia cells // *J. Med. Chem.* 1985. V. 28. P. 1194–1198.
11. Bodepudi V., Shibutani S., Johnson F. Synthesis of 2'-Deoxy-7,8-dihydro-8-oxoguanosine and 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoadenosine and their incorporation into oligomeric DNA // *Chem. Res. Toxicol.* 1992. V. 5. P. 608–617.
12. Chatgililoglu C., Navacchia M., Postigo A. A facile one-pot synthesis of 8-oxo-7,8-dihydro-(2'-deoxy) adenosine in water // *Tetrahedron Lett.* 2006. V. 47. № 5. P. 711–714.
13. Geiger A., Selige H., Nehls P. A new approach for the efficient synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the mutagenic DNA modification 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine at predefined positions // *Nucleosides and Nucleotides.* 1993. V. 12. № 5. P. 463–477.
14. Roelen H.C.P.F., Saris C.P., Brugghe H.F., Elst H., Westra J.G., Marel G.A., Boom J.H. Solid-phase synthesis of DNA fragments containing the modified base 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine // *Nucl. Acid Res.* 1991. V. 19. № 16. P. 4361–4369.
2015. V. 10. № 1. P. 50–55. (in Russ.).
5. Marmiy N.V., Yesipov D.S. The biological role of 8-oxo-2'-deoxyguanosine // *Bulletin of Moscow University. Series 16: Biology.* 2015. № 4. P. 19–23.
6. Kim D.H., Cho I.H., Kim H.S., Jung J.E., Kim J.E., Lee K.H., Park T., Yang Y.M., Seong S.Y., Ye S.K., Chung M.H. Anti-inflammatory effects of 8-hydroxydeoxyguanosine in LPS-induced microglia activation: suppression of STAT3-mediated intercellular adhesion molecule-1 expression // *Exp. Mol. Med.* 2006. V. 38. № 4. P. 417–427.
7. Hong G.U., Kim N.G., Jeoung D., Ro J.Y. Anti-CD40 Ab- or 8-oxo-dG-enhanced Treg cells reduce development of experimental autoimmune encephalomyelitis via downregulating migration and activation of mast cells // *J. Neuroimmunol.* 2013. V. 260. № 1. P. 60–73.
8. Hajas G., Bacsı A., Aguilera-Aguirre L., Hegde M., Tapas H., Sur S., Radak Z., Ba X., Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1 // *Free Rad. Biol. Med.* 2013. V. 61. P. 384–394.
9. Marmiy N.V., Morgunova G.V., Esipov D.S., Khokhlov A.N. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine: a biomarker of cellular aging and oxidative stress or a potential medicine against age-related diseases? // *Klinicheskaya gerontologiya (Clinical Gerontology).* 2016. V. 22, № 9-10. P. 46–47. (in Russ.).
10. Lin T., Cheng J., Ishiguro K., Sartorelli A. 8-Substituted guanosine and 2'-deoxyguanosine derivatives as potential inducers of the differentiation of friend erythroleukemia cells // *J. Med. Chem.* 1985. V. 28. P. 1194–1198.
11. Bodepudi V., Shibutani S., Johnson F. Synthesis of 2'-Deoxy-7,8-dihydro-8-oxoguanosine and 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoadenosine and their incorporation into oligomeric DNA // *Chem. Res. Toxicol.* 1992. V. 5. P. 608–617.
12. Chatgililoglu C., Navacchia M., Postigo A. A facile one-pot synthesis of 8-oxo-7,8-dihydro-(2'-deoxy) adenosine in water // *Tetrahedron Lett.* 2006. V. 47. № 5. P. 711–714.
13. Geiger A., Selige H., Nehls P. A new approach for the efficient synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the mutagenic DNA modification 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine at predefined positions // *Nucleosides and Nucleotides.* 1993. V. 12. № 5. P. 463–477.
14. Roelen H.C.P.F., Saris C.P., Brugghe H.F., Elst H., Westra J.G., Marel G.A., Boom J.H. Solid-phase synthesis of DNA fragments containing the modified base 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine // *Nucl. Acid Res.* 1991. V. 19. № 16. P. 4361–4369.

Об авторах:

Мармий Наталья Владимировна, аспирант кафедры биоорганической химии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (117449, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12).

Есипов Дмитрий Станиславович, кандидат химических наук, доцент кафедры биоорганической химии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. (117449, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12).