

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ОБРАЗОВАНИЕ 8-ОКСО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНА В УСЛОВИЯХ РЕАКЦИИ ФЕНТОНА

**Н.В. Мармий^{1, @}, аспирант, Т.С. Невредимова², аспирант,
Д.С. Есипов¹, доцент**

¹ Кафедра биоорганической химии, Биологический факультет,
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

² Кафедра биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119571 Россия

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

В работе изучено влияние мелатонина в трех концентрациях на образование 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-охо-dG) в условиях реакции Фентона. Методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрической детекцией была получена воспроизводимая кинетическая кривая накопления 8-охо-dG в данной реакции. При добавлении мелатонина во всех трех исследуемых концентрациях наблюдалось заметное изменение формы кинетической кривой с достоверным понижением детектируемого количества 8-охо-dG в большинстве ее контрольных точек. Это позволяет говорить об ингибировании мелатонином образования 8-охо-dG в данной реакции и подтверждает гипотезы о прямом, негормональном, антиоксидантном действии мелатонина. Однако зависимость ингибирующего эффекта от концентрации мелатонина не является прямой, наибольшая из исследуемых концентраций мелатонина (60 мкг/мл) дает наименее выраженный эффект.

Ключевые слова: 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, мелатонин, реакция Фентона, антиоксидантное действие, обращенно-фазовая ВЭЖХ, электрохимическая детекция.

EFFECT OF MELATONIN ON FORMATION OF 8-OXO-2'-DEOXYGUANOSINE UNDER FENTON REACTION CONDITIONS

N.V. Marmiy^{1, @}, T.S. Nevredimova², D.S. Esipov¹

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Biology faculty, Moscow, 119991 Russia

² M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow,
119571 Russia

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

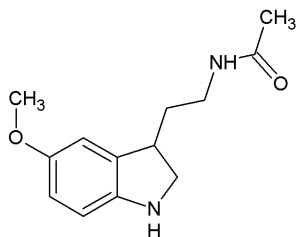
In this paper we studied the effect of melatonin at three concentrations on the formation of 8-oxo-2'-dioxiguanosine (8-oxo-dG) under the conditions of the Fenton reaction. Reproducible kinetic curve of 8-oxo-dG accumulation in this reaction was obtained by the method of reversed-phase high performance liquid chromatography with amperometric detection. When adding melatonin in all three concentrations studied, there was a noticeable change in the shape of the kinetic curve with a significant decrease in the amount of detected 8-oxo-dG in most of its control points. This suggests the melatonin inhibition of 8-oxo-dG formation in the reaction and confirms the hypothesis of a direct, non-hormonal, antioxidant effect of melatonin. However, the dependence of the inhibitory effect of melatonin on its concentration is not a straight line. The higher of the studied concentrations of melatonin (60 mg/mL) gave the least pronounced effect.

Keywords: 8-oxo-2'-deoxyguanosine, melatonin, Fenton reaction, antioxidant effect, reversed-phase HPLC, electrochemical detection.

За последние десятилетия проблемы окислительного стресса и антиоксидантной терапии получают все более широкий отклик в биологии и медицине. Многочисленные исследования показывают, что

ряд хронических, острых и возрастных заболеваний сопровождается выраженным увеличением уровня окислительных повреждений биомолекул [1, 2]. В связи с этим особую актуальность приобретают поиск

и изучение эффективных и безопасных антиоксидантов. Возможно, одним из таковых является мелатонин:



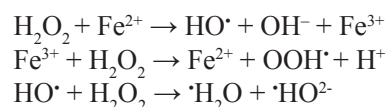
Это производное аминокислоты триптофана, синтезируемое в основном секреторными клетками эпифиза, имеет многогранные и не вполне изученные биологические функции. Мелатонин – один из немногих гормонов, имеющих как мембранные, так и ядерные рецепторы, а значит, и широкий спектр «подконтрольных» процессов. Он является одним из древнейших биологически активных соединений, встречается не только у животных, но также у простейших и растений, помимо эпифиза этот гормон синтезируется в организме человека нейроэндокринными клетками желудочно-кишечного тракта, почечных канальцев и дыхательных путей, и даже неэндокринными клетками крови, сетчатки глаза и внутреннего уха. Мелатонин участвует в регуляции функций иммунной системы, кровяного давления, работы пищеварительного тракта, управляет секрецией ряда гормонов гипофиза и выработкой таких важнейших нейромедиаторов, как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) и серотонин. Однако наиболее известной его ролью является регуляция суточных ритмов сна–бодрствования, а также сезонных циклов многих млекопитающих. Секреция мелатонина у человека имеет выраженный суточный ритм, возрастая к привычному времени сна и достигая максимума в промежутке от полуночи до 5 часов утра. На основе мелатонина созданы и применяются лекарства против бессонницы, депрессии и для облегчения адаптации при смене часовых поясов. Однако помимо этого мелатонин показывает антиоксидантное, противоопухолевое и геропротекторное (его секреция снижается с возрастом) действие. В частности, он показывает протективный эффект в экспериментах на клеточных культурах, подвергнутых воздействию оксидантов, и терапевтический в экспериментах *in vivo* на моделях ряда заболеваний, сопряженных с окислительным стрессом [3–5].

Однако относительно механизма антиоксидантного действия мелатонина мнения исследователей расходятся. Достоверно известна его способность влиять через ядерные рецепторы на промоторы генов некоторых антиоксидантных ферментов (в том числе супероксиддисмутазы). Но также существуют данные, свидетельствующие о способности мелатонина прямо взаимодействовать со многими распространенными активными формами кислорода и азота. Правда, в подобных исследованиях исполь-

зовались концентрации, более высокие, чем природные и терапевтические и, в большинстве своем, эксперименты выполнены на моделях перекисного окисления липидов [6, 7]. Поэтому в данной работе мы решили оценить влияние физиологических (соответствующих среднему ночному уровню в крови человека) и терапевтических (соответствующих рекомендованной и предельной дозировке препарата «Мелаксен») концентраций мелатонина на окисление 2'-дезоксигуанозина в водной фазе.

Выбор в качестве субстрата 2'-дезоксигуанозина обусловлен тем, что продукт его окисления – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин является на настоящий момент наиболее известным биомаркером окислительного повреждения ДНК [8–10]. В нашей лаборатории имеется отработанная и прошедшая валидацию методика его количественного определения при помощи обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией [11, 12].

Для генерации активных форм кислорода использовалась реакция пероксида водорода с ионами железа, называемая реакцией Фентона [13]:



Однако при инкубации 2'-дезоксигуанозина с перекисью водорода и двухвалентным железом не удается получить хорошо воспроизводимую кривую накопления 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в реакционной смеси. Максимальное количество 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в такой реакции наблюдается на 10–30-й минутах инкубации и довольно сильно варьирует при повторях эксперимента. Редокс-потенциал среды при этом меняется в широком диапазоне: от +13 до +470 мВ. Это связано с достаточно широким спектром образующихся в такой системе продуктов, большая часть которых не детектируется в наших условиях.

Для живых клеток более характерна ситуация хронического окислительного стресса на фоне радикальных превращений белков, липидов и малых молекул, а не «бомбардировки» ДНК большим числом чрезвычайно активных кислородных радикалов. Поэтому в качестве экспериментальной модели мы использовали модифицированный вариант реакции Фентона, ранее применявшийся для «биохимического» синтеза 8-оксо-2'-дезоксигуанозина [14], отличающийся добавлением в реакционную смесь аскорбиновой кислоты. Радикалы аскорбиновой кислоты долгоживущие и менее активные, чем кислородные радикалы. Они играют роль «буфера» радикальных форм, что приводит к более длительному и плавному течению реакции, появлению фазы плато. Редокс-потенциал среды при этом удерживается на примерно одинаковом уровне +427

÷ +429 мВ в течение всего времени реакции. 8-Оксо-2'-дезоксигуанозин в таком варианте реакции является преобладающим продуктом окисления, как и в живой клетке, где он составляет до 5% от общего количества модифицированных оснований ДНК [8].

Экспериментальная часть

В работе использовались: 2'-дезоксигуанозин («Sigma»), L(+)-аскорбиновая кислота («Panreac»), перекись водорода 3% (Лаверна), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ («Химмед»), ЭДТА («Chemika»), мелатонин («Helikon»), ацетат аммония («Химмед»), ацетонитрил HPLC-R («Biosolve»).

Аналитическую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) реакционной смеси проводили на хроматографе «Beckman» (США), оснащенный двумя насосами модели 114М «Beckman», УФ-детектором «Knauer» с переменной длиной волны (детекцию осуществляли при длине волны 254 нм и толщине кюветы 2 мм), инжектором Altex 210A Valve «Beckman», контроллером Beckman 421A, электрохимическим детектором фирмы «НПО Химавтоматика». Использовали колонку ULTRASPHERE ODS (5 мкм, 4,6×250 мм) фирмы «Beckman».

УФ-спектры регистрировали на спектрометре Helios α «Unicam» (Великобритания) в интервале длин волн 220–300 нм.

Хроматограммы регистрировали с помощью программы «Мультихром» («Ampersand Ltd» версия 3, Россия).

Окисление 2'-дезоксигуанозина в условиях реакции Фентона

В дистиллированной воде растворяли 62.7 мг (0.25 ммоль) 2'-дезоксигуанозина и 24 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.08 ммоль), перемешивали на магнитной мешалке до полной прозрачности раствора (15 мин). Затем последовательно добавляли 2 мл 0.5 М ЭДТА (1 ммоль), 10 мл 0.1 М аскорбиновой кислоты (1 ммоль), рассчитанное количество раствора мелатонина и 3 мл 3% перекиси водорода. В первой серии опытов мелатонин добавляли до конечной концентрации 60 мкг/мл (0.25 мкмоль/мл), во второй – 8 нг/мл (0.034 нмоль/мл), в третьей – 300 пкг/мл (1.29 пкмоль/мл). В контрольных экспериментах мелатонин не добавляли. Объем реакционной смеси во всех случаях доводили дистиллированной водой до 50 мл. Раствор фильтровали через ацетатный фильтр с размером пор 0.45 мкм в трехгорлую колбу, обернутую двумя слоями фольги. Раствор нагревали до 37°C и через него пропускали воздух через пористый фильтр со скоростью 60 л/ч. Реакцию проводили в течение 180–240 мин при 37°C. Из реакционной смеси отбирали образцы для ВЭЖХ-ЭД-анализа каждые 20 мин.

Образцы реакционной смеси анализировали с помощью ОФ ВЭЖХ с амперометрической и

УФ-детекцией при потенциале электрода $E = 0.4$ В и длине волны λ 254 нм. Использовали изократический режим с 7% ацетонитрила в 0.1 М AcONH_4 . При этом время выхода dG составило 7.4 мин, а 8-охо-dG – 9.3 мин.

Калибровку колонки по 2'-дезоксигуанозину проводили, используя стоковый раствор с концентрацией 56 о.е./мл, последовательным разбавлением в 1.5 раза до минимальной концентрации 1.6 о.е./мл.

Для калибровки колонки по 8-оксо-2'-дезоксигуанозину использовали стандартный раствор с концентрацией 0.41 о.е./мл, который последовательно разбавляли в 4 раза до минимальной концентрации 0.00085 о.е./мл.

Полученные калибровочные образцы анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ с УФ- и электрохимической детекцией.

Результаты и их обсуждение

Кинетика образования 8-оксо-2'-дезоксигуанозина

По данным предварительных экспериментов, кривая образования 8-охо-dG в модифицированном варианте реакции Фентона выходила на плато на отрезке 180–200 мин, с 220-й минуты начиналось медленное снижение отношения 8-охо-dG/dG, предположительно обусловленное дальнейшим окислением 8-охо-dG в водном растворе. В начальные моменты реакции (10, 15 мин и условный «старт» – сразу после фильтрации и переноса в колбу) содержание 8-охо-dG было незначительно, в стартовой точке близко к нулю. Поэтому пробы для анализа отбирали каждые 20 мин с 20-й по 200-ю минуту реакции. На рис. 1 показана кривая изменения содержания 8-охо-dG в реакционной смеси во времени (*кривая 1*).

Кинетическую кривую реакции окисления dG можно разделить на начальный участок, область линейного роста (40–80 мин), область нелинейного роста (100–140 мин), плато (160–200 мин), далее происходит падение концентрации 8-охо-dG. Результаты по точкам анализа повторяются с высокой достоверностью. Максимальное значение соотношения 8-охо-dG/dG составляет 72 нмоль/мкмоль и наблюдается на 140-й минуте реакции.

Поскольку стоковый раствор мелатонина был приготовлен в 1% этаноле, для исключения вероятности влияния спирта была проведена реакция с добавлением вместо воды соответствующего объема (17.6 мл) 1% этанола (максимальный объем раствора мелатонина в дальнейшем). Кривая образования 8-охо-dG в присутствии этанола (*кривая 2*) практически не отличалась от таковой в его отсутствие.

Влияние различных концентраций мелатонина на течение и выход реакции окисления dG *in vitro*

Для исследования были выбраны три концентрации мелатонина – максимальная нетоксичная

(20 мг/кг), естественная концентрация в крови человека в ночное время (300 пг/мл) и максимальная концентрация в крови человека, определенная в фармакокинетических исследованиях препарата «Мелаксен» (0.05 мг/кг). В пересчете на массу ДНК (учитывая среднее количество выделяемой из печени ДНК – 44.4 мкг из 1 г печеночной ткани) в реакционной смеси максимальная нетоксичная концентрация примерно соответствует 60 мкг/мл, лекарственная – 8 нг/мл. Самую низкую, физиологическую концентрацию брали без пересчета – 300 пг/мл реакционной смеси.

Как видно из рис. 2, на кинетических кривых образования 8-охо-dG в присутствии мелатонина во всех трех концентрациях участки линейного роста отсут-

ствуют, после небольшого участка нелинейного роста следует плато с недостоверным понижением. Такая форма кривой существенно отличается от контрольной. Максимальное среднее значение отношения 8-охо-dG/dG для реакции с 60 мкг/мл мелатонина (кривая 3) составляет 32.79 нмоль/мкмоль, что более, чем в 2 раза ниже контрольного (77 нмоль/мкмоль), и наблюдается на 60-й минуте. При добавлении мелатонина в концентрации 8 нг/мл (кривая 4) максимальное значение отношения 8-охо-dG/dG составляет 13.31 нмоль/мкмоль, что более, чем в 5 раз меньше контрольного, максимум наблюдается на 40-й минуте. При использовании мелатонина в концентрации 300 пг/мл (кривая 5) максимум также наблюдается на 40-й минуте и составляет 21.17 нмоль/мкмоль.

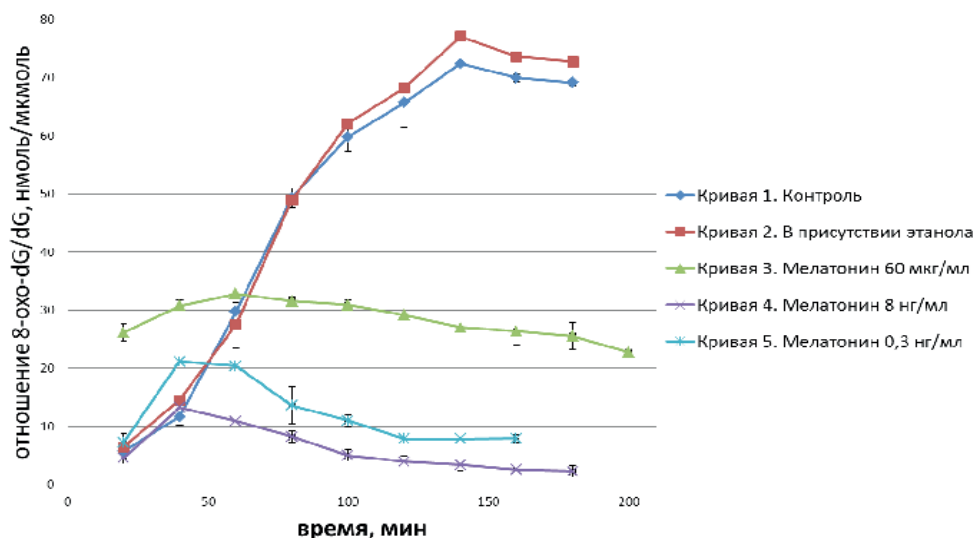


Рис. 1. Кривые накопления 8-охо-dG в условиях модифицированного варианта реакции Фентона (см. Эксперимент. часть) в отсутствие и в присутствии мелатонина в различных концентрациях: 1 – водный раствор; 2 – с добавлением 1% раствора этанола; 3 – мелатонин 60 мкг/мл; 4 – мелатонин 8 нг/мл; 5 – мелатонин 300 пг/мл.

Таким образом, добавление мелатонина в любой из трех концентраций приводит к сходным изменениям формы кинетической кривой и значительному понижению максимального значения отношения 8-охо-dG/dG. Это может служить веским доводом в пользу прямого, а не опосредованного гормональными каскадами антиоксидантного действия мелатонина. Кроме того, как показал эксперимент, даже в очень низких, соответствующих физиологическим концентрациям мелатонин способен подавлять окисление дезоксигуанозина.

Однако зависимость влияния мелатонина на образование 8-охо-dG от концентрации этого антиоксиданта в растворе не прямая и нелинейная. Промежуточная концентрация (8 нг/мл) наиболее эффективно подавляет окисление. Вариантов объяснения этого явления может быть несколько. Возможно, что в высоких концентрациях мелатонин сам является переносчиком радикалов, как многие антиоксиданты, проявляя в этом случае проокси-

дантное действие. С другой стороны, существует мнение, что 6-гидроксимелатонин имеет большую антиоксидантную активность, чем неокисленный мелатонин [15]. Соответственно, в определенных концентрациях мелатонин может ингибировать собственное окисление, а значит, и активность его продукта. Третий вариант объяснения предполагает сложный механизм протекающей реакции. В 2012 году вышла в свет статья Лима с соавт. [16], в которой были описаны результаты изучения окисления дезоксигуанозина *in situ* в различных условиях методом изотопных меток. Согласно данным статьи, 8-охо-dG имеет более низкий окислительно-восстановительный потенциал, чем dG (0.58–0.75 В против 1.29 В для dG) и легко подвергается дальнейшему окислению (рис. 2). Вероятно, за счет этого и происходит выход кинетической кривой окисления 2'-дезоксигуанозина на плато и дальнейшее снижение содержания 8-охо-dG в реакционной смеси.

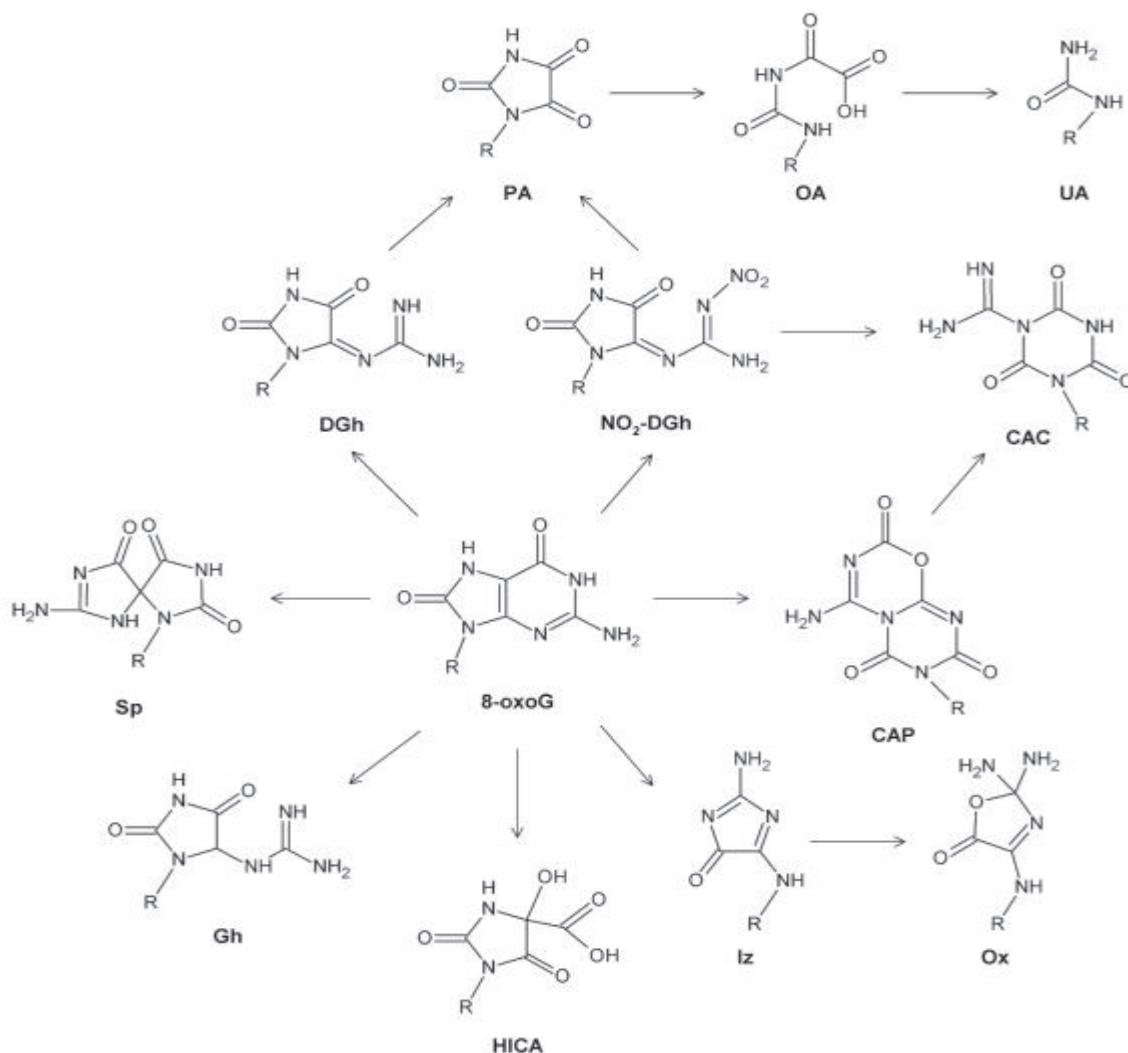


Рис. 2. Возможные пути распада 8-оксо-dG в реакционной смеси [16].

При этом при соответствующих нашему эксперименту значениях pH возможны альтернативные пути дальнейших преобразований 8-оксо-dG – радикальный и нерадикальный (см. рис. 2). При использовании больших концентраций мелатонина блокируется не только окисление dG до 8-оксо-dG, но и радикальный путь дальнейших преобразований последнего. За счет обратимости реакций присоединения воды в нерадикальном пути окисления, его выходы намного ниже, и понижение концентрации 8-оксо-dG замедляется.

Для точного выяснения, какой из возможных механизмов имеет место, требуются дополнительные исследования. Однако, какими бы не были причины наибольшей эффективности мелатонина в концентрации 8 нг/мл, это согласуется с рекомендациями по дозировке, указанными в инструкции к препарату. Концентрация 8 нг/мл соответствует в пересчете на ДНК максимальному содержанию мелатонина в крови при терапии препаратом «Мелаксен» в рекомендованных дозах. Эффективность

именно такой дозировки была показана производителем лекарства в доклинических и клинических испытаниях и в очередной раз подтверждена на нашей модели *in vitro*. То есть, можно предположить, что в дальнейшем подобная модель может найти применение для предварительного подбора доз и оценки эффективности антиоксидантных препаратов. Использование тестов *in vitro* позволило бы сократить как затраты на доклинические испытания, так и масштабы экспериментов на животных при их проведении.

Список литературы:

1. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. // J. Proc. Nat. Acad. Sci. 1993. V. 90. № 17. P. 7915–7922.
2. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. // Clin. Chem. 2006. V. 52. № 4. P. 601–623.
3. Анисимов В.Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике [Электронный ресурс]: <http://www.moscowuniversityclub.ru/home.asp?artId=13740>.

4. Эльбекьян К.С., Муравьева А.Б., Пажитнева Е.В. // Фундаментальные исследования. 2013. № 9. Т. 1. С. 178–181.
5. Kedziora-Kornatowska K., Szewczyk-Golec K., Kozakiewicz M. [et al.] // J. Pineal Res. 2009. V. 46. P. 333–337.
6. Арушанян Э.Б. // Эксп. и клинич. фармакология. 2012. Т. 75. № 5. С. 44–49.
7. Reiter R.J., Tan D., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Czarnocki Z. // J. Acta Biochim. Pol. 2003. V. 50. №. 4. P. 1129–1146.
8. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C. // J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 2009. V. 27. № 2. P. 120–139.
9. Wu L.L., Chiou C.C., Chang P.U. // Clin. Chim. Acta. 2004. V. 339. P. 1–9.10.
10. Borrego S., Vazquez A., Dasí F., Cerdá C., Iradi A., Tormos C., Sánchez J.M., Bagán L., Boix J., Zaragoza C., Camps J., Sáez G. // J. Mol. Sci. 2013. V. 14. № 2. P. 3467–3486.
11. Есипов Д.С., Сидоренко Е.В., Есипова О.В., Горбачева Т.А., Невредимова Т.С., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П. // Вестник МИТХТ. 2010. Т. 5. № 3. С. 69–74.
12. Есипов Д.С., Есипова О.В., Зиневич Т.В., Горбачева Т.А., Невредимова Т.С., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П. // Вестник МИТХТ. 2012. Т. 7. № 1. С. 61–65.
13. Haber F., Weiss J.J. // Proc. R. Soc. London [Biol.]. 1934. Ser. A. № 147. P. 332–351.
14. Cheng K.C., Cahill D.S. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 1. P. 166–172.
15. Bonnefont-Rousselot D., Collin F., Jore D., Gardès-Albert M. // J. Pineal Res. 2011. V. 50. № 3. P. 328–335.
16. Lim K.S., Cui L., Taghizadeh K., Wishnok J.S., Chan W., DeMott M.S., Babu I.R., Tannenbaum S.R., Dedon P.C. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. № 43. P. 18053–18064.