

8-ОКСО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИН – БИОМАРКЕР ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Т.С. Невредимова^{1,*}, аспирант, Н.В. Мармий², аспирант,

Д.С. Есипов², доцент, О.В. Есипова¹, доцент,

В.И. Швец¹, заведующий кафедрой, академик РАН

¹кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119571 Россия

²кафедра Биоорганической химии, Биологический факультет,

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

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

8- Оксо-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG) является преобладающей формой свободнорадикального повреждения ДНК. С момента его обнаружения в 1983 году, это соединение определяют в различных тканях и жидкостях организма: в крови, моче, мозге, печени и др. В данном обзоре рассматривается роль 8-охо-dG в качестве биомаркера окислительного стресса, предиктора течения заболевания и успеха применяемой терапии у больных, а также методы, с помощью которых он сегодня детектируется в биологических образцах.

Ключевые слова: 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, окислительный стресс, биомаркеры окислительного стресса.

Ядерная ДНК и другие молекулы в живых системах постоянно подвергаются воздействию образующихся внутри организма кислородных метаболитов (активных форм кислорода, АФК), таких как супероксиданион-радикал (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2) и высокореактивный гидроксил-радикал ($OH^\cdot$). Химические и внешние физические агенты (ионизирующее излучение, ультрафиолетовый компонент солнечного света) также могут окислять как основания в

ДНК, так и 2'-дезоксирибозу. На сегодняшний день выделены и охарактеризованы разнообразные окисленные производные всех четырех нуклеозидов, входящих в состав ДНК [1]. Из природных азотистых оснований гуанин обладает самым низким потенциалом ионизации, поэтому наиболее подвержен окислительному повреждению [2]. В результате реакции 2'-дезоксигуанозина (dG) с гидроксилрадикалами образуется 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG):

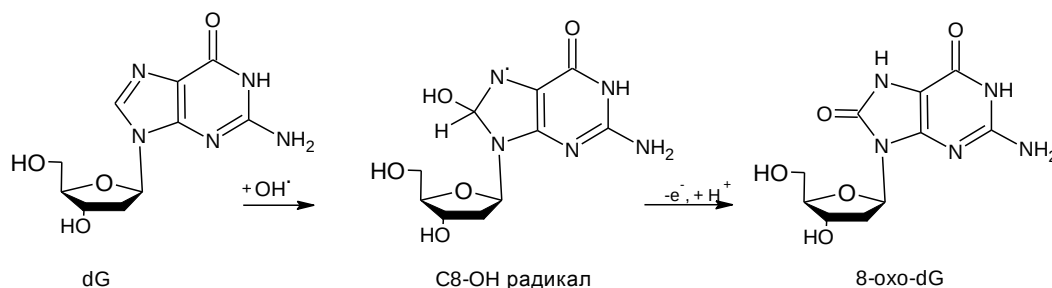


Схема образования 8-охо-dG.

8-Охо-dG составляет около 5% от общего числа окисленных оснований, которые обнаружены в ДНК [3]. О 8-охо-dG впервые сообщили в своей работе Н. Касаи и С. Нишимура в 1983 году [4]. С тех пор это соединение определяют в различных тканях и жидкостях организма: в крови, моче, мозге, печени и др.

Во многих лабораториях были предложены свои методы определения содержания модифицированных оснований в ДНК. Для получения корректных результатов измерений важно, чтобы при подготовке проб в ДНК вносилось минимум дополнительных окислительных модификаций. Чувствительности метода должно хватить, чтобы определить несколько повреждений на 10^6 – 10^7 нуклеозидов в образцах ДНК массой 20–30 мкг. Для решения методологи-

ческих проблем и достижения точной оценки базового уровня 8-охо-dG в биологических образцах в 1997 году был создан Европейский комитет по стандартизации окислительного повреждения ДНК (ESCODD) [5]. С комитетом сотрудничают исследовательские группы из Италии, Франции, Словакии, Бельгии, Германии, Дании, Швеции, Польши, Швейцарии и Испании (более 25 лабораторий). Разработанные к настоящему времени методы определения 8-охо-dG в биологических объектах можно подразделить на хроматографические, ферментативные, иммунохимические и использующие метки (радиоактивные либо флуоресцентные). При этом хроматографические методы позволяют получить наиболее точный количественный результат, к достоинствам ферментативных от-

носится возможность работы с единичной клеткой, иммунохимические методы удобны для массового анализа, а использующие метки имеют наибольшую чувствительность.

Ферментативные методы

В ферментативных методах используются специфические ДНК-гликозилазы, участвующие в репарации окислительных повреждений ДНК живых клеток. Эти ферменты вырезают окисленные основания из цепочки ДНК, а при последующем щелочном гидролизе на месте отсутствующего основания возникает разрыв ДНК. За счет внесения разрывов цепочка ДНК фрагментируется, а фрагменты различной длины могут быть разделены методами электрофореза (comet assay) или щелочного элюирования.

Для определения окисленных модификаций гуанозина в ферментативных методах обычно используется фермент формамидопиримидин-гликозилаза (Fpg). Она распознает 8-охо-dG и продукт его дальнейшего окисления – формамидопиримидин (Fapy), а также алкилированные основания ДНК. Однако, если требуется специфичность к 8-охо-dG, целесообразно использовать 8-оксогуанозин-гликозилазу (hOGG-1), распознающую только его.

При использовании метода щелочного элюирования клетки лизируются на поверхности фильтра, обрабатываются ферментами, а затем ДНК элюируется щелочным раствором. Скорость элюции ДНК определяется путем подсчета количества ДНК в собранных фракциях и напрямую коррелирует с длиной фрагментов ДНК и, следовательно, с числом разрывов цепи. Для количественного определения ДНК во фракциях чаще всего используют флуоресцентный интеркалирующий краситель (этидий бромид).

Метод комет (comet assay) был разработан в 1984 году [6]. Впоследствии он неоднократно модифицировался и усовершенствовался с целью упрощения и повышения чувствительности метода [7–10]. Метод комет основан на способности денатурированных фрагментов ДНК двигаться под действием электрического тока. Неповрежденная ДНК движется медленнее и остается в пределах нуклеоида, а поврежденная движется быстро. В данном методе клетки вводятся в агарозный гель на предметном стекле, лизируются в щелочных условиях, затем обрабатываются ферментами, подвергаются щелочному гидролизу, и далее проводится электрофорез. Затем ДНК проявляется под флуоресцентным микроскопом при помощи интеркалирующего красителя. Оценивая «хвост кометы» из фрагментированной ДНК, его форму и направление перемещения, можно судить о степени повреждения ДНК. Увеличение количества таких повреждений указывает на повышение уровня окислительного стресса [11].

Базовый уровень повреждений, который можно оценить с использованием данных методов, составляет 0.1–0.2 повреждения на миллион нуклеозидов. Метод комет – единственный на сегодняшний день метод, позволяющий определять наличие 8-охо-dG в индивидуальной клетке, а не в среднем по ткани. Однако количественная точность его вызывает сомнения. Неизвестно, способен ли фермент узнать и удалить все окисленные основания. Сложно гарантировать равномерное распределение фермента по хроматину при отсутствии перемешивания и гомогенизации, а значит, некоторые удаленные или закрытые пространственной структурой модифицированные основания могут избежать вырезания. Если несколько поврежденных оснований находятся рядом, то в результате их удаления образуется один разрыв. А если 8-охо-dG находится на конце молекулы ДНК (в теломере), то из-за малой длины фрагмента он может вообще не детектироваться. Это приводит к недооценке уровня окислительного повреждения. Возможна и его переоценка – если помимо окисленных оснований в ДНК исходно присутствуют разрывы цепи (что типично, например, для радиоактивного повреждения). Ферментативные методы не позволяют отличить модификации оснований от разрывов ДНК.

В то же время метод комет быстрый и может быть использован на небольшом количестве клеток, что делает его привлекательным для исследований на человеке, особенно при проведении больших эпидемиологических исследований.

Иммуноферментный метод

Метод иммуноферментного анализа (ИФА, enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) широко используется для определения самых разнообразных соединений, в том числе и окисленных оснований ДНК. Он основан на специфической реакции антиген – антитело. Наиболее распространен для анализа окисленных нуклеотидов ИФА на ДНК-связывающих мембранах. Образец ДНК наносят на мембрану и инкубируют с первичными антителами, специфичными к определяемому поврежденному основанию. Затем непрореагировавшие антитела отмывают, а мембрану обрабатывают вторичными антителами, специфичными к фрагментам первичных (IgG), и конъюгированными с ферментом (например, пероксидазой). Далее, после отмывки непрореагировавших антител, измеряют активность фермента (обычно субстраты подбирают так, что это можно сделать по флуоресценции или окрашиванию). Измеренная активность коррелирует с количеством определяемого соединения. Возможны и другие подходы к ИФА (иммобилизация антител, а не

ДНК), однако в любом случае, очевидно, что метод является полуколичественным. Нельзя гарантировать полную отмычку непрореагировавших антител и отсутствие неспецифического связывания и кросс-реактивности к другим основаниям. Все это приводит к очевидному завышению уровня 8-охо-dG в сравнении с хроматографическими методами и отсутствию линейной корреляции с ними. Однако при наличии готовых буферов и антител метод является самым простым и быстрым, не требует дорогостоящего оборудования и длительной пробоподготовки, позволяет определять 8-охо-dG не только в составе ДНК любых тканей, но и в мономерном виде в биологических жидкостях (крови, моче, ликворе, культуральной среде). В связи с этим ИФА самый подходящий метод для массовых определений содержания 8-охо-dG. На сегодняшний день в проводимых исследованиях часто используется кит (JalCA), разработанный в Японском институте по контролю старения. Антитела, применяемые в данном ките, N45.1 обладают высокой специфичностью. Усовершенствование производства JalCA kit (уменьшение диапазона калибровочной кривой, рекомендации по строгому контролю температуры) уменьшило расхождения в оценке основных уровней между ИФА и хроматографическими методами [12, 13].

Стоит упомянуть, что в 2012 году японскими учеными был запатентован и протестирован автоматический анализатор содержания 8-охо-dG в человеческой моче, работающий на основе моноклональных антител и не требующий никаких предварительных манипуляций по выделению и очистке ДНК [14].

Хроматографические методы

Как уже упоминалось, хроматографические методы позволяют получить наиболее точный количественный результат, а также, при использовании масс-детекции, одновременно и количественно определить все имеющиеся модифицированные основания. Однако они требуют предварительного выделения и гидролиза клеточной ДНК. Кроме того, для получения корректного результата очень важную роль играет правильный подбор методики предварительного выделения и гидролиза ДНК. Основным источником погрешностей при выделении является искусственное окисление ДНК. Оно может приводить к возникновению расхождений при использовании одинакового метода для оценки одного и того же образца в разных лабораториях. При этом более низкий уровень 8-охо-dG нельзя считать более правильным, поскольку он может объясняться его дальнейшим окислением (так как 8-охо-dG легче окисляется, чем dG). Важно отметить, что для минимизации искусственного окисления необходима экстрак-

ция около 50 мкг ДНК. При более низких количествах влияние побочного окисления становится более значительным.

Во время выделения и подготовки для анализа, ДНК и ее основания подвергаются воздействию кислорода и ионов переходных металлов, вызывающих, например, побочное окисление в результате реакции Фентона. В ходе стадии дериватизации искусственно окисляется до 0.1% нормальных оснований, что достаточно для искажения получаемого результата.

Так, металлы потенциально могут катализировать свободнорадикальное повреждение и могут присутствовать в качестве примесей в реагентах и оборудовании, а также высвобождаются из клеток во время гомогенизации тканей перед выделением ДНК.

В некоторых методиках ДНК подвергается воздействию повышенных температур (кислотный гидролиз и дериватизация для ГХ-МС) и прооксидантов, таких как фенол. Фенол способен восстанавливать ионы металлов, которые далее могут вступать в реакцию Хабера-Вейсса/Фентона и генерировать гидроксил-радикалы, дополнительно окисляющие ДНК. В тканях достаточно железа (2–5 нмоль/мг белка), чтобы такая экстракция могла существенно повлиять на уровень окислительно-модифицированных оснований ДНК.

Ранее экстракцию ДНК было принято проводить в присутствии хлороформа и фенола, что приводило к завышению уровня окислительного повреждения ДНК. В настоящее время предложен и используется изопропанольный метод выделения ДНК, который сводит к минимуму побочное окисление [15]. Наряду с органическими растворителями, для диссоциации комплексов ДНК–белок можно использовать хаотропные агенты, например, йодид натрия. Использование последнего приводит к снижению уровня 8-охо-dG, но при этом отмечается, что йодид натрия может разрушать 8-охо-dG.

После выделения нуклеиновых кислот обычно требуется очистка ДНК от РНК, так как последняя присутствует в значительно больших количествах и может затруднять разделение и распознавание дезоксирибонуклеотидов и их модификаций при хроматографии.

Следующая предварительная стадия для хроматографических методов – гидролиз ДНК. В настоящее время чаще применяется ферментативный гидролиз, использующий комбинацию нуклеазы P1 и щелочной фосфатазы. Однако возможно использование и кислотного гидролиза.

Для определения 8-охо-dG наиболее часто используются высокоэффективная жидкостная обращено-фазовая хроматография с электрохимической и масс-спектрометрической детекцией, а также газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией.

Комбинация методов электрохимической детекции и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-ЭД) была разработана в 1986 году Флойдом с соавт. [16]. Метод использует тот факт, что окисленное пуриновое основание имеет более низкий окислительно-восстановительный потенциал, чем нормальные нуклеозиды. Электрохимический детектор может специфически окислять 8-охо-dG, и такое окисление высвобождает электроны, которые точно детектируются. Подавляющее большинство нуклеозидов не детектируется таким образом, так как они не окисляются при таком потенциале, что обеспечивает специфичность и чувствительность метода. Разброс значений для 8-охо-dG, измеряемых методом ВЭЖХ-ЭД, составляет 0.2–40 повреждений на миллион нуклеозидов. ВЭЖХ-ЭД позволяет определять 8-охо-dG в смеси нуклеотидов с точностью до 10^{-12} моль, что соответствует нижней границе диапазона его обычных концентраций в клетке [17, 18]. Система ВЭЖХ-ЭД также обычно оснащена УФ-детектором, с установленной длиной волны 260 нм, позволяющим детектировать и количественно оценивать неповрежденные нуклеозиды. Кроме того, возможно использование внутреннего стандарта для компенсации возможной потери чувствительности электрода из-за его загрязнения [19]. Существует несколько модификаций данного метода, различающихся процедурой предварительной очистки, режимом хроматографического разделения (градиентный, изократический) и количеством используемых колонок. Использование нескольких колонок позволяет отказаться от многоступенчатой предочистки и сократить погрешность анализа [20, 21].

Метод иммуноаффинной ВЭЖХ представляет собой комбинацию иммуноферментного анализа с ВЭЖХ-ЭД. Моноклональные антитела являются ионообменными центрами аффинной колонки, при этом проводится электрохимическая детекция [22]. Метод высокочувствителен и специфичен, но достаточно дорог и не имеет весомых преимуществ перед традиционной ВЭЖХ-ЭД.

Метод ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией позволяет одновременно с высокой чувствительностью определять широкий спектр модифицированных нуклеозидов. Однако он требует дорогостоящего оборудования и высокой степени очистки образцов.

Метод ГХ-МС для оценки окислительных повреждений ДНК был разработан в начале 1980-х годов. Вначале проводится кислотный гидролиз ДНК. Затем, поскольку методом газовой хроматографии анализируют летучие соединения, основания ДНК должны быть химически переведены в летучие производные с использованием триметилсилильной либо

трет-бутил-диметилсилильной группы. Для получения хорошей эффективности эта реакция должна быть проведена при 130°C. Метод газовой хроматографии совместно с масс-спектрометрией, обладая очень высокой чувствительностью, позволяет определить широкий спектр модифицированных оснований. Однако в ходе анализа нуклеотиды подвергаются воздействию высоких температур, переводу в газообразное состояние, что может привести к побочному окислению ДНК и завышению результатов. К тому же этот метод дорог и трудоемок, поэтому редко применяется в масштабных экспериментальных исследованиях.

Значения уровней 8-охо-dG, полученные с помощью ГХ-МС, были в два раза выше, чем при использовании ВЭЖХ-ЭД. Завышение уровня 8-охо-dG в образцах происходит из-за искусственного окисления ДНК в результате реакции силилирования при высокой температуре. Предварительная очистка 8-охо-dG с помощью ВЭЖХ или иммуноаффинной хроматографии перед стадией дериватизации предотвращает искусственное окисление. Но введение такой стадии для рутинного анализа делает метод неудобным.

Из новых вариантов хроматографического определения 8-охо-dG стоит отметить также метод ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. Авторами [23] этот метод был применен для определения 8-охо-dG в моче (а также плодных жидкостях беременных женщин) после твердофазной экстракции (разработанной теми же авторами) и зарекомендован как быстрый, высокочувствительный и высокоспецифичный, однако технологическая база методики все же слишком серьезна, чтоб предположить ее широкое использование.

Методы, использующие метки

Еще один способ детекции 8-охо-dG основан на использовании радиоактивных меток – например, ^{32}P . Метод заключается в ферментативном внедрении радиоактивного атома фосфора в повреждение ДНК. Полученный радиоактивный нуклеотид может быть детектирован после разделения, с использованием ВЭЖХ или ТСХ. Это самый чувствительный метод – определяет один аддукт на 10^{10} нуклеотидов и требует очень малых количеств ДНК (1–10 мкг). Однако при работе с радиоактивным излучением необходимо соблюдение соответствующих серьезных мер безопасности, поэтому этот метод применяется довольно редко [24].

Одним из новых является метод с использованием ковалентной метки биотина. В данном методе ДНК методом электростатической адсорбции «сажается» на наночастицы оксида олова и индия, повреждения ковалентно метят-

ся биотином, а в качестве репортера используется стрептовидин. Сигнал регистрируется с помощью фотоэлектрохимического датчика. Авторы [25] говорят о высокой чувствительности и скорости метода, однако на данный момент он интересен пока, скорее, с технологической точки зрения, чем с позиций массового практического применения [25].

Японские исследователи создали флуоресцентный зонд, избирательно связывающий 8-охо-dG и позволяющий быстро и эффективно детектировать его без предочистки проб, однако серийный выпуск подобных продуктов пока остается в будущем [26].

Таким образом, современные технологии предоставляют достаточно большой выбор методов детекции 8-охо-dG. Среди них есть как высокотехнологичные и дорогостоящие, подходящие для использования в исследованиях, требующих высокой точности и небольшой выборки, так и экспресс-методы, позволяющие быстро и приблизительно охарактеризовать сколь угодно большую выборку. Последние (ELISA) уже нашли свое применение в клинике. Однако для исследовательских целей наиболее часто используется достаточно точный, сравнительно недорогой и исторически первый метод ВЭЖХ с амперометрической детекцией.

Использование 8-охо-dG в качестве диагностического и прогностического биомаркера

К настоящему времени участие АФК показано в этиопатогенезе более чем 200 заболеваний и патологических состояний. При этом для разных заболеваний характерны однонаправленные изменения внутренней среды организма и функциональных свойств эндотелия кровеносных сосудов. Сходство этих изменений позволяет утверждать, что в их основе лежит один механизм – нарушение баланса наработки кислородных радикалов и их ингибирования антиоксидантами, хотя причины этого могут быть разными. Можно сказать, что устойчивое состояние окислительного повреждения ДНК у человека является «суррогатным маркером», предсказывающим (в некоторой степени) возможность развития какого-либо заболевания в будущем [27]. Так, в ядерной или митохондриальной ДНК преобладающей формой свободнорадикального повреждения является 8-оксо-2'-дезоксигуанозин.

При лечении какого-либо заболевания обычно определенная доза препарата предписывается для широкой группы пациентов с похожими симптомами. Однако развитие прогностического тестирования позволило бы заранее предсказать, каких пациентов можно лечить с помощью высокой дозы препарата, в то время как в других случаях может быть найден иной,

более успешный подход (изменение доз в зависимости от индивидуальных показателей организма).

Поиск диагностического и прогностического биомаркера для адаптации лечения конкретного человека и, что не менее важно, для лучшего понимания комплексного взаимодействия между разнообразными патогенетическими механизмами при развитии различных заболеваний является одной из важнейших задач в современной медицине.

Существует ряд причин, обосновывающих выбор 8-охо-dG в качестве такого биомаркера:

1. Так, он образуется с помощью нескольких форм АФК, таких как синглетный кислород и гидроксильный радикал

2. Установлено мутагенное действие 8-охо-dG, вызванное возможными трансверсиями GC→TA.

3. Наличие сложных механизмов, которые развились в процессе эволюции для удаления 8-охо-dG и для предотвращения его включения в ДНК, которое позволяет предположить, что клетка «воспринимает» его в качестве угрозы, которую нужно быстро устранять.

4. Доступность чувствительных методов для его детекции.

В начале 1960-х годов академиком Н.М. Эмануэлем была выдвинута гипотеза, согласно которой свободные радикалы играют ключевую роль в процессах злокачественного перерождения клеток и развитии опухоли. Хотя развитие опухоли представляет собой локальный процесс, однако он не может не оказывать влияния на активность окислительных процессов в других органах и тканях организма [30]. Изучение данного вопроса имеет важное диагностическое значение, так как позволяет применять для исследований наиболее доступный материал (кровь, сыворотка, моча). Так, именно 8-охо-dG пытаются использовать в качестве диагностического критерия успешности используемого метода лечения.

Например, целью современной радиотерапии является сочетание максимально эффективного подавления роста раковых клеток с минимально возможным негативным воздействием на здоровые ткани. Однако в настоящее время не существует теста для предсказания индивидуальной радиочувствительности пациента, который показал бы точную реакцию нормальной ткани. Таким образом, развитие предсказывающего тестирования позволило бы обрабатывать раковые ткани наиболее эффективной дозой облучения. Группой ученых из Швеции было проведено исследование, в ходе которого сравнивали остроту кожных реакций на облучение и экскрецию 8-охо-dG в моче. Выяснилось, что у пациентов, имеющих острую радиочувствительность, содержание 8-охо-dG в

моче выше, чем у тех, чей ответ на облучение был умеренным. То есть больным, имеющим высокое содержание 8-охо-dG, следует назначать меньшие дозы облучения, и наоборот. Даже до начала радиотерапии уровни 8-охо-dG в двух группах (с умеренной и острой радиочувствительностью) различались, что позволяет при использовании данного метода разделять таких пациентов до начала лечения. Значительная разница между уровнями 8-охо-dG наблюдалась в первые 6-7 дней терапии, что позволяет использовать 8-охо-dG в качестве критерия для корректировки проводимого курса лечения [28].

Польские ученые провели исследование, в ходе которого они пытались оценить возможность использования биомаркеров окислительного повреждения (8-охо-dG или 8-охо-Guo) в моче и в лейкоцитах (оба параметра отражают уровень окислительного повреждения ДНК всего организма) в качестве предикторов успеха лучевой терапии. В исследовании были проанализированы параметры, касающиеся окислительного повреждения ДНК через 24 часа после первой дозы облучения, и оценивали выживаемость у 99 пациентов в течение последующих 5 лет. Пациенты, имеющие в первые сутки после облучения повышение 8-охо-dG в моче на фоне стабильного его содержания в лейкоцитах крови, имели значительно большее время жизни (в течение 60 месяцев после лечения выживали 50% пациентов, у которых выполнялись два указанных критерия, по сравнению с 10% пациентов, у которых они не выполнялись). Полученный результат позволяет использовать данные параметры в качестве маркеров, предсказывающих успешность проводимой терапии [29].

Группа ученых из Испании провела исследование, в котором уровень окислительного стресса организма оценивали, используя окисленный/восстановленный глутатион, малоновый диальдегид (маркер окислительного повреждения липидов) и 8-охо-dG. Содержание всех этих биомаркеров определяли в тканях опухоли и в здоровых тканях пациентов, а 8-охо-dG еще и в периферийных моноядерных клетках крови и моче. Раковая ткань показала высокий уровень окислительного стресса, в ней перекисное окисление липидов и повреждение ДНК были значительно выше по сравнению со здоровой тканью. После удаления опухоли проводилось измерение содержания 8-охо-dG в крови и моче через 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев. После гастрэктомии (резекция желудка) высокий уровень 8-охо-dG в моче и в периферийных моноядерных клетках постепенно уменьшился до значений, близких таковым у здоровых доноров. Полученные данные также позволяют предложить 8-охо-dG в качестве биомаркера, с

помощью которого можно предсказывать успешность применяемой терапии [30].

В настоящее время накоплено большое количество данных, свидетельствующих о развитии окислительного стресса при психоневрологических расстройствах (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, инсульты, склерозы, неврозы) [31, 32]. Повышенная опасность возникновения окислительного стресса в клетках и тканях нервной системы определяется многими факторами, и прежде всего, высокой интенсивностью окислительного метаболизма. При относительной массе в 2%, мозг человека поглощает в среднем 20% поступающего при дыхании кислорода, 90% его энергетической потребности обеспечивается за счет аэробных процессов и только 10% – за счет анаэробного гликолиза. Кроме того, дополнительным фактором риска является высокое (более 50% сухого вещества мозга) содержание липидов – субстрата радикальных процессов перекисного окисления, при этом каждая третья жирная кислота в составе липидов мозга – ненасыщенная. Важны также участие свободных радикалов в нейрорегуляции, способность нейромедиаторов и нейрогормонов (адреналин, дофамин, норадреналин и др.) окисляться с образованием АФК, повышенное содержание связанных ионов железа, высвобождение которых может индуцировать свободнорадикальное окисление, особенно в присутствии аскорбата.

Группой японских ученых было проведено исследование, в ходе которого оценивался уровень окислительного повреждения ДНК и его связь с развитием болезни Паркинсона. Уровень 8-охо-dG оценивали как у пациентов, так и у здоровых доноров. Результаты исследования выявили корреляцию между уровнем экскретируемого в моче 8-ОН-dG и прогрессированием заболевания (уровень 8-охо-dG возрастал). Следовательно, 8-охо-dG можно использовать в качестве маркера, который показывает степень развития заболевания [33].

Повышение уровня 8-охо-dG в моче и в лейкоцитарной ДНК отмечалось также у пациентов с диабетом, при этом есть корреляция между уровнем окислительного повреждения ДНК и тяжестью диабетической нефропатии и ретинопатии [34]. Ряд работ свидетельствует о связи повышения уровня 8-охо-dG с обострениями аутоиммунных заболеваний [35–37], таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, болезнь Бехсета и анемия Фанкони, склеродермия.

Таким образом, приведенные выше данные показывают возможность использования 8-охо-dG не только в качестве биомаркера окислительного стресса, но и в качестве диагностического и прогностического биомаркера, для адаптации лечения конкретного человека.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: Mechanistic aspects and formation in cells // *J. Accounts Chem. Res.* 2008. V. 41. № 8. P. 1075–1083.
2. Verhagen H., Poulsen H.E., Loft S. Reduction of oxidative DNA-damage in humans by Brussels sprouts // *Carcinogenesis*. 1995. V. 16. P. 969–970.
3. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin // *Mutat. Res.* 1992. V. 275. P. 331–342.
4. Kasai H., Hayami H. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 2127–2136.
5. Inter-laboratory validation of procedures for measuring 8-oxo-7,8-dihydroguanine/8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA // *Free Radic. Res.* 2002. V. 36 (3). P. 239–245.
6. Rydberg B., Johanson K.J. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. New York: Academic Press, 1978. P. 465–468.
7. Hoelzl C., Bichler J., Ferk F., Simic T., Nersesyan A., Elbling L., Ehrlich V., Chakraborty A., Knasmüller S. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: A critical review with particular emphasis on human intervention studies // *J. Physiol. Pharmacol.* 2005. V. 56. № 2. P. 49–64.
8. Tomasello B., Grasso S., Malfa G., Stella S., Favetta M., Renis M. Double-face activity of resveratrol in voluntary runners: Assessment of DNA damage by comet assay // *J. Med. Food.* 2012. V. 15. № 5. P. 441–447.
9. Michel C., Vincent-Hubert F. Detection of 8-oxo-dG in *Dreissena polymorpha* gill cells exposed to model contaminants // *J. Mutat. Res.* 2012. V. 24. № 1-2. P. 1–6.
10. Javeri A., Lyons J.G., Huang X.X., Halliday G.M. Downregulation of Cockayne syndrome B protein reduces human 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 expression and repair of UV radiation-induced 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine // *J. Cancer Sci.* 2011. V. 102. № 9. P. 1651–1658.
11. Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., Stetina R. The comet assay: Topical issues // *Mutagenesis*. 2008. V. 23 (3). P. 143–151.
12. Rossner P. Jr., Sram R.J. Immunochemical detection of oxidatively damaged DNA // *J. Free Radic. Res.* 2012. V. 46. № 4. P. 492–522.
13. Garratt L.W., Mistry V., Singh R., Sandhu J.K., Sheil B., Cooke M.S., Sly P.D. Interpretation of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine is adversely affected by methodological inaccuracies when using a commercial ELISA // *J. Free Radic. Biol. Med.* 2010. V. 48. № 11. P. 1460–1464.
14. Kaneko K., Kimata T., Tsuji S., Ohashi A., Imai Y., Sudo H., Kitamura N. Measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in a novel point-of-care testing device to assess oxidative stress in children // *J. Clin. Chim. Acta.* 2012. V. 413. P. 23–24.
15. Helbock H.J., Beckman K.B. DNA oxidation matters: The HPLS-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 288–293.
16. Floyd R.A., West M.S., Eneff K.L. Conditions influencing yield and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidatively damaged DNA // *Anal. Biochem.* 1990. V. 188. P. 155–158.
17. Есипов Д.С., Сидоренко Е.В., Есипова О.В., Горбачева Т.А., Невредимова Т.С., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П. Определение отношения 8-оксо-2'-дезоксигуанозина к 2'-дезоксигуанозину в ДНК с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ в сочетании с амперометрической детекцией // *Вестник МИТХТ.* 2010. Т. 5. № 3. С. 69–74.
18. Есипов Д.С., Есипова О.В., Зиневич Т.В., Горбачева Т.А., Невредимова Т.С., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П. Анализ содержания 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в ДНК клеток мозга крыс при изучении защитного действия кортексина // *Вестник МИТХТ.* 2012. Т. 7. № 1. С. 59–63.
19. Jean-Luc R. Measuring oxidized DNA lesions as biomarkers of oxidative stress: An analytical challenge // *J. Pharm. Sci.* 2005. V. 30. P. 100–113.
20. Degan P., Bonassi S., De Caterina M. *In vivo* accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families // *Carcinogenesis*. 1995. V. 16. P. 735–742.
21. Haghdoost S. Biomarker of oxidative stress and their application for assessment of individual radio sensitivity. Stockholm: Stockholm University, 2005. 43 p.
22. Hwang E., Bowwen P.E. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: Its measurement and modulation by diet and environment // *Food Sci. Nutrition.* 2007. V. 47. P. 27–50.
23. Wu L.L., Chiou C.C., Chang P.U. Urinary 8-oxo-dG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics // *Clin. Chim. Acta.* 2004. V. 339. P. 1–9.
24. Lam P.M., Mistry V., Marczylo T.H., Konje J.C., Evans M.D., Cooke M.S. Rapid measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human biological matrices using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 15. № 52. P. 2057–2063.

25. Zhang B., Guo L.H., Greenberg M.M. Quantification of 8-oxo-dGuo lesions in double-stranded DNA using a photoelectrochemical DNA sensor // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 14. P. 6048–6053.
26. Taniguchi Y., Koga Y., Fukabori K., Kawaguchi R., Sasaki S. OFF-to-ON type fluorescent probe for the detection of 8-oxo-dG in DNA by the Adap-masked ODN probe // *Bioorg. Med. Chem.* 2012. V. 22. № 1. P. 543–546.
27. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
28. Hagdoost S., Svoboda P., Naslud I., Harms-Ringdahl M., Tilikides A., Skog S. Can 8-oxo-dG be used as a predictor for individual radiosensitivity? // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001 V. 50. № 2. P. 405–410.
29. Roszkowski K., Olinski R. Urinary 8-oxoguanine as a predictor of survival in patients undergoing radiotherapy // *J. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2012. V. 21. № 4. P. 629–634.
30. 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. Oxidative stress and DNA damage in human gastric carcinoma: 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxy-guanosine (8-oxo-dG) as a possible tumor marker // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 2. P. 3467–3486.
31. Dorszewska J., Florczak J., Rozycka A., Kempisty B., Jaroszevska-Kolecka J., Chojnacka K., Trzeciak W.H., Kozubski W. Oxidative DNA damage and level of thiols as related to polymorphisms of MTHFR, MTR, MTHFD1 in Alzheimer's and Parkinson's diseases // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 2007. V. 67. № 2. P. 113–129.
32. Choi D.H., Cristóvão A.C., Guhathakurta S., Lee J., Joh T.H., Beal M.F., Kim Y.S. NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease // *Antioxid. Redox. Signal.* 2012. V. 15/16. № 339. P. 1033–1045.
33. Sato S., Mizuno Y., Hattori N. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease // *J. Neurology.* 2005. V. 64. P. 1081–1083.
34. Wua L.L., Chioud C.-C., Change Pi-Yueh, Wua J.T. Urinary 8-OH-dG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics // *J. Clin. Chim. Acta.* 2004. V. 339. P. 1–9.
35. Bashir S., Harris G., Denman M.A. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases // *Ann. Rheum. Dis.* 1993. V. 2. P. 659–667.
36. Lisitsyna T.A., Durnev A.D. The effect of bemetil on the production of DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus // *Eksp. Klin. Farmakol.* 1999. V. 62. P. 38–41 (in Russ.).
37. Avouac J., Borderie D., Ekindjian O.G., Kahan A., Allanore Y. High DNA oxidative damage in systemic sclerosis // *J. Rheumatol.* 2010. V. 37. № 12. P. 2540–2547.

8-OXO-2'-DEOXYGUANOSINE – BIOMARKER OF THE OXIDATIVE STRESS

T.S. Nevredimova¹, N.V. Marmiy², D.S. Esipov², O.V. Esipova¹, V.I. Shvets¹

¹M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

²M.V. Lomonosov Moscow State University, faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia

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

Free radical mechanism of a cell damage is one of the universal non-specific pathogenic pathways in a cause of many diseases, including cancer, neurodegenerative diseases, atherosclerosis and aging. So in nuclear and mitochondrial DNA, guanine hydroxylation to 8-position gives 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG). These substances are one of the predominant products of free radical-induced oxidative damages. They are usually been applied as biomarkers of oxidative stress and carcinogenesis. The direct oxidation of guanine or incorrect inclusion of 8-oxo-dGTP from the nucleotide pool by polymerases, lead to a lack of specificity of the base pairing in DNA, favoring mutagenesis. Firstly 8-oxo-dG has been described by H. Kasai and S. Nishimura in 1983. Since then, this damage has been widely measured in various tissues and body fluids as blood, urine, brain, liver, and others. Today 8-oxo-dG is already used not only as a marker of oxidative stress, but also as a tool for prognosis of diseases and results of applied therapy. Now many efforts are focused on developing the procedure of measurement of 8-oxo-dG content in tissues and body fluids. In this paper we also discuss the role of the 8-oxo-dG as a biomarker of oxidative stress and a predictor of diseases and results of the applied therapy.

Keywords: 8-oxo-2'-deoxyguanosine, oxidative stress, biomarker of oxidative stress.