

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОШЕНИЯ 8-ОКСО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНА К 2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНУ В ДНК С ПОМОЩЬЮ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ В СОЧЕТАНИИ С АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

*Д.С. Есипов, доцент, *Е.В. Сидоренко, младший научный сотрудник,
О.В. Есипова, доцент, Т.А. Горбачева, магистр, Т.С. Невредимова, студентка,

*А.Л. Крушинский, старший научный сотрудник,

*В.С. Кузенков, инженер, **В.П. Реутов, ведущий научный сотрудник
кафедры Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

* Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

e-mail: esipov@mail.bio.msu.ru

В работе проведена оптимизация метода определения отношения 8-оксо-2'-дезоксигуанозина, образующегося в ДНК в результате действия активных форм кислорода, к 2'-дезоксигуанозину методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в сочетании с амперометрической детекцией. Показано увеличение этого отношения при окислительном стрессе, вызванном действием больших доз аскорбиновой кислоты, в образцах ДНК, выделенных из печени экспериментальных крыс.

The article presents an optimized method for the determination of the ratio of 8-oxo-2'-deoxyguanosine (formed in DNA due to the action of active forms of oxygen) to 2'-deoxyguanosine. The ratio was determined by reverse phase HPLC combined with amperometric detection. It was shown that the ratio increases upon oxidative stress caused by the action of large doses of ascorbic acid in samples of DNA isolated from the liver of experimental rats.

Ключевые слова: 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, окислительный стресс, аскорбиновая кислота, обращенно-фазовая ВЭЖХ, амперометрическая детекция.

Key words: 8-oxo-2'-deoxyguanosine, oxidative stress, ascorbic acid, reverse phase HPLC, amperometric detection.

Введение

Одним из следствий окислительного стресса на молекулярном уровне является окислительное повреждение нуклеиновых кислот, вызванное действием активных форм кислорода. Среди многих окислительных повреждений ДНК одним из наиболее исследованных соединений является 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин) (8-оксо-dG), что обусловлено, с одной стороны, высокой чувствительностью его измерений, а с другой – его мутагенностью [1]. Поэтому 8-оксо-dG может рассматриваться как биомаркер окислительного стресса. Предложено несколько методов, позволяющих точно измерять уровни 8-оксо-dG в ДНК: иммуноферментный метод, аффинная хроматография, хроматография в сочетании с масс-спектрометрией [2]. Однако большинство из них требует сложного и высокоточного оборудования и/или дорогих реактивов, недоступных многим лабораториям. Поэтому основной задачей данной работы была оптимизация метода определения 8-оксо-dG в условиях среднестатистической лаборатории.

Одним из методов измерения уровня 8-оксо-dG является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с электрохимической (амперометрической) детекцией (ЭХД). ВЭЖХ-ЭХД позволяет определять 8-оксо-dG в смеси нуклеотидов с точностью 10^{-12}

моль, что является особенно актуальным, так как его концентрация обычно составляет $10^{-9} \div 10^{-12}$ моль на 30–50 мкг клеточной ДНК [3]. Поскольку количество 8-оксо-dG в ДНК примерно на 5 порядков ниже количества 2'-дезоксигуанозина (dG), его трудно различить в гидролизате нуклеиновых кислот с помощью УФ-детектора, тогда как использование высокочувствительной электрохимической детекции дает возможность определять количество 8-оксо-dG в пробе ДНК с достаточной точностью.

В данной работе описан простой в исполнении метод определения отношения 8-оксо-dG к dG в ДНК с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) в сочетании с амперометрической детекцией, который может быть использован в исследованиях, связанных с окислительным стрессом.

Результаты и их обсуждение

Амперометрическое детектирование является сравнительно новым методом, применяющимся в аналитической хроматографии. Последние разработки российских производителей хроматографического оборудования по чувствительности сравнимы с приборами, производимыми зарубежными фирмами. Для количественного анализа 8-оксо-dG в биологическом материале нами был выбран амперометрический детектор фирмы «Химавтоматика» (Россия). Принцип действия этого детектора заключается

в измерении силы электрического тока в ячейке, возникающего при окислении (восстановлении) анализируемого вещества на поверхности рабочего электрода при подаче на него потенциала определенного значения [4]. Стоимость отечественного прибора на порядок ниже стоимости зарубежных аналогов. Важным достоинством отечественной разработки также является возможность выбора различных режимов детектирования, например, импульсного или постоянного или их комбинации. Это позволяет осуществлять очистку рабочего электрода непосредственно во время проведения анализа, либо в ходе промывки колонки. Кроме того, есть возможность выбирать различные температурные параметры анализа, что является еще одним достоинством российского прибора, поскольку чувствительность амперометрического детектора существенно зависит от температуры, при которой про-

исходит детектирование. Однако из-за сравнительно недавнего появления такого детектора на нашем рынке данные о его использовании для проведения биохимических анализов весьма ограничены [5–7]. Нам необходимо было убедиться в достаточной чувствительности выбранного амперометрического детектора к 8-охо-dG и, фактически, разработать методику проведения исследований с помощью такого оборудования.

Свидетель (8-охо-dG) для калибровки детектора синтезировали из 2'-дезоксигуанозина (dG) в присутствии 20 мМ ЭДТА, 20 мМ аскорбиновой кислоты и 2 мМ FeSO₄ при 37°C, пропуская кислород воздуха через раствор в течение 3 ч (рис. 1) [8]. Выделение и очистку 8-охо-dG проводили с помощью полупрепаративной ОФ ВЭЖХ. Структуру полученного соединения подтверждали данными УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии (рис. 2А, Б).

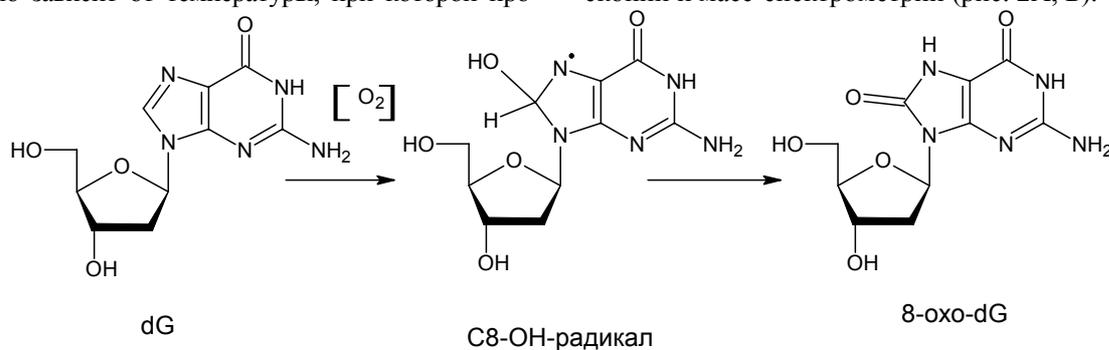


Рис. 1. Схема синтеза 8-охо-dG.

Учитывая данные литературы [9–11], нами были оптимизированы условия хроматографического анализа 8-охо-dG с помощью ОФ ВЭЖХ с использованием электрохимической детекции на колонке Диасфер-110-С18 (4.0×250 мм). Был выбран изократический режим

элюирования 6% ацетонитрилом в присутствии 0.1 М ацетата аммония (рН 7.5); время выхода dG и 8-охо-dG составило 6.8 и 7.5 мин соответственно. Таким образом, эти условия обеспечивают хорошее разделение нуклеозидов при минимальных затратах времени.

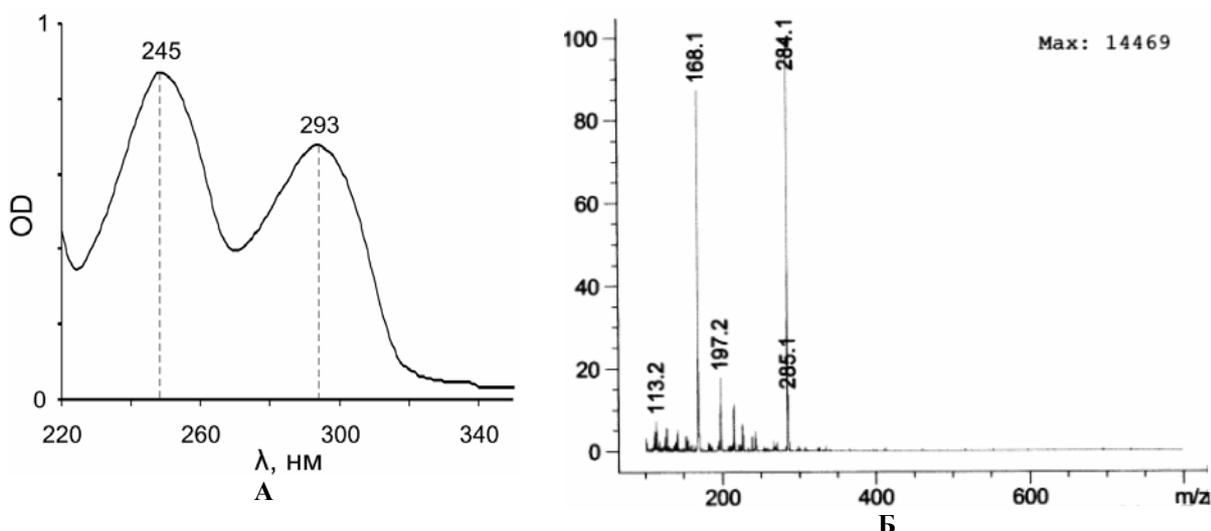


Рис. 2. УФ-спектр (А) и ESI-масс-спектр (Б) 8-охо-dG.

В данных условиях был установлен нижний предел обнаружения 8-охо-dG на амперометрическом детекторе, который составил 0.5 пмоль (0.142 нг) при постоянном напряжении на

электроде +0.4 В при соотношении шум/сигнал 1:5. Принимая во внимание, что обычно соотношение 8-охо-dG : dG в ДНК составляет примерно 1:10⁵, для достоверного анализа

уровня 8-охо-dG в смеси нуклеозидов минимальное количество гидролизующей ДНК должно составлять не менее 2 о.е.

Калибровку метода проводили, используя по четыре образца dG и 8-охо-dG с различными концентрациями (см. Эксп. часть). По результатам калибровки получены градуировочные зависимости концентраций от площади пиков. Для dG (УФ-детекция): $Q = 2.00217 \times 10^{-3} \times A$ (где A – площадь пика, мВ×сек); среднеквадратичное отклонение 2.996%; коэффициент корреляции 0.998. Для 8-охо-dG (амперометрическая детекция): $Q = 0.20075 \times V$ (где V – площадь пика, нА×сек); коэффициент корреляции 0.994.

Нами было установлено, что через некоторое время работы с электрохимическим детектором чувствительность амперометрической ячейки падает. По-видимому, это проис-

ходит из-за отравления поверхности рабочего электрода продуктами электролиза, вследствие чего полученные результаты необходимо корректировать. Чтобы решить эту проблему, мы применили внутренний стандарт, в качестве которого был использован глутатион. 0.75 мг глутатиона детектировали с помощью электрохимического детектора в подобранных ранее условиях. Время удерживания глутатиона составляет 12.4 мин, его пик полностью отделяется от пика 8-охо-dG (рис. 3); глутатион не определяется УФ-детектором в выбранных условиях, т.е. не влияет на УФ-детекцию нуклеозидов. При анализе одного и того же количества внутреннего стандарта изменение площади пика глутатиона свидетельствует об изменении чувствительности детектора. В этом случае необходимо провести регенерацию рабочего электрода.

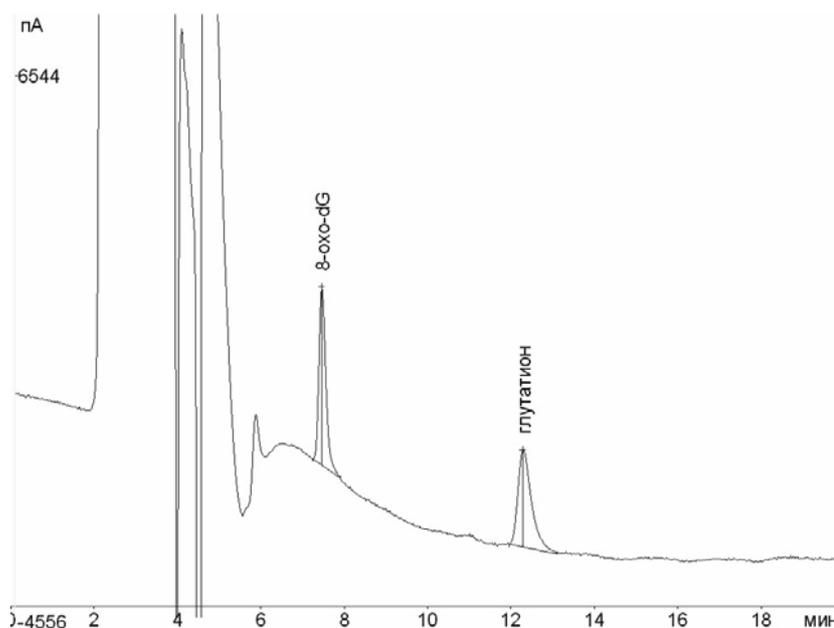


Рис. 3. Хроматограмма ОФ ВЭЖХ смеси 8-охо-dG и глутатиона. Колонка Диасфер-110-C18 (4.0×250 мм), подвижная фаза ацетонитрил – 0.1 М ацетат аммония (рН 7.5), 6 : 94, скорость потока 0.8 мл/мин. Амперометрическая детекция, постоянное напряжение на электроде +0.4 В.

Для подтверждения возможности использования разработанного нами метода определения 8-охо-dG как биомаркера окислительного стресса в диагностике, мы провели серию экспериментов по определению отношения 8-охо-dG/dG в ДНК печени крыс, подверженных окислительному стрессу, вызванному большими дозами аскорбиновой кислоты. Общеизвестно, что аскорбиновая кислота является наиболее важным антиоксидантом плазмы крови. В то же время известно, что в избытке аскорбиновая кислота становится мощным прооксидантом [12]. Она переводит ионы Fe^{3+} в восстановленное состояние и, тем самым, индуцирует разложение органических перекисей.

В эксперименте использовали крыс-самцов в возрасте 4.5 мес линии Крушинского-

Молодкиной. Данная модель оказалась удобной для исследования условий и факторов, оказывающих влияние на аудиогенные судорожные припадки и стрессорные повреждения (нарушения движений, смертность и внутричерепные кровоизлияния), возникающие у животных в условиях акустического стресса. Преимущество проведения экспериментов на генетической линии животных, предрасположенных к геморрагическим инсультам, состояло в том, что эта модель не связана с фототромбированием, электрокоагуляцией или перевязкой артерий и наиболее адекватна к реальным моделям геморрагических инсультов. Крысы были разделены на две группы: контрольную (6 особей) и экспериментальную (6 особей). Последним вводили аскорбиновую кислоту в дозе 20 мг/100 г массы тела за 1 ч до про-

ведения акустического воздействия, вызывающего развитие геморрагического инсульта. Контрольным животным в это время же вводили физиологический раствор. Определение уровня 8-охо-dG в гидролизате нуклеиновых кислот осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ с применением амперометрической детекции.

После проведенной серии анализов результаты показали, что при внутрибрюшинном введении крысам аскорбиновой кислоты отношение 8-охо-dG/dG в ДНК печени достоверно

повышено по сравнению с контролем (рис. 4, табл. 1), т.е. аскорбиновая кислота в «ударных» дозах проявляет прооксидантные свойства и является причиной окислительного стресса, в результате которого происходит повышение уровня 8-охо-dG в ДНК. Таким образом, 8-охо-dG может быть использован как биохимический маркер окислительного повреждения ДНК, вызванного различными эндогенными факторами, а предложенный метод является перспективным для клинического применения.

Таблица 1. Результаты исследования влияния аскорбиновой кислоты (20 мг/100 г массы тела) на отношение 8-охо-dG/dG в ДНК печени крыс.

Группа животных	№ образца	S(8-охо-dG), нА×сек	Количество 8-охо-dG, пмоль	S(dG), мВ×сек	Количество dG, нмоль	(8-охо-dG/dG)×10 ⁵	Среднее значение (8-охо-dG/dG)×10 ⁵	Стандартное отклонение	Доверительный интервал
Контроль	1	8.902	1.79	6600.48	13.31	13.43	13.07	0.57	0.38
	2	9.952	2.00	7422.02	14.97	13.36			
	3	5.897	1.18	4382.85	8.84	13.40			
	4	8.677	1.74	6395.13	12.90	13.51			
	5	9.204	1.85	7275.65	14.67	12.60			
	6	9.849	1.98	8084.11	16.30	12.13			
«Аскорбиновая кислота»	1	10.397	2.09	7008.18	14.13	14.78	14.79	0.31	0.21
	2	12.618	2.53	8335.46	16.81	15.08			
	3	7.159	1.44	4753.61	9.59	15.00			
	4	12.944	2.60	8578.63	17.30	15.03			
	5	8.498	1.71	5833.09	11.76	14.51			
	6	10.075	2.02	7007.22	14.13	14.32			

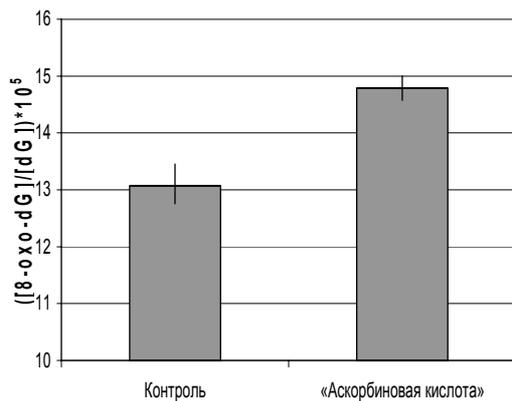


Рис. 4. Отношение 8-охо-dG/dG в ДНК печени крыс, подвергнутых окислительному стрессу «ударными» дозами аскорбиновой кислоты, и контрольной группы животных.

Экспериментальная часть

ESI-масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре «Agilent» (США) серии 6100, УФ-спектры – на спектрофотометре «Uniscan β»

(Великобритания).

Синтез 8-охо-dG

В колбе на 500 мл смешали 267.0 мг 2'-дезоксигуанозина (Serva, США), 126 мг FeSO₄·7H₂O (Реахим, Россия), 45.4 мл 0.1 М аскорбиновой кислоты (Люми, Россия), 9.0 мл 0.5 М ЭДТА (Fluka Chemika, Швейцария) и довели объем раствора дистиллированной водой до 230 мл. Поместили на водяную баню. Через реакционную смесь пропускали кислород воздуха в течение 3 ч, поддерживая температуру 37°C. Контроль реакции осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ. Через 3 ч добавили 6.7 мл 1 н. HCl (Реахим, Россия) до pH 3.0. В колбу добавили 2.5 г активированного угля и встряхивали 30 мин. Фильтровали раствор от угля на стеклянном фильтре, промыли 10 мл воды (фракция № 1) и 10 мл смеси ацетон–вода, 1 : 1 (фракция № 2).

Ацетоновую фракцию, предварительно упаренную досуха, перерастворили в 2 мл воды, отфильтровали через фильтр (RAININ, Nylon-66 Filters, 0.45 мкм, Ø 13 мм). Выделение 8-охо-dG из реакционной массы проводили с помощью

полупрепаративной ОФ ВЭЖХ на колонке ZORBAX ODS (9.4×250 мм) в воде с градиентом концентрации метанола 0–10% за 30 мин. Выход 8-охо-dG: 6.5 мг (2.3%). УФ-спектр (λ_{max} , нм, H₂O): 245, 293. Масс-спектр, ESI (m/z): 284.1 [$M + H^+$].

Проведение ОФ ВЭЖХ в сочетании с амперометрической детекцией

ВЭЖХ проводили на хроматографе «Beckman-Gold» (Beckman coulter, США), оснащенном насосом модели 126, инжектором «Beckman» с объемом петли 250 мкл, УФ-детектором модели 166 с переменной длиной волны, электрохимическим детектором фирмы «Химавтоматика» (Россия). Использовали колонку Диасфер-110-С18 (4.0×250 мм) фирмы «Биохиммак» (Россия), подвижная фаза ацетонитрил – 0.1 М ацетат аммония (pH 7.5), 6 : 94, скорость потока 0.8 мл/мин. Детекцию осуществляли на УФ-детекторе при 254 нм и на амперометрическом детекторе при постоянном напряжении на электроде +0.4 В. Запись хроматограмм проводили с помощью программы «Мультихром» (Ampersand Ltd. версия 1,52и, Россия) для УФ-детектора и Z-lab (Zхром, Россия) для амперометрического детектора. Статистические расчеты проводили с помощью программы Excel (Microsoft).

Калибровку метода проводили, используя водные растворы dG с концентрацией 564.0 мкМ и 8-охо-dG с концентрацией 38.4 нМ и растворы, полученные последовательным разбавлением исходных растворов в 2, 4 и 8 раз. По результатам обработки полученных хроматограмм была проведена градуировка метода с помощью программного обеспечения, применявшегося для записи хроматограмм, а также с помощью программы Excel (Microsoft).

Проведение ОФ ВЭЖХ с использованием внутреннего стандарта

Для ОФ ВЭЖХ использовали 50 мкл смеси, содержащей 50 мкл раствора 8-охо-dG (0.00105 о.е./мл, 10.5×10^{-5} мМ) и 50 мкл раствора глутатиона (Reanal, Польша) с концентрацией 15 мг/мл. Проводили разделение в системе ацетонитрил (Лекбиофарм, Россия) – 0.1 М ацетат аммония (Amresco, США) (pH 7.5), 6 : 94.

Биологические материалы

В экспериментах использовали 12 крыс-самцов линии Крушинского-Молодкиной (КМ) в возрасте 4.5 мес массой 260 ± 40 г. Стандартизацию животных осуществляли в результате отбора крыс линии КМ по возрасту, массе тела, полу. Крысы содержались в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, с естественной сменой дня и ночи, при 20°C, по 6-7 животных в клетке. Животные были разделены на 2 группы по 6 животных в каждой. Моделирование нарушений мозгового крово-

обращения геморрагического типа проводили по стандартной схеме. Животное помещали в камеру и подвергали действию акустического раздражителя по следующей схеме:

- Звуковое раздражение начинали с 1.5-минутного непрерывного воздействия сильного электрического звонка (110-115 дБ);
- Затем в течение 15 мин следовала серия чередующихся сильных и слабых (80-90 дБ) звуковых сигналов длительностью 10 секунд с 10-ти-секундными интервалами между ними;
- Далее следовал 3-х-минутный перерыв, в течение которого звонок в экспериментальной камере был выключен;
- После 3-х-минутного перерыва в камере снова включали звонок, который непрерывно давал в течение одной минуты сильный звуковой сигнал (110-115 дБ).

Опытным животным вводили внутривенно аскорбиновую кислоту в дозе 20 мг/100 г массы тела за 1 ч до проведения акустического воздействия. Контрольным животным в это же время вводили физиологический раствор. В экспериментах по выделению ДНК использовали печень крыс.

Выделение ДНК из печени крыс

Образец печени крыс (~100 мг) гомогенизировали в 250 мкл буфера (pH 8.0), содержащего 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl (Reanal, Польша), 10 мМ ЭДТА. После гомогенизации к 250 мкл гомогената печени добавляли 12.5 мкл 20% додецилсульфата натрия (Reanal, Польша) и 3.0 мкл раствора протеиназы К (Sigma, США) (10 мг/мл) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Образец перемешивали на аппарате «Vortex», а затем помещали на водяную баню на 3 ч при 50°C. После инкубации добавляли 68 мкл 5 М LiClO₄ и 25 мкл 3 М ацетата натрия и перемешивали. К раствору добавляли 400 мкл смеси хлороформ – изоамиловый спирт, 24 : 1, и центрифугировали при 8000 г и 4°C в течение 10 мин, отбирали супернатант. Данную процедуру проводили 3 раза. Водную фазу переносили в центрифужную пробирку объемом 2 мл и прибавляли 1.5 мл холодного 96% этанола, перемешивали переверачиванием. Образец выдерживали ночь при –20°C и центрифугировали при 10000 г и 4°C в течение 10 мин. Осадок дважды промывали 75% этанолом и высушивали в эксикаторе под вакуумом водоструйного насоса. Повторно растворяли в 200 мкл дистиллированной воды. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли с помощью УФ-спектроскопии. Выход ДНК составил ~10 о.е./100 мг печени.

Гидролиз нуклеиновых кислот

Лиофилизированные нуклеиновые кислоты (~4 о.е.) растворяли в 100 мкл дистиллированной воды и добавляли 60 мкл буфера,

содержащего 20 мкл 10 мМ (AsO)₂Zn и 40 мкл 0.1 М AsONa. Прогревали раствор 3 мин при 95°C. Быстро охлаждали, добавляли 5 ед. акт. нуклеазы PI (USBiological, США) и инкубировали при 50°C в течение 2 ч. Затем добавляли 1 ед. акт. термолabileйной щелочной фосфатазы (Хеликон, Россия) в 20 мкл 1 М Трис-HCl (pH 8.6) и инкубировали при 37°C в

течение 1 ч. Прогревали 3 мин при 90°C и центрифугировали 5 мин при 10000 g.

Гидролизаты нуклеиновых кислот, выделенных из печени экспериментальных животных, (объем образца 50 мкл) анализировали с помощью ОФ ВЭЖХ в сочетании с амперометрической детекцией по вышеприведенной методике.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Cooke, M. S. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease / M. S. Cooke, M. D. Evans // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17. – P. 1195–1214.
2. Hwang, E. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment / E. Hwang, P. E. Bowen // *Food Science & Nutrition.* – 2007. – Vol. 47. – P. 27–50.
3. Haghdoost, S. Biomarker of oxidative stress and their application for assessment of individual radio sensitivity / S. Haghdoost. – Stockholm : Stockholm University, 2005. – 43 p.
4. Яшин, А. Я. Аналитические возможности жидкостного хроматографа «ЦветЯуза» с электрохимическими детекторами / А. Я. Яшин, Я. И. Яшин // *Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева).* – 2002. – Т. XLVI, № 4. – С. 109–115.
5. Савин, П. В. Исследование антиоксидантных свойств желейного мармелада / П. Н. Саввин, В. М. Болотов // *Химия раст. сырья.* – 2008. – № 4. – С. 177–179.
6. Комплексная оценка состояния системы про-/антиоксиданты в различных биологических средах у хирургических больных с гнойно-септическими осложнениями / И. И. Павлюченко [и др.] // *Успехи соврем. естествознания.* – 2006. – № 6. – С. 82–83.
7. Сравнительная антиоксидантная емкость некоторых отечественных и импортных чайных напитков / И. М. Быков [и др.] // *Успехи соврем. естествознания.* – 2005. – № 10. – С. 40–41.
8. Cheng, K. C. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, cause G→T and A→C substitutions / K. C. Cheng, D. S. Cahill // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267, № 1. – P. 166–172.
9. Takagi, A. Inhibitory effects of vitamin E and acid on 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane / A. Takagi, K. Sai, T. Umemura // *Cancer Lett.* – 1995. – Vol. 91. – P. 139–144.
10. Huang, X. Importance of complete DNA digestion in minimizing variability of 8-oxo-dG analyses / X. Huang, J. Powell // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2001. – Vol. 31. – P. 1341–1351.
11. Phenolic extraction of DNA from mammalian tissues and conversion to deoxyribo-nucleoside-5'-monophosphates devoid of ribonucleotides / O. Shimelis [et al.] // *J. Chromatography.* – 2004. – Vol. 1053. – P. 143–149.
12. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков, И. А. Бондарь. – М. : Слово, 2006. – 556 с.