

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Мармий Наталья Владимировна

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ
8-ОКСО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНА**

03.03.05 – биология развития

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2017

Работа выполнена на кафедре биоорганической химии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель — *Есипов Дмитрий Станиславович, кандидат химических наук, доцент*

Официальные оппоненты — *Позмогова Галина Евгеньевна, доктор химических наук, профессор, руководитель лаборатории искусственного антителогенеза ФНКЦ физико-химической медицины*
Гудков Сергей Владимирович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Института общей физики РАН
Доронин Юрий Константинович, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «20» февраля 2018 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.09 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М1.

E-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/92392590/>.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Е.Н. Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы¹

8-Оксо-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG) – продукт окисления 2'-дезоксигуанозина активными формами кислорода (АФК), перекисями липидов и некоторыми другими окислителями. Это вещество обнаружено в клетках животных (и человека), растений, грибов и бактерий. Благодаря свободнорадикальному механизму образования, 8-охо-dG уже более десятилетия используется в качестве биомаркера окислительного стресса и старения, в том числе – в клинической практике в США, Японии и ЕС [Shigenaga et al., 1989]. Содержание данного соединения в ДНК варьирует и определяется, с одной стороны, количеством свободных радикалов в клетке, а с другой – эффективностью работы ферментов репарации, удаляющих окисленный гуанин из ДНК. Таким образом, 8-охо-dG в ДНК является биомаркером текущего окислительного статуса и отражает не только содержание АФК в клетке, но и эффективность репарации ДНК. По мере старения тканей, органов и клеток, содержание 8-охо-dG в их ДНК возрастают [Mecocci et al., 1999].

Долгое время вопрос собственной биологической активности 8-охо-dG практически не рассматривался. При этом окисленный гуанин образуется с гораздо большей вероятностью, чем другие окисленные нуклеозиды. Во-первых, из-за низкого потенциала окисления гуанин не только окисляется АФК быстрее всех остальных азотистых оснований, но и принимает гидроксильные группы от перекисей липидов и окисленного тимина. Во-вторых, гуанин в клетке присутствует в больших количествах, в составе не только ДНК и РНК, но и нуклеотидного пула, в частности, ГТФ. Таким образом, окисление гуанина, по крайней мере, в цитоплазме почти неизбежно сопровождается любой, даже локальный и незначительный, окислительный стресс. Кроме этого, существует большая группа потенциальных рецепторов этого соединения. Показано, что ряд малых ГТФ-аз (Rac, Ras, Rho) ингибируются производными окисленного гуанина [Hajas G. et al., 2013]. Эти белки играют огромную роль в регуляции клеточной пролиферации и развития организма в целом. Они «управляют» перестройками

¹ Используемые сокращения: 8-Br-dG – 8-бromo-2'-дезоксигуанозин, 8-охо-dG – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, 8-охо-rG – 8-оксогуанозин, dG – 2'-дезоксигуанозин, LC-MS – жидкостная хроматография с масс-спектрометрией, Rac 1– ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Ras – малые ГТФ-азы, кодируемые генами семейства *ras* (сокращение от *rat sarcoma protein*), Rho – Ras Homolog, одно из семейств малых ГТФаз, АФК – активные формы кислорода, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ГТФ – гуанозинтрифосфат.

цитоскелета, клеточным движением и секрецией, делением и ростом клетки. Многие малые ГТФ-азы рассматриваются в качестве потенциальных онкобелков из-за участия в метастазировании и способности увеличивать пролиферативный потенциал клетки, подавляя апоптоз.

Зарубежные исследователи в последнее десятилетие показали противовоспалительную и противоаллергическую активность экзогенного 8-охо-dG [Kim D.H. et al., 2006]. Все это позволило нам предположить, что 8-охо-dG может оказаться сигналом, запускающим адаптивный ответ клетки на окислительный стресс. В частности, он может выступать опосредованным активатором репарации ДНК и синтеза белков неспецифического стресса, а также ингибитором реакций, генерирующих АФК. Изучение характера действия 8-охо-dG на клетки может помочь расшифровке механизмов клеточной сигнализации в условиях стресса.

Поскольку АФК, как становится ясным в последнее время, играют важную роль в жизнедеятельности клетки, 8-охо-dG может оказаться одним из значимых регуляторов онтогенеза. Особую роль он может играть в восприятии клеткой механических и химических сигналов от внешней среды, без которого невозможен нормальный морфогенез, в регуляции апоптоза и некробиотического метаморфоза, а также – диапаузы у организмов, склонных таким образом переживать периоды неблагоприятных условий среды. Кроме того, малые ГТФ-азы являются важнейшими белками, управляющими клеточной миграцией, движением эмбриональных слоев и любыми формами организованного клеточного и тканевого движения в целом. Роль их в развитии организмов всех систематических групп огромна, и 8-охо-dG за счет взаимодействия с малыми ГТФ-азами может оказывать значимое регуляторное воздействие на соответствующих этапах онтогенеза.

Цель работы: Изучение биологической роли 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в онтогенезе (развитии и старении) организмов различных систематических групп.

Задачи работы

1. Синтезировать 8-охо-dG в количестве, достаточном для проведения биологических экспериментов.
2. Исследовать влияние экзогенного 8-охо-dG на жизнедеятельность и метаболизм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Исследовать влияние экзогенного 8-охо-dG на развитие, жизнедеятельность, метаболизм и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* в норме и в условиях теплового шока.

4. Исследовать влияние экзогенного 8-охо-dG на жизнедеятельность и метаболизм культуры клеток млекопитающего.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экзогенный 8-охо-2'-дезоксигуанозин не влияет на скорость роста непересеваемой суспензионной культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Содержание эндогенного 8-охо-dG в ДНК дрожжей нелинейно возрастает по мере роста и «старения» культуры.

3. Экзогенный 8-охо-dG (внесенный в культуральную среду) уменьшает накопление окисленного гуанинового основания в ДНК дрожжей. При добавлении экзогенного 8-охо-dG к достигшей стационарной фазы роста культуре этот эффект более выражен, нежели при его внесении в момент посева.

4. Экзогенный 8-охо-dG оказывает выраженное протекторное действие на подвергнутых тепловому шоку личинок *Drosophila melanogaster*. Этот эффект проявляется окисленным нуклеозидом в диапазоне концентраций от 1 нМ до 1 мкМ и, вероятно, обусловлен сигнальным механизмом.

5. Экзогенный 8-охо-dG оказывает выраженное протекторное действие на имаго *Drosophila melanogaster* в условиях теплового шока. Под его влиянием увеличивается выживаемость *Drosophila melanogaster* и уменьшается содержание 8-охо-dG в ДНК подвергнутых тепловому стрессу мух.

6. Экзогенный 8-охо-dG не проявляет геропротекторных и геропроторных эффектов на *Drosophila melanogaster*.

7. Экзогенный 8-охо-dG (в отличие от dG) снижает содержание окисленного гуанинового основания в ДНК и высокомолекулярной РНК «старых» клеток китайского хомячка. Этот эффект не проявляется на «молодых» клетках той же линии. На уровень окисленных рибонуклеозидов пула экзогенный 8-охо-dG влияния не оказывает.

Научная новизна

Выдвинуто и обосновано предположение о том, что действие экзогенного 8-охо-dG является протекторным и антистрессовым для любых аэробных организмов. Впервые охарактеризовано изменение отношения 8-охо-dG/dG в ДНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при их длительном культивировании. Впервые выявлен

выраженный и достоверный протекторный эффект экзогенного 8-охо-dG на модели теплового шока *Drosophila melanogaster*. Впервые описано отсутствие зависимости протекторного эффекта 8-охо-dG от его концентрации в диапазоне 1 нМ – 1 мкМ. Впервые показано отсутствие геропротекторных и геропроторных эффектов экзогенного 8-охо-dG на *Drosophila melanogaster*.

Впервые показано снижение отношения 8-охо-dG/dG в клеточной ДНК под действием экзогенного 8-охо-dG. Впервые обнаружена специфичность воздействия 8-охо-dG в отношении «старых» и не делящихся клеток.

Практическая ценность

Полученные результаты открывают перспективы использования 8-охо-dG в качестве лекарственного средства, в частности, для сокращения возможных травматических эффектов оперативных вмешательств, наркоза, радио- и химиотерапии и иных прогнозируемых стрессирующих воздействий. Способность 8-охо-dG индуцировать репарацию ДНК «старых» клеток при отсутствии действия на «молодые» может быть полезной при разработке геронтологических препаратов.

В фундаментальном аспекте обнаруженные эффекты могут оказаться значимыми для понимания механизмов внутриклеточной регуляции в условиях стресса.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были доложены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), Международной конференции Biomedical Innovations for Healthy Longevity / Биомедицинские инновации для здорового долголетия (Санкт-Петербург, 2016), XXI Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2016), XVI International Scientific Conference «High-Tech in Chemical Engineering – 2016» with elements of school of young scientists (Москва, 2016), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017» (Москва, 2017), научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА (Москва, 2017), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2017).

Публикации

По материалам работы опубликовано 15 печатных работ, из них: 4 – статьи, опубликованные в журналах из перечня рекомендованных для защиты в диссертационных советах МГУ, 3 – статьи, опубликованные в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 1 – статья в сборнике, 6 – тезисы докладов международных конференций.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 147 страницах, содержит 6 таблиц и 30 рисунков, и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждения, выводы, список литературы, приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Синтез 8-охо-dG выполнялся по разработанной нами методике [Мармий Н.В., Есипов Д.С., 2017] и включал стадии бромирования, каталитического ацилирования в смеси пиридина и диметилформаида и гидролиза ацильных групп.

Бесфенольное выделение, очистка и гидролиз ДНК выполнялись по ранее разработанной методике [Есипов Д.С. и др., 2010] и включали стадии протеолиза, экстракции липидов смесью хлороформ – изоамиловый спирт, осаждения нуклеиновых кислот этанолом, обработки РНКазой, осаждения ДНК этанолом, обработки нуклеазой Р1 и щелочной фосфатазой.

Определение отношения 8-охо-dG/dG в гидролизате ДНК методом высокoэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрической и электрохимической детекцией выполнялось по ранее разработанной методике [Есипов Д.С. и др., 2010].

Протоколы хроматографического определения 8-охо-rG/rG в гидролизате ДНК, 8-охо-Guo/Guo в пуле свободных нуклеотидов, 8-охо-dG в культуральных средах были разработаны в ходе выполнения работы.

Культивирование дрожжей Saccharomyces cerevisiae штамм BY4742a (генотип MATa his3Δ1 lys2Δ0 leu2 Δ0 ura3Δ10), EUROSCARF выполняли по стандартным методикам на жидкой питательной среде, в аэробных условиях. Оценку плотности культуры производили методами подсчета в камере Горяева, измерения оптической плотности, посева на колонии и флуоресцентной микроскопии с окрашиванием примулином. Культура дрожжей была предоставлена кафедрой молекулярной биологии биологического факультета МГУ.

Разведение Drosophila melanogaster проводили по стандартным методикам, использовалась гетерогенная ящичная популяция, предоставленная кафедрой биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тепловой шок вызывался по подобранным для этого эксперимента протоколам.

Культивирование трансформированных клеток китайского хомячка линии *B11-dii* FAF28 (клон 237) проводили по стандартной методике, в рамках клеточно-кинетической модели, численность клеток оценивали путем подсчета в камере Горяева [Хохлов А.Н., 1989]. Клеточную культуру предоставил сектор эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ.

Математические расчеты и статистическую обработку результатов производили с помощью программ Microsoft Excel 2007 и SigmaPlot 12.

Результаты и обсуждение

Препаративный метод синтеза 8-охо-dG

Существующие на момент выполнения работы методики получения 8-охо-dG не могли удовлетворить потребность в количествах этого соединения, необходимых для исследований биологической активности. Нами был оптимизирован метод ацилирования 8-Br-dG в органическом растворителе с последующим гидролизом ацильных групп (рис. 1). Взятая за основу методика давала выход около 20%. Нам удалось повысить его в 4 раза.

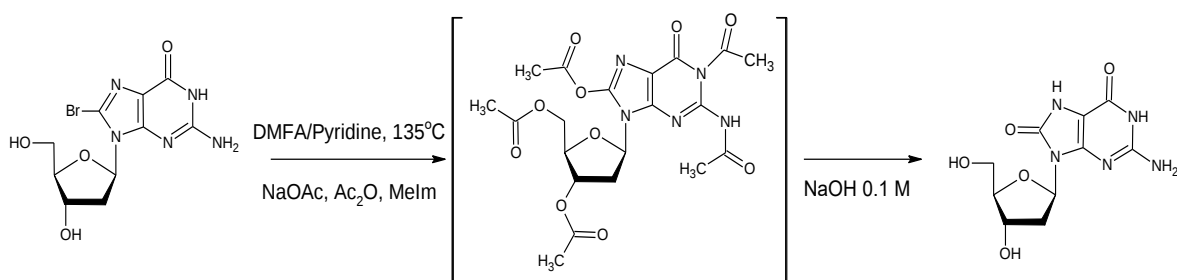


Рис. 1. Общая схема синтеза 8-охо-dG.

Для этого была подобрана смесь растворителей (25% пиридина в N,N-диметилформамиде) и температура (135°C), позволяющая достигнуть полного ацилирования бромгуанозина по восьмому положению. Проведен мониторинг кинетики реакции методом ВЭЖХ, получены УФ-спектры всех промежуточных продуктов (рис. 2 А). На завершающей стадии применен метод щелочного гидролиза, позволяющий получить практически чистый 8-охо-dG (рис. 2 Б).

Разработанная методика позволила достигнуть 80% выхода 8-охо-dG (по массе от 8-Br-dG). Структура и чистота вещества подтверждены методами LC-MS, ¹H-ЯМР, элементного анализа. В биологических экспериментах мы использовали полученное по этой методике соединение.

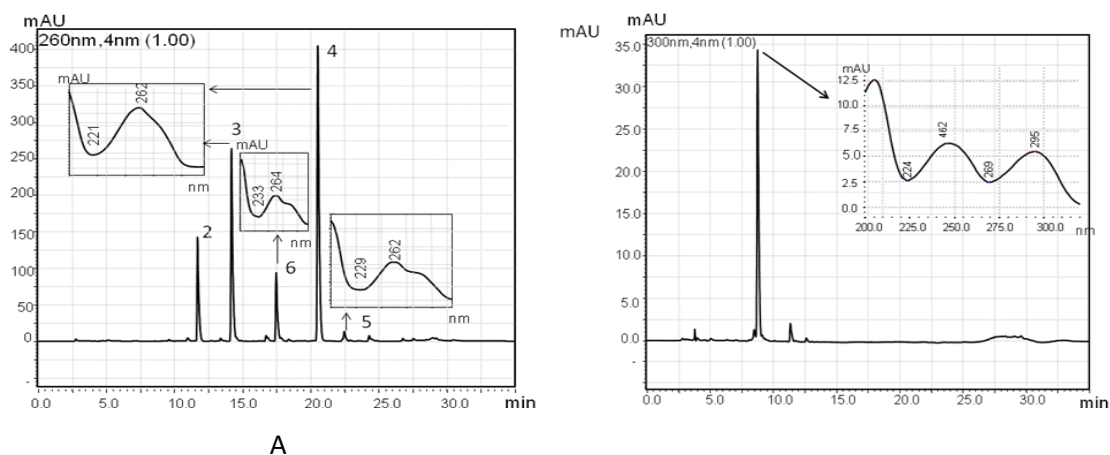


Рис. 2. Примеры хроматограмм промежуточных и окончательных продуктов синтеза 8-охо-dG: **А** – стадии ацилирования. **Б** – после щелочного гидролиза. Основной продукт – 8-охо-dG.

Исследование влияния экзогенного 8-охо-dG на отношение 8-охо-dG/dG в ДНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамм BY4742a

При измерении оптической плотности культуры дрожжей, растущей на среде с добавлением 8-охо-dG, достоверного влияния экзогенного нуклеозида на скорость роста обнаружено не было (рис. 3).

Не удалось зафиксировать его и с помощью подсчета клеток в камере Горяева, посева на колонии, флуоресцентной микроскопии с окрашиванием примулином.

По мере старения растущей в нормальных условиях культуры мы наблюдали увеличение отношения 8-охо-dG/dG в ДНК дрожжей (рис. 4 А, кривая 1). Через 175 ч культивирования отношение 8-охо-dG/dG в ДНК дрожжей в 50 раз превышало таковое для четырехчасовой культуры. При этом в первые сутки, пока наблюдался рост оптической плотности культуры, отношение 8-охо-dG/dG нарастало медленно. Через 32 ч культивирования, когда наступала стационарная фаза роста, происходило резкое возрастание отношения 8-охо-dG/dG, а спустя 70 ч роста скорость накопления 8-охо-dG вновь снижалась. Скачкообразный рост отношения 8-охо-dG/dG в период 32–70 ч культивирования обусловлен стрессом, вызванным участвовавшими механическими столкновениями клеточных стенок [Rodicio R., Heinisch J.J., 2010], появлением в среде метаболитов и истощением запаса питательных веществ. В этот период рост культуры останавливается, часть клеток подвергается автолизу. Однако в дальнейшем наступает частичная адаптация. Культура дрожжей сохраняет жизнеспособность в этих неблагоприятных условиях длительное время. И скорость нарастания отношения 8-охо-dG/dG через 70 ч культивирования снижается. Таким образом, и в случае дрожжей 8-охо-dG может являться маркером окислительного стресса.

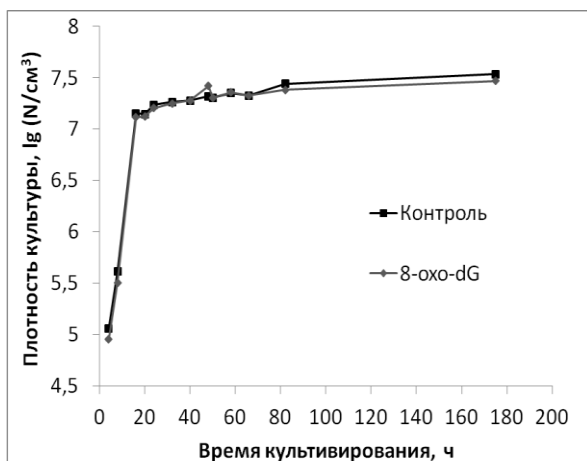


Рис. 3. Влияние экзогенного 8-охо-dG на скорость роста дрожжей. Группы: Контроль – дрожжи, растущие на стандартной среде при температуре 30°C; 8-охо-dG – дрожжи, растущие на среде, содержащей 1 мкМ 8-охо-dG в течение всего времени культивирования.

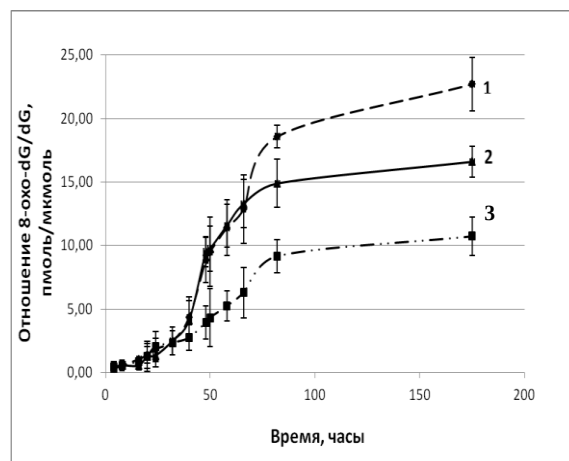


Рис. 4. Изменения соотношений 8-охо-dG/dG в ДНК дрожжей по мере роста культуры. Группы: Контроль (кривая 1) – дрожжи, растущие на стандартной среде при температуре 30°C; 8-охо-dG с момента посева (кривая 2) – дрожжи, растущие на среде, содержащей 1 мкМ 8-охо-dG в течение всего времени культивирования; 8-охо-dG через 32 ч культивирования (кривая 3) – дрожжи, которые росли на стандартной среде до достижения стационарной фазы (32 ч), а после этого в среду был добавлен 8-охо-dG до концентрации 1 мкМ.

Для дрожжей, посеянных в среду с экзогенным 8-охо-dG (1 мкМ), динамика нарастания отношения 8-охо-dG/dG первое время (4–66 ч) не отличается от таковой для контрольной группы (рис. 4 А, кривая 2). Различие с контролем наблюдается только на поздних стадиях культивирования (82–175 ч), когда скорость увеличения отношения 8-охо-dG/dG в ДНК дрожжей опытной группы существенно падает. Через 82 ч культивирования отношение 8-охо-dG/dG в ДНК дрожжей, получавших экзогенный 8-охо-dG, в 1,2 раза меньше такового для контроля, а через 175 ч – в 1,4 раза (рис. 4 Б, столбики 82 ч, 175 ч). Можно предположить, что на фоне экзогенного 8-охо-dG легче протекает процесс адаптации или перехода в фазу покоя, характерный для попавших в неблагоприятную среду клеток. Следует отметить, что на момент завершения эксперимента в среде еще оставался 8-охо-dG в концентрации примерно 0,3 мкМ.

Иная ситуация наблюдалась, когда экзогенный 8-охо-dG был внесен в среду к дрожжам, уже прекратившим рост (рис. 4 А, кривая 3). Уже через 16 ч с момента введения 8-охо-dG ДНК получивших его дрожжей содержала в 2,2 раза меньше 8-охо-dG, нежели

ДНК дрожжей контрольной группы (рис. 4, кривые 3 и 1). Такая разница (в 2,1-2,2 раза) сохраняется до окончания эксперимента. При этом кривая роста отношения 8-охо-dG/dG становится плавной, без резких «скачков». Таким образом, 8-охо-dG, добавленный к достигшей стационарной фазы культуре, вызывает более выраженный эффект, нежели присутствующий в среде в течение всего времени культивирования.

Исследование влияния экзогенного 8-охо-dG на жизнедеятельность и метаболизм *Drosophila melanogaster* в норме и условиях теплового шока

В экспериментах на *Drosophila melanogaster* проводилась оценка воздействия экзогенного 8-охо-dG на организменном уровне. Чтобы исключить «прямое» антиоксидантное действие или иную химическую реакцию 8-охо-dG с токсическим веществом, в качестве стрессирующего фактора была выбрана температура.

Личинки *Drosophila melanogaster* на поздних стадиях развития (во время формирования имагинальных дисков) крайне уязвимы даже к кратковременному повышению температуры. При этом наблюдается незначительная «быстрая», в течение суток, гибель личинок, и существенная смертность на стадии «куколки». Из-за нарушений развития метаморфоз не завершается, и визуально можно наблюдать потемневшие высохшие «куколки», из которых не вылетает имаго.

В ходе предварительных экспериментов была подобрана температура (39°C), под воздействием которой выплод имаго сокращается на 50-80% (см. рис. 5).

При содержании мух-родителей и личинок всех сроков развития на корме с добавлением экзогенного 8-охо-dG (до 1 мкМ концентрации) не наблюдается никаких токсических эффектов или сокращения выплода имаго (см. рис. 5).

При этом личинки, растущие на корме с 8-охо-dG, оказались более устойчивы к тепловому шоку, нежели не получавшие окисленного нуклеозида. Выплод имаго в группе, подвергнутой воздействию теплового шока и 8-охо-dG одновременно, приближался к таковому в контрольной группе (см. рис. 5). Иными словами, экзогенный 8-охо-dG примерно в 4 раза повышал выживаемость личинок *Drosophila melanogaster* в условиях теплового шока.

Изучение динамики вылета имаго показало, что тепловой шок оказывает губительный эффект на личинок «старшего возраста» и задерживает развитие «младших» (см. рис.6), в то время как 8-охо-dG снимает эти эффекты. Однако сам по себе окисленный нуклеозид, без теплового шока, также оказывал значимое влияние на скорость развития *Drosophila melanogaster*. Он увеличивал долю имаго, вылетевших в оптимальный (на 13-й день развития) срок.

Возможно, это связано с компенсацией метаболического стресса. Изучение зависимости протекторного эффекта 8-охо-dG от концентрации показало отсутствие таковой в диапазоне 1 нМ – 1 мкМ. Протекторный эффект оставался выраженным при использовании 8-охо-dG во всех этих концентрациях, а различия между группами мух, получавших разное количество окисленного нуклеозида, оказались статистически не достоверны. Это – важный аргумент в пользу сигнального механизма действия 8-охо-dG.

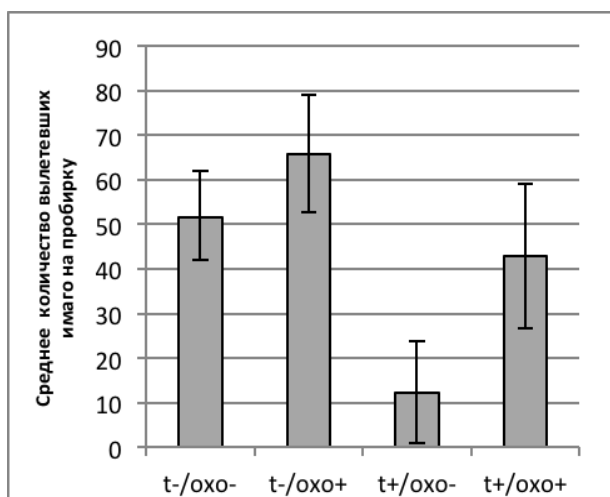


Рис. 5. Среднее количество вылетевших имаго на пробирку. Группы: t-/охо- – интактные мухи; t-/охо+ – мухи, получавшие 8-охо-dG с кормом в течение всего времени развития; t+/охо- – мухи, подвергнутые тепловому шоку при 39°C в течение 1 ч на 5-е сутки развития; t+/охо+ – мухи, получавшие 8-охо-dG с кормом и подвергнутые тепловому шоку при 39°C в течение 1 ч.

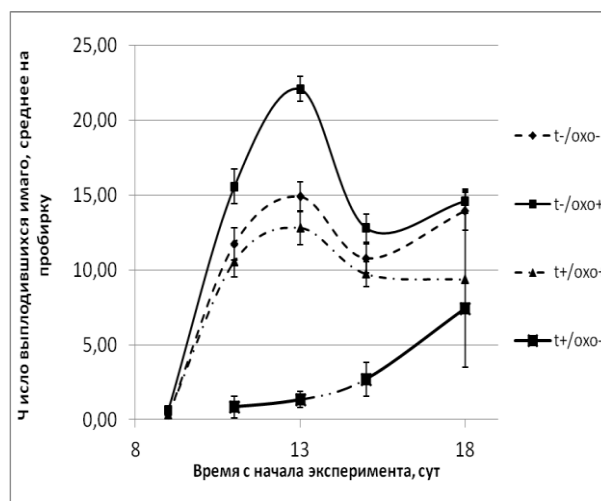


Рис. 6. Динамика вылода *Drosophila melanogaster*. Группы: t-/охо- – интактные мухи; t-/охо+ – мухи, получавшие 8-охо-dG с кормом в течение всего времени развития; t+/охо- – мухи, подвергнутые тепловому шоку при 39°C в течение 1 ч на 5-е сутки развития; t+/охо+ – мухи, получавшие 8-охо-dG с кормом и подвергнутые тепловому шоку при 39°C в течение 1 ч.

Измерение отношения 8-охо-dG/dG в ДНК имаго, вышедших из куколок всех четырех опытных групп, не показало различий между ними. Это логично с учетом масштабной перестройки тканей насекомого при метаморфозе, но, вместе с тем, говорит о том, что экзогенный 8-охо-dG не встраивается в клеточную ДНК *in vivo* даже при очень высокой пролиферативной активности клеток

Проведение эксперимента с тепловым шоком на взрослых мухах также показало выраженный протекторный эффект экзогенного 8-охо-dG. При этом использовалась более высокая температура (40°C), чем для личинок. Окисленный нуклеозид давался с кормом превентивно, за 7 дней до теплового воздействия. Преинкубация с ним повысила выживаемость мух (оценивалась в течение 5 сут с момента теплового шока) в 2 раза (см. рис. 7).

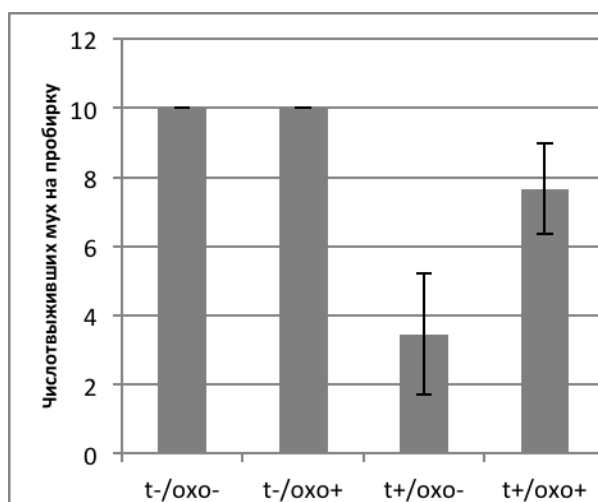


Рис. 7. Среднее количество выживших после теплового шока имаго на пробирку. Группы: t-/охо- – интактные мухи; t-/охо+ – мухи, получавшие 8-охо-dG с кормом в течение 7 сут; t+/охо- – мухи, подвергнутые тепловому шоку при 40°C в течение 1 ч; t+/охо+ – мухи, получавшие 8-охо-dG с кормом в течение 7 сут и подвергнутые тепловому шоку при 40°C в течение 1 ч.

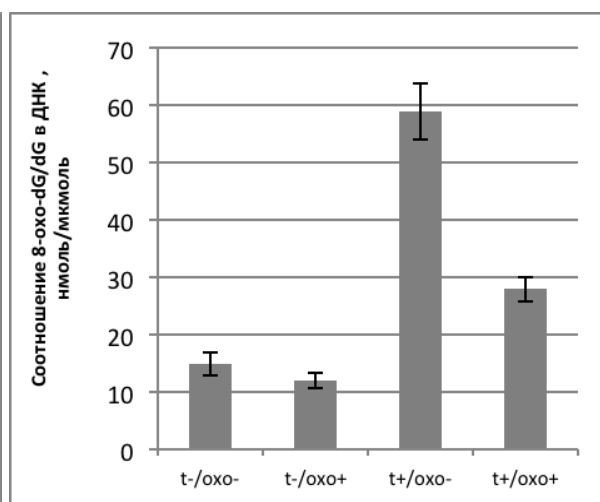


Рис. 8. Соотношение 8-охо-dG/dG в ДНК выживших *Drosophila melanogaster*. Группы: t-/охо- – интактные мухи; t-/охо+ – мухи, получавшие 8-охо-dG с кормом в течение 7 сут; t+/охо- – мухи, подвергнутые тепловому шоку при 40 °C в течение 1 ч; t+/охо+ – мухи, получавшие 8-охо-dG с кормом в течение 7 сут и подвергнутые тепловому шоку при 40°C в течение 1 ч.

Измерение отношения 8-охо-dG/dG в ДНК подвергнутых тепловому шоку *Drosophila melanogaster* показало значительное (в 6 раз) повышение его после термического воздействия (см. рис. 12). Это коррелирует с общими представлениями о 8-охо-dG в ДНК, как о биомаркере окислительного стресса. Тепловой стресс неминуемо приводит к окислительному стрессу ввиду нарушений в работе ферментов, в том числе, дыхательной цепи, и вызванного ими увеличения продукции АФК. У мух, подвергнутых одновременному воздействию экзогенного 8-охо-dG и высокой температуры, отношение 8-охо-dG/dG в ДНК хотя и повышено в сравнении с контролем, но всего в 2 раза. Вопрос, является ли это следствием протекторного действия 8-охо-dG или же индукции репарации ДНК этим соединением, пока остается открытым.

Среди вероятных механизмов протекторного действия 8-охо-dG в условиях теплового шока следует отметить активацию экспрессии каких-либо белков теплового шока при преинкубации с этим соединением. Однако нельзя исключить как неспецифического протекторного эффекта, так и воздействия на организменном, а не на клеточном, уровне.

Исследование влияния 8-охо-dG на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*, культивируемых в нормальных условиях, не обнаружило у этого соединения статистически достоверных геропротекторных либо геропроторных свойств.

Исследование влияния экзогенного 8-охо-dG на содержание окисленного гуанина в ДНК, РНК и пуле свободных нуклеотидов клеток китайского хомячка линии B11-dii FAF28

При исследовании влияния экзогенного 8-охо-dG на пролиферацию клеток китайского хомячка линии B11-dii FAF28 не было обнаружено цитотоксических или стимулирующих рост эффектов в диапазоне концентраций 1 нМ – 1 мкМ.

При исследовании динамики концентраций экзогенного 8-охо-dG в культуральной среде была показана высокая его стабильность в отсутствие клеток. В присутствии клеток наблюдалось быстрое снижение содержания 8-охо-dG в культуральной среде в первые 8 ч с момента добавления, далее оно замедляется, окончательно стабилизируясь спустя 30 ч (см. рис. 9). Далее в течение 19 дней эксперимента содержание 8-охо-dG в культуральной среде остается неизменным.

Хроматографическое измерение содержания 8-охо-dG в цитоплазме показывает возрастание количества окисленного нуклеозида внутри клеток, выросших на среде с 8-охо-dG (см. рис. 10). Это говорит о том, что, по крайней мере, часть внесенного в культуральную среду 8-охо-dG проникает внутрь клеток.

Кривая изменения отношения 8-охо-dG/dG в ДНК клеток данной линии при их «стационарном старении» была получена ранее. Культура последовательно проходит три фазы – логарифмического роста, «плато» и снижения количества клеток. Отношение 8-охо-dG/dG в первой фазе невелико, с наступлением «плато» оно резко возрастает и продолжает расти. К концу стационарной фазы в ДНК клеток содержится в 3-5 раз больше 8-охо-dG, чем в момент ее начала. Для эксперимента были выбраны две точки кривой – 5-е сутки культивирования, когда стационарная фаза только наступает, и 19-е сутки, когда уже начинается сокращение количества живых клеток в культуре.

Добавление экзогенного 8-охо-dG в культуральную среду на 5-е сутки культивирования не приводит к изменениям отношения 8-охо-dG/dG в ДНК клеток (см. рис. 11).

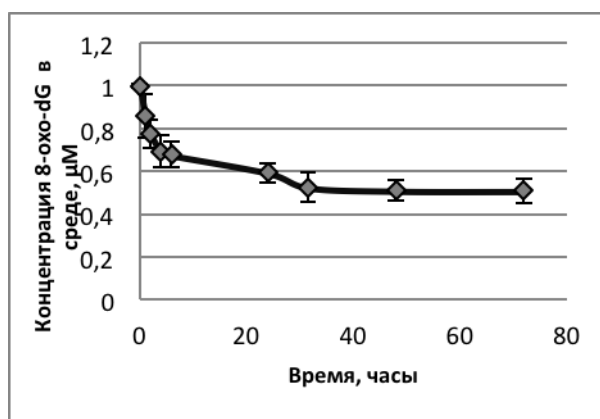


Рис. 9. Динамика изменения концентрации 8-охо-dG в ростовой среде в первые 70 ч с момента добавления 1 мкМ окисленного нуклеозида к культуре клеток (5-е сутки после пересева), находящихся в стационарной фазе роста. Приведено содержание 8-охо-dG в среде, измеренное методом ОФ-ВЭЖХ. Указаны ошибки среднего.

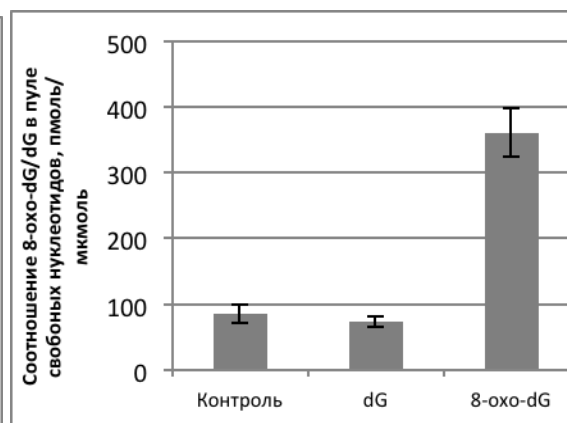


Рис. 10. Соотношение 8-охо-Guo/Guo в пуле свободных нуклеотидов культивируемых клеток 19-ти суточного «возраста». Контроль – клетки, которые постоянно росли на стандартной среде с сывороткой 19 сут; dG – клетки, в среду к которым за 2-е суток до измерения был добавлен dG до концентрации 1 мкМ; 8-охо-dG – клетки, в среду к которым за 2-е суток до измерения добавлен 8-охо-dG до концентрации 1 мкМ. Указаны ошибки среднего.

В то же время, добавление экзогенного 8-охо-dG в культуральную среду на 19-е сутки культивирования приводит к снижению отношения 8-охо-dG/dG в клеточной ДНК в 7 раз (см. рис. 11). Таким образом, эффект 8-охо-dG проявляется только на находящихся в условиях стресса («старых») клетках и не затрагивает растущие в оптимальных условиях молодые клетки.

Для клеток в возрасте 19 сут также было измерено содержание окисленного рибогуанозина (8-охо-rG) в составе высокомолекулярной РНК. Отношение 8-охо-rG/rG уменьшалось под действием экзогенного 8-охо-dG в 1,5–1,75 раза (см. рис. 12). Это можно связать как с прямым антиоксидантным действием соединения (8-охо-dG имеет более низкий окислительно-восстановительный потенциал, нежели dG), так и с возможной активацией антиоксидантной защиты.

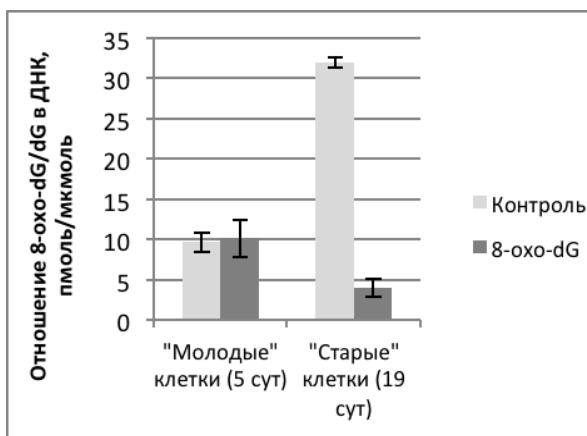


Рис. 11. Сравнение соотношения 8-охо-dG/dG в ДНК культивируемых клеток 5-ти суточного и 19-ти суточного «возрастов». Контроль – клетки, которые постоянно росли на стандартной среде с сывороткой; 8-охо-dG – клетки, в среду к которым за 2 сут до измерения добавлен 8-охо-dG до концентрации 1 мкМ. Указаны ошибки среднего.

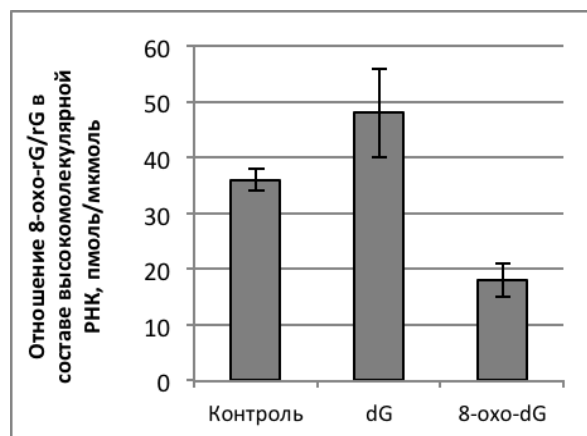


Рис. 12. Соотношение 8-охо-rG/rG в высокомолекулярной РНК культивируемых клеток 19-ти суточного «возраста». Контроль – клетки, которые постоянно росли на стандартной среде с сывороткой; dG – клетки, в среду к которым за 2 сут до измерения был добавлен dG до концентрации 1 мкМ; 8-охо-dG – клетки, в среду к которым за 2 сут до измерения был добавлен 8-охо-dG до концентрации 1 мкМ. Указаны ошибки среднего.

Закключение

8-Оксо-2'-дезоксигуанозин в силу неферментативного механизма образования, вероятно, начал играть существенную роль еще на самых первых этапах зарождения и развития жизни. Как только появились нуклеозиды в клетке и кислород в атмосфере, неизбежно начали образовываться окисленные основания, и в первую очередь – 8-охо-dG из-за низкого окислительно-восстановительного потенциала dG. Эволюция механизмов репарации ДНК, антиоксидантной защиты, адаптации клетки к стрессу проходила на фоне присутствия 8-охо-dG, а, вероятно, и ориентируясь на него, как на сигнал окислительного повреждения биомолекул. Данное исследование подтвердило высокую консервативность механизма индукции репарации 8-охо-dG в ДНК экзогенным нуклеозидом. Он присутствует у низших и высших эукариот, у нормальных и трансформированных клеток, на разных стадиях развития животных. Вероятно, также универсален механизм протекторного действия 8-охо-dG при неспецифическом стрессе, обнаруженный нами на модели теплового шока *Drosophila melanogaster*. Выяснение деталей этих механизмов и их связей с иными путями внутри- и межклеточной сигнализации может стать темой еще многих исследований.

Выводы

1. Разработан метод синтеза 8-охо-dG и синтезирован 8-охо-dG в количестве, достаточном для проведения биологических экспериментов.
2. Экзогенный 8-охо-dG не влияет на рост суспензионной культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. По мере роста и старения культуры дрожжей содержание 8-охо-dG в их ДНК увеличивается. Экзогенный 8-охо-dG уменьшает накопление эндогенного 8-охо-dG в ДНК. При внесении 8-охо-dG в среду к дрожжам, достигшим стационарной фазы роста, этот эффект более выражен, чем при добавлении нуклеозида в момент посева.
3. Экзогенный 8-охо-dG влияет на личиночное развитие и метаморфоз *Drosophila melanogaster*. Экзогенный 8-охо-dG повышает выживаемость личинок и имаго в условиях теплового шока, а также снижает уровень 8-охо-dG в ДНК подвергнутых тепловому стрессу *Drosophila melanogaster*.
4. Экзогенный 8-оксо-2'-дезоксигуанозин снижает содержания окисленного гуанинового основания в ДНК и высокомолекулярной РНК «старых» клеток китайского хомячка. При этом экзогенный 8-охо-dG не влияет на содержание окисленного основания в ДНК активно делящихся клеток.
5. Таким образом, экзогенный 8-охо-dG снижает содержания 8-охо-dG в ДНК старых и испытывающих стресс клеток и организмов всех исследованных нами систематических групп. Вполне вероятно, что это свойство 8-охо-dG универсально для широкого спектра биосистем.

Список работ Мармий Н.В., опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ:

1. **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.
2. **Marmiy N. V.**, Esipov D. S. Biological role of 8-oxo-2'-deoxyguanosine // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2015. Vol. 70. №. 4. P. 168–172.
3. **Мармий Н. В.**, Есипов Д. С. Изменения уровня 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в ДНК клеток печени мышей при остром токсическом стрессе // Тонкие химические технологии. 2016. Т. 11. № 6. С. 68–74.
4. **Мармий Н. В.**, Есипов Д. С. Метод препаративного синтеза 8-оксо-2'-дезоксигуанозина для лабораторного применения // Тонкие химические технологии. 2017. Т. 12. № 4. С. 58–64.

Статьи в журналах из списка ВАК

- 1 Невредимова Т.С., **Мармий Н.В.**, Есипов Д.С. и др. 8-Оксо-2'-дезоксигуанозин – биомаркер окислительного стресса // Вестник МИТХТ. 2014. Т. 9. № 5. С. 3–10.
- 2 **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.
- 3 **Мармий Н.В.**, Моргунова Г.В., Есипов Д.С. и др. Влияние экзогенного 8-оксо-2'-дезоксигуанозина на "стационарно стареющие" культивируемые клетки // Клиническая геронтология. 2017. Т. 23. № 9-10. С. 41–43.

Тезисы международных конференций:

1. **Мармий Н. В.**, Есипов Д. С., Ивницкий С. Б. 8-оксо-2'-дезоксигуанозин – "побочный" продукт метаболизма или сигнальная молекула? // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Т. 2. Fix-print Пушино, 2017. С. 508–512.
2. **Marmiy N. V.**, Morgunova G. V., Esipov D. S., Khokhlov A. N. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine – a biomarker of aging and/or a possible tool for biomedical prevention/treatment of age-related diseases? // In IVAO. Biomedical Innovation for Healthy Longevity. Санкт-Петербург, 2016. P. 75–75.
3. Esipov D. S., **Marmiy N. V.**, Esipova O. V. How 8-oxo-2'-deoxyguanosine can be used in medicine? // High-Tech in Chemical Engineering – 2016 : Abstracts of XVI International Scientific Conference with elements of school of young scientists. Moscow, 10–15 October 2016. Moscow: Moscow Technological University, 2016. P. 116–116.
4. **Marmiy N. V.**, Ivnitsky S. B., Esipova O. V., Esipov D. S. Protective effect of 8-oxo-2'-deoxyguanosine on the larval stages of drosophila melanogaster in the heat shock conditions // High-Tech in Chemical Engineering – 2016: Abstracts of XVI International Scientific Conference with elements of school of young scientists. Moscow, 10–15 October, 2016. Moscow: Moscow Technological University, 2016. P. 128–128.
5. Morgunova G. V., Esipov D. S., **Marmiy N. V.**, Khokhlov A. N. Biomarkers of age in the "stationary phase aging" model // The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure Biology: Abstracts. Novosibirsk, Russia, 29 August – 2 September, 2016. Novosibirsk, 2016. P. 189–189.
6. **Marmiy N. V.**, Morgunova G. V., Esipov D. S., Khokhlov A. N. On the possible impact of exogenous 8-oxo-2'-deoxyguanosine on DNA synthesis, damage and repair in aging cell cultures and organism // The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure Biology (BGRS-2016) : Abstracts. Novosibirsk, Russia, 29 August – 2 September, 2016. Novosibirsk, 2016. P. 183–183.

Благодарности

Выражаю благодарности моему **научному руководителю Есипову Д.С.** за неоценимую помощь в подготовке диссертационной работы, планировании и проведении экспериментов;

Хохлову А.Н., Моргуновой Г.В. и другим сотрудникам сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ за предоставление культивируемых клеток для исследований и оценку цитотоксичности 8-охо-dG;

Ивницкому С.Б. и сотрудникам кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ за предоставление популяции *Drosophila melanogaster* и обучение работе с ними;

Калебиной Т.С., Рекстиной В.В. за помощь в проведении экспериментов на дрожжевых культурах;

Твороговой А.В. за помощь в проведении флуоресцентной микроскопии;

Кирилловой Ю.Г., Есиповой О.В., Зиневич Т.В. за помощь в расшифровке ЯМР-спектров;

Восейкову В.Л., Есиповой О.В. за помощь в редактировании диссертации и автореферата;

всем сотрудникам кафедры биоорганической химии биологического факультета МГУ за полученные знания и навыки.