

Окисление ДНК и ее компонентов активными формами кислорода

А.А.Кузнецова, Д.Г.Кнорре, О.С.Федорова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук

630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8, факс (383)333–3677

Рассмотрены механизмы окисления нуклеозидов, нуклеотидов и ДНК активными формами кислорода — синглетным кислородом, супероксидными и гидроксильными радикалами, а также высоковалентными оксокомплексами металлов.

Библиография — 137 ссылок.

Оглавление

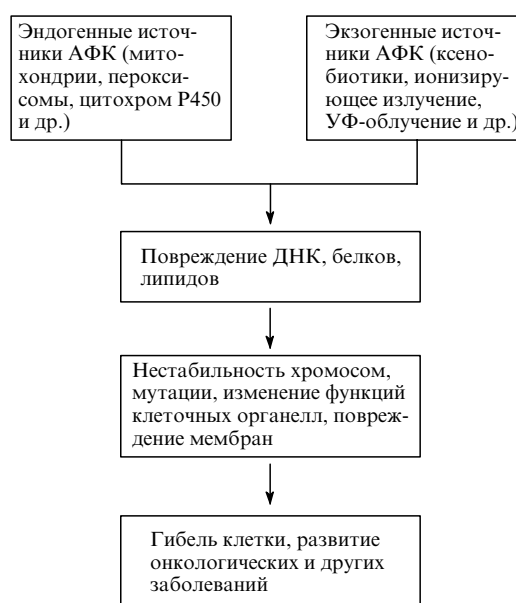
I. Введение	714
II. Активные формы кислорода	715
III. Окисление ДНК синглетным кислородом	716
IV. Окисление ДНК супероксидными радикалами	717
V. Окисление ДНК гидроксильными радикалами	718
VI. Окисление ДНК высоковалентными оксокомплексами металлов	727
VII. Заключение	732

I. Введение

В ряде биохимических процессов, протекающих в клетках живых организмов, а также при некоторых внешних воздействиях образуются активные формы кислорода (АФК), которые повреждают различные компоненты клетки, в том числе ДНК. Повреждения ДНК могут приводить к ускоренному развитию дегенеративных процессов, старению и гибели клеток (схема 1).^{1–3} Исследование времени жизни

таких повреждений, их репарационной устойчивости, а также установление их роли в возникновении мутаций и развитии заболеваний — актуальная задача современной науки.^{4,5} С каждым днем увеличивается число примеров, иллюстрирующих важность репарации ДНК в предотвращении различных заболеваний.^{6–8}

Схема 1



А.А.Кузнецова. Старший лаборант лаборатории исследования модификации биополимеров ИХБФМ СО РАН.

Телефон: (383)335–6274, e-mail: sandra-k@niboch.nsc.ru

Область научных интересов: направленная модификация ДНК, создание и изучение механизмов аффинных реагентов, содержащих фталоцианиновые группы, для функциональной геномики.

Д.Г.Кнорре. Академик, главный научный сотрудник того же института. Телефон: (383)336–0632, e-mail: knorre@niboch.nsc.ru
Область научных интересов: аффинная модификация белков и нуклеиновых кислот, синтез реакционноспособных производных олигонуклеотидов, белково-нуклеиновые взаимодействия.

О.С.Федорова. Доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией исследования модификации биополимеров того же института. Телефон: (383)335–6274, e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru

Область научных интересов: химическая и ферментативная кинетика, направленная модификация ДНК, структурно-кинетическое исследование белково-нуклеиновых взаимодействий в системах репарации, ферменты репарации ДНК.

Дата поступления 12 февраля 2009 г.

В то же время окислительные свойства АФК могут быть использованы для направленной деградации нуклеиновых кислот. Так, для установления последовательностей ДНК, связывающих определенные белки, методом футпринтинга широко применяют системы, генерирующие гидроксильные радикалы.⁹ Повреждение нуклеиновых кислот (НК) может использоваться также для лечения онкологических, вирусных и других заболеваний.^{10–13}

В качестве реагентов для окислительного расщепления нуклеиновых кислот применяют различные комплексы переходных металлов. Деструкция НК под действием металлокомплексов непосредственно связана с их способностью генерировать АФК либо при возбуждении светом, либо в «темновых» реакциях сопряженного окисления некоторых соединений, таких как аскорбиновая кислота, тиолы и др.¹⁴ К настоящему времени окисление НК активными формами кислорода детально изучено. В результате таких исследований выделены и охарактеризованы несколько десятков продуктов модификации НК и установлены механизмы их образования. Окислительные превращения нуклеиновых кислот могут протекать как по гетероциклическим основаниям, так и по остатку рибозы.

В настоящее время исследовано множество металлокомплексных систем для сайт-направленного окислительного расщепления НК: 1,10-фенантролин–медь(I),^{15, 16} *o*-бромбензойная кислота–медь(II),¹⁷ ЭДТА–железо(II),^{18, 19} блеомицин–железо(II),²⁰ порфирилаты железа(III),^{21, 22} марганца(III),^{23, 24} цинка(II),²⁵ палладия(II),²⁶ европия(III)²⁷ и многие другие.^{28–31}

Комплексы диамагнитных металлов (Zn(II), Al(III), Eu(III), Pd(II), Lu(III) и др.) расщепляют или модифицируют ДНК в аэробных условиях при облучении светом определенной длины волны. Окисляющей частицей в этом случае обычно выступает синглетный кислород, образующийся в результате фотосенсибилизации. Применение соединений, приводящих к модификации НК при облучении, ограничено способностью света проникать в ткани (750–800 нм — область максимального пропускания биологической ткани³²). В связи с этим в последнее время значительное внимание направлено на исследование катализаторов, работающих в «темновых» условиях. Известно, что комплексы парамагнитных металлов (Fe(III), Co(II), Cu(II), Mn(III) и др.) катализируют реакции окисления органических соединений молекулярным кислородом в присутствии восстановителей.³³ В ходе этих процессов образуются активные промежуточные частицы: супероксидные и гидроксильные радикалы, высоковалентные оксокомплексы металлов, которые и окисляют целевой субстрат. Комплексы порфиринов и их аналогов с ионами диамагнитных и парамагнитных металлов являются одними из наиболее эффективных катализаторов окисления органических субстратов молекулярным кислородом. Следует отметить, что механизмы активации молекулярного кислорода и образования реакционноспособных частиц хорошо изучены при исследовании порфиринов.³⁴

Механизмам окисления ДНК посвящено несколько обзоров, авторы которых ограничились в основном рассмотрением механизмов окисления либо остатка 2'-дезоксирибозы,³⁵ либо гетероциклических оснований в составе ДНК.^{36–38} Нами опубликован обзор³⁹, посвященный окислительной деградации нуклеиновых кислот. Основное внимание в нем уделено окислению НК гидроксильными радикалами, генерируемыми при γ -радиолизе, а также расщеплению НК рядом антибиотиков. За последние 15 лет в литературе появилось много новых данных об окислитель-

ной деградации ДНК. В представленном обзоре рассмотрен более широкий круг окисляющих частиц — синглетный кислород, супероксидные и гидроксильные радикалы, высоковалентные оксокомплексы металлов — и в отличие от других публикаций, посвященных механизмам окисления ДНК, детально обсуждены механизмы окисления как гетероциклических оснований, так и остатка 2'-дезоксирибозы.

II. Активные формы кислорода

Образование АФК из молекулярного кислорода подробно рассмотрено в публикации³⁹. К активным формам кислорода относят продукты неполного восстановления молекулярного кислорода, которые, как правило, обладают высокой реакционной способностью благодаря наличию неспаренного электрона⁴⁰ (супероксидный радикал $O_2^{\cdot-}$, гидроксильный радикал $HO^{\cdot}$, пероксиды как неорганического, так и органического происхождения). Восстановление кислорода ионами металлов переменной валентности может происходить с предварительным координированием молекулы кислорода или частиц, соответствующих ее неполному восстановлению. В результате образуются оксокомплексы металлов, находящихся в высоковалентных состояниях (например, железо или марганец в состоянии окисления 4+ или 5+, медь в состоянии окисления 3+ и т.п.).⁴¹ Такие комплексы могут либо непосредственно выступать в качестве окисляющих агентов, либо генерировать гидроксильные радикалы с переходом металла в более низкое состояние окисления. К АФК относят также синглетный кислород 1O_2 , образующийся в результате фотосенсибилизации.⁴²

За деструкцию нуклеиновых кислот в различных окислительных условиях отвечают свободные гидроксильные радикалы, являющиеся продуктами трехэлектронного восстановления молекулярного кислорода, синглетный кислород и в некоторых системах — координированные кислородные частицы в форме оксокомплексов металлов в высоких степенях окисления.

Супероксидный радикал не способен окислять основные биомолекулы, в частности ДНК.⁴³ Он становится окислителем лишь после протонирования до $HO_2^{\cdot}$ ($pK_a = 4.9$ (см.⁴⁴)). При физиологических значениях pH в водном растворе в равновесии содержится < 1% протонированных супероксидных радикалов, которые, в отличие от $O_2^{\cdot-}$, могут отрывать атом водорода в аллильном положении ненасыщенных липидов.⁴⁵ Несмотря на слабые окислительные свойства, $O_2^{\cdot-}$ способен легко взаимодействовать с радикалом гуанина, что приводит к окислению остатка гуанина в ДНК.⁴⁶

Среди продуктов окисления ДНК активными формами кислорода можно выделить две группы: продукты окисления углеводного фрагмента и продукты окисления гетероциклических оснований. Окисление углеводов происходит под действием сильных окислителей, таких как гидроксильные радикалы и некоторые оксокомплексы металлов в высоких степенях окисления. В большинстве случаев окисление остатка 2'-дезоксирибозы приводит к разрывам цепи ДНК. В результате окисления азотистых оснований образуется большое количество продуктов, которые могут привести к различным модификациям в геноме. Среди гетероциклических оснований гуанин является наиболее восприимчивой мишенью при окислении, поскольку имеет самый низкий потенциал окисления.^{47, 48}

Строение продуктов окислительной модификации НК определено в экспериментах по окислению модельных соединений (свободных гетероциклов, нуклеозидов, нуклео-

тидов или коротких олигонуклеотидов). Исследования на нуклеиновых кислотах показали, что данные, полученные на модельных соединениях, в большей части могут быть перенесены на окисление полимерных молекул. При окислении хроматина также возможно образование другого типа повреждений — ковалентных белково-нуклеиновых комплексов,⁴⁹ однако этот тип повреждений не рассматривается в данном обзоре.

III. Окисление ДНК синглетным кислородом

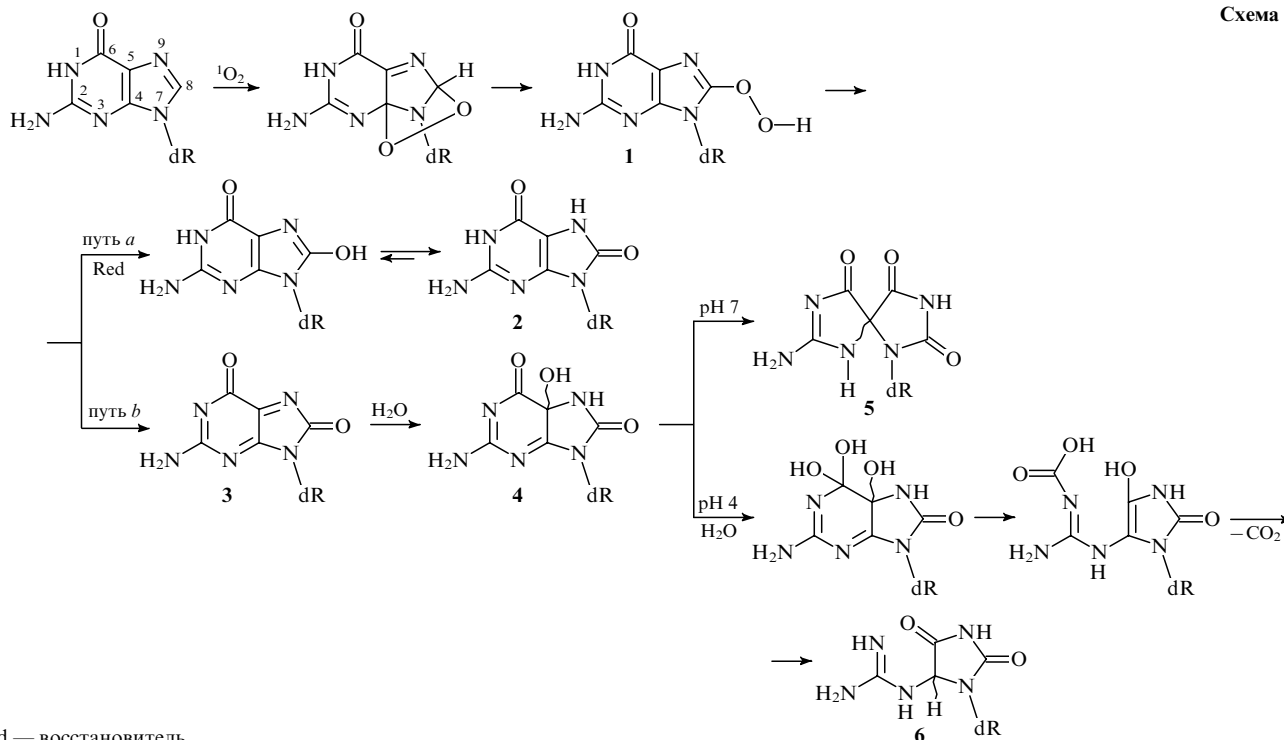
При взаимодействии синглетного кислорода с ДНК происходит селективное окисление остатков гуанина.^{50, 51} Синглетный кислород вступает в реакцию [4+2]-циклоприсоединения с имидазольным циклом остатка гуанина (схема 2). Данный механизм был установлен для окисления 2',3',5'-трис(*трет*-бутилдиметилсилилокси)гуанозина синглетным кислородом.⁵² Однако дальнейшие исследования на клеточной ДНК показали, что данный механизм справедлив и для окисления полимерных молекул НК.⁵³ Поэтому остаток дезоксирибозы (dR) в схеме 2 можно рассматривать как нуклеиновую цепь. Здесь и далее для краткости продукты окисления остатков гетероциклов названы как dR-производные гетероциклических оснований, природа остатка dR оговорена отдельно. После [4+2]-циклоприсоединения происходит перегруппировка образовавшегося эндопероксида в производное 8-гидропероксида гуанина (**1**),⁵² которое является таким же сильным окислителем, как и пероксикислота и, как предполагают, в присутствии восстановителей превращается в dR-производное 8-гидроксигуанина, таутомерную форму dR-производного 8-оксо-7,8-дигидрогуанина (**2**) (схема 2, путь *a*).⁵² Протекание реакции по этому механизму подтверждается тем фактом, что обработка клеточной ДНК синглетным кислородом приводит к накоплению **2**.⁵³ Кроме того, в реакции с ¹⁸O-содержащим синглетным кислородом (¹⁸O₂) было показано, что атом кислорода в поло-

жении **8** образующегося продукта **2** переходит непосредственно из молекулы синглетного кислорода.⁵³

В отсутствие восстанавливающего агента производное **1** претерпевает превращение в промежуточный продукт **3**, являющийся окисленной формой **2** (схема 2, путь *b*). Соединение **3** легко вступает в реакцию с нуклеофилами по положению 5 пуринового кольца. Наиболее часто в качестве нуклеофила выступает молекула воды (при обычных условиях проведения реакции), при взаимодействии с которой образуется промежуточный продукт **4**.⁵⁴ Протекание реакции по этому пути подтверждено в экспериментах с меченной изотопом ¹⁸O водой, данными масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР.⁵⁴ Это соединение — предшественник dR-производных спироиминодигидантоина (**5**) и гуанидинодигидантоина (**6**).⁵⁴ Соотношение между соединениями **5** и **6** зависит от pH среды и от природы остатка dR (см. схему 2).⁵⁴ Так, образование dR-производного **5** наблюдали при окислении 2'-дезоксигуанозина при pH > 7,^{54, 55} а **6** — при окислении 2'-дезоксигуанозина при pH < 7.⁵⁴ В процессе окисления двухцепочечной ДНК синглетным кислородом образовывался преимущественно гуанидинодигидантоин.⁵⁶

Следует отметить, что 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (**2**) легко претерпевает повторное окисление синглетным кислородом. В работе⁵⁷ проводили окисление 3- и 15-звенных олигодезоксирибонуклеотидов синглетным кислородом. Продукты окисления были определены на основании данных ESI и MALDI-TOF масс-спектрометрии. На первом этапе после [2+2]-циклоприсоединения к связи C(4)–C(5) пуринового кольца образуется 5-гидропероксид 8-оксо-7,8-дигидрогуанина **7** (схема 3, в данной схеме dR представляет собой остаток 2'-дезоксирибозы в полинуклеотидной цепи).⁵⁷ После этого происходит раскрытие пиримидинового кольца по связи C(5)–C(6) с последующим декарбоксилированием и образование dR-производного дегидрогуанидинодигидантоина **8**, дальнейшие превращения которого могут привести к dR-производным парабановой (**9**) и оксалуровой кислот (**10**).⁵⁷

Схема 2



Red — восстановитель.

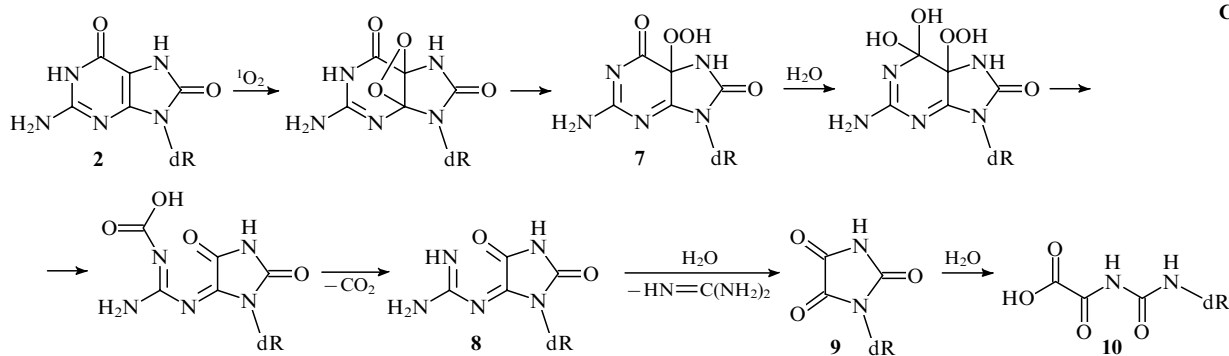


Схема 3

Таким образом, при взаимодействии синглетного кислорода с нуклеиновыми кислотами происходит окисление только остатков гуанина. Главными продуктами окисления являются dR-производные 8-оксо-7,8-дигидрогуанина, спироиминодигидантоина, гуанидинодигидантоина и дегидрогуанидинодигидантоина.

IV. Окисление ДНК супероксидными радикалами

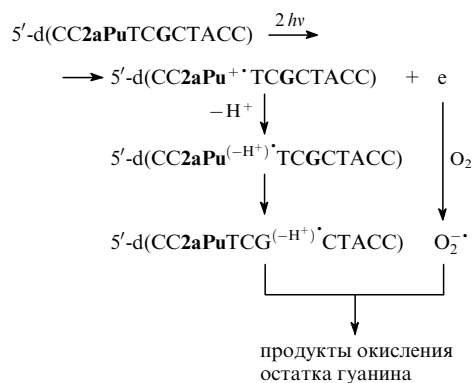
Супероксидный радикал не способен окислять ДНК, однако он селективно взаимодействует с радикалом гуанина, приводя к его окислению.

Образование радикала гуанина наблюдали в различных окислительных системах.⁵⁸ На первом этапе при отрыве одного электрона от остатка гуанина образуется катион-радикал гетероцикла гуанина $G^{+\bullet}$. С привлечением методов импульсного радиолиза⁵⁹ и лазерного фотолиза⁶⁰ показано, что pK_a катион-радикала $G^{+\bullet}$, генерируемого из 2'-дезоксигуанозина, составляет 3.9. При нейтральных pH происходит депротонирование атома N(1) гетероцикла гуанина и образуется нейтральный радикал $G^{(-H^+)\bullet}$ (см.⁵⁹). Неспаренный электрон локализуется на атомах O(6) или C(5) гуанина.⁵⁹ С помощью метода ЭПР установлено,⁶¹ что в нейтральных водных растворах при комнатной температуре время жизни таких радикалов в ДНК тимуса теленка составляет ~ 5 с. При использовании метода лазерного импульсного фотолиза показано,⁶² что время жизни радикала $G^{(-H^+)\bullet}$ в 16-звенном дуплексе составляет ~ 0.3 с. Данный радикал с высокими скоростями реагирует с другими радикальными частицами. Так, в одно- и двухцепочечных ДНК он взаимодействует с $O_2^{\bullet-}$ с константой скорости $\sim 4.7 \cdot 10^8$ (см.⁴⁶), реакция с $NO_2^{\bullet}$ протекает с константой скорости $\sim 4.3 \cdot 10^8$ (см.⁶³), а при взаимодействии с радикалом $Me_3C^{\bullet}$ константа скорости составляет $\sim 10^9$ (моль $\cdot$ л $^{-1} \cdot$ с) $^{-1}$ (см.⁶²).

При окислении нейтрального радикала гуанина $G^{(-H^+)\bullet}$ супероксидным радикалом $O_2^{\bullet-}$ основным продуктом является производное имидазолон.⁴⁶ Супероксидный радикал и $G^{(-H^+)\bullet}$ генерировали путем импульсного облучения (12 нс) олигонуклеотида 5'-d(CC2aPuTCGCTACC), содержащего один остаток 2-аминопурина (2aPu) и один остаток гуанина (G) (схема 4). На первом этапе в олигонуклеотиде формировался катион-радикал 2-аминопурина 2aPu $^{+\bullet}$, который быстро депротонируется с образованием нейтрального радикала 2aPu $^{(-H^+)\bullet}$. Данный радикал является сильным одноэлектронным окислителем и способен окислять остаток

гуанина до нейтрального радикала $G^{(-H^+)\bullet}$, даже если 2aPu и G отделены по цепи ДНК друг от друга несколькими основаниями.^{64,65} В экспериментах, проведенных авторами работы⁴⁶, остатки 2aPu и G были разделены двумя нуклеотидами. Образовавшийся при фотоионизации остатка 2-аминопурина гидратированный электрон быстро и количественно захватывался молекулой O_2 , в результате появлялся супероксидный радикал (см. схему 4).

Схема 4



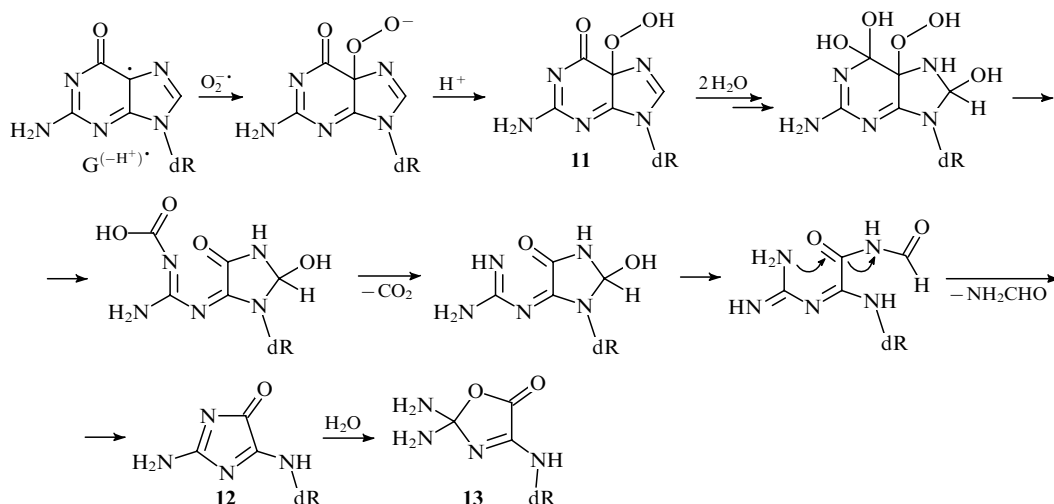
Супероксидный радикал присоединяется к нейтральному радикалу гуанина $G^{(-H^+)\bullet}$, и после протонирования аниона образуется dR-производное гидропероксида гуанина по положению 5 пуринового кольца (11) (схема 5).

После присоединения двух молекул воды происходит раскрытие пиримидинового цикла по связи C(5)–C(6) и декарбоксилирование. Дальнейшая перегруппировка получившегося карбиноламина приводит к раскрытию имидазольного цикла, отщеплению молекулы формамида и образованию dR-производного имидазолон 12. Имидазолон подвергается гидролизу ($t_{1/2}$ соединения 12 составляет ~ 10 ч в нейтральных водных растворах при 20°C), в результате которого образуется dR-производное оксазолон 13.⁴⁶

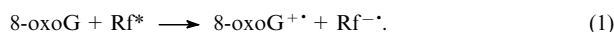
Как и в случае радикалов гуанина, отрыв электрона от 8-оксо-7,8-дигидрогуанина приводит к образованию катион-радикала 8-оксо-7,8-дигидрогуанина (8-охоG $^{+\bullet}$).^{66,67} При нейтральных pH происходит депротонирование 8-оксо-7,8-дигидрогуанина и образуется нейтральный радикал 8-охоG $^{(-H^+)\bullet}$ (pK_a данного радикала составляет 6.6 (см.⁶⁷)).

Окисление нейтрального радикала 8-охоG $^{(-H^+)\bullet}$ наблюдали при фотоокислении 2',3',5'-три-O-ацетил-8-оксо-7,8-дигидрогуанозина в присутствии рибофлавина (Rf).⁶⁸ Рибофлавин в возбужденном триплетном состоянии (Rf*) отрывал один электрон от остатка 8-оксо-7,8-дигидрогуа-

Схема 5



нина с образованием катион-радикала 8-оксoG⁺⁺ и анион-радикала Rf^{-•}.



При переносе электрона с анион-радикала рибофлавина Rf^{-•} на молекулярный кислород генерировался супероксидный радикал, а рибофлавин переходил в исходное невозбужденное состояние.⁶⁹



Взаимодействие O₂^{-•} и нейтрального радикала 8-оксо-7,8-дигидрогуанина 8-оксoG^{(-H⁺)•} приводит к образованию 5-гидропероксида 8-оксо-7,8-дигидрогуанина **7** (схема 6, dR в данной схеме — остаток 2',3',5'-три-*O*-ацетилрибозы). Показано,⁶⁸ что при pH ≤ 7 основным продуктом дальнейшего превращения интермедиата **7** является dR-производное дегидрогуанидиногидантоина **8**, образующееся по механизму, описанному выше для взаимодействия производных 8-оксо-7,8-дигидрогуанина с синглетным кислородом (см. схему 3). При pH > 7 основной продукт окисления — dR-производное имидазолон **12**. Авторы работы⁶⁸ предположили, что **12** образуется в результате внутримолекулярной нуклеофильной атаки группы O₂ при атоме C(5) продукта **7** по атому C(8) пуринового кольца, однако подробного описания данного механизма не привели.⁶⁸

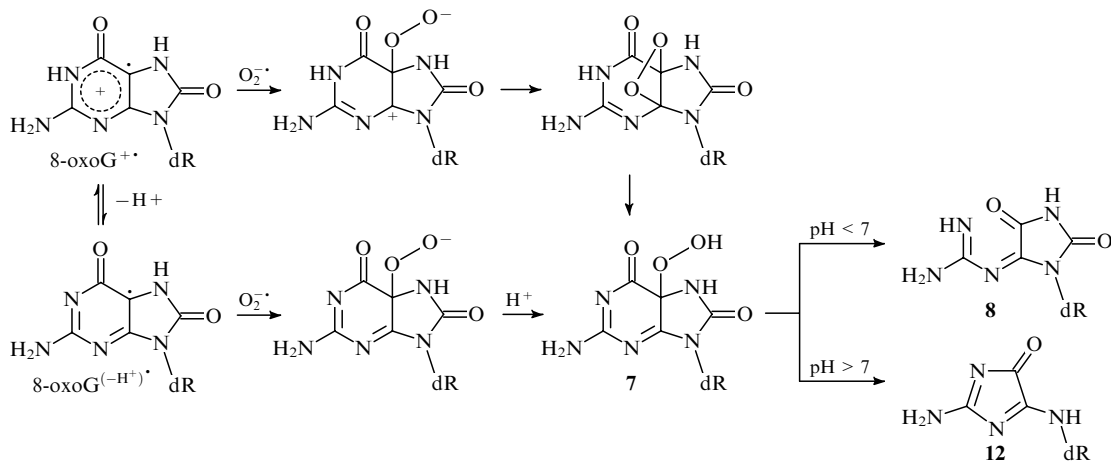
Таким образом, при взаимодействии супероксидного радикала с радикалами G^{(-H⁺)•} и 8-оксoG^{(-H⁺)•} основными продуктами являются dR-производные имидазолон и дегидрогуанидиногидантоина.

V. Окисление ДНК гидроксильными радикалами

Гидроксильный радикал — сильный окислитель. Он в состоянии отрывать атом водорода от связи C—H или присоединяться по связям C=C. Скорости реакций по двойным связям обычно выше, чем скорости реакций отрыва атома водорода от связи C—H.⁷⁰

Радикалы HO• взаимодействуют с НК и модельными соединениями с константами скорости, близкими к диффузионным. При этом преобладают процессы присоединения по двойным связям гетероциклов и отрыва атомов водорода от связей C—H остатка рибозы. Радикалы HO• взаимодействуют преимущественно с азотистыми основаниями: отношение образующихся радикалов гетероциклов к радикалам рибозы достигает 5–10.⁷⁰ Обычно возникновение радикалов гетероциклов в ходе дальнейших превращений приводит к необратимым модификациям последних. Некоторые из этих модификаций ослабляют гликозидную связь и вызывают образование апиридиновых/апуриновых сайтов, что сопровождается расщеплением рибозофосфатного остова в щелочных средах.

Схема 6



Структура и свойства радикалов гетероциклов изучены на примере свободных гетероциклов, нуклеозидов и нуклеотидов.^{71–75} Продукты окисления гетероциклических оснований гидроксильными радикалами определены при окислении модельных нуклеозидов,^{76–81} нуклеотидов,^{77–79} коротких олигонуклеотидов.^{77, 78} Большинство модифицированных оснований, формируемых при окислении модельных соединений, образуются и в случае окисления ДНК.^{78, 79, 82, 83}

1. Окисление гетероциклов в составе нуклеиновых кислот

а. Окисление остатка тимина

При взаимодействии остатка тимина с гидроксильными радикалами зарегистрировано образование трех радикалов с различными свойствами.⁷¹ Установлено, что гидроксильные радикалы присоединяются к атомам углерода C(5) или C(6) азотистого основания, при этом образуются радикалы (T5–OH)• и (T6–OH)• соответственно. Кроме того, наблюдается отрыв атома водорода от метильной группы у атома C(5) с образованием экзоциклического радикала (U–CH₂)• (схема 7).[†] Методом импульсного радиолиза в присутствии окислителей или восстановителей показано, что OH-радикал преимущественно присоединяется к атому C(5) гетероцикла (~56%), что обусловлено наиболее высокой электронной плотностью на этом атоме. По атому C(6) присоединяется ~35% гидроксильных радикалов, а в отрыве атома водорода от метильной группы участвуют <9% таких радикалов.⁷²

Образующиеся три типа радикалов различаются по своим окислительно-восстановительным свойствам.⁷² Радикал (T5–OH)• относится к α-аминоалкильному типу и обладает восстановительными свойствами. Радикал (U–CH₂)• также является восстановителем, но более слабым, чем (T5–OH)•. Радикал (T6–OH)•, наоборот, проявляет окислительные свойства.

[†] Напомним, что на схемах dR, если не оговорено особо, обозначает остаток 2'-дезоксирибозы в полинуклеотидной цепи.

При окислении (T5–OH)• образуется карбокатион, к которому быстро присоединяется гидроксил-анион, что приводит к количественному формированию dR-производных *цис*- или *транс*-5,6-дигидрокси-5,6-дигидротимина (14) (см. схему 7). Восстановление радикала (T6–OH)• приводит к dR-производному 6-гидрокси-5,6-дигидротимина (15), а окисление радикала (U–CH₂)• — к dR-производному 5-гидроксиметилурацила (16).

Поскольку окислительно-восстановительные свойства радикалов тимина различаются, в отсутствие экзогенных окислителей или восстановителей радикал (T5–OH)• может окисляться радикалом (T6–OH)• до карбокатиона с последующим образованием 14 и 15.

В аэробных условиях происходит присоединение молекулярного кислорода к радикалам (T5–OH)•, (T6–OH)• и (U–CH₂)• с диффузионной константой скорости. В результате появляются пероксидные радикалы, продуктами при восстановлении которых являются соответствующие dR-производные гидропероксидов: *транс*- и *цис*-формы 6-гидропероксида 5-гидрокси-5,6-дигидротимина (17) и 5-гидропероксида 6-гидрокси-5,6-дигидротимина (18), а также алкилгидропероксид 5-метил-2'-дезоксимурацила (19) (схема 8). Время жизни гидропероксидов при 37°C составляет от нескольких дней до одной недели.⁸⁴

В результате гидролитического распада гидропероксидов 17–19 образуются устойчивые продукты (см. схему 8).⁸⁵ Основной продукт разложения 6-гидропероксида тимина 17 — dR-производное 5-гидрокси-5-метилбарбитуровой кислоты (20), а продуктами превращения *цис*- и *транс*-изомеров 5-гидропероксида тимина 18 является преимущественно dR-производное 5-гидрокси-5-метилгидантоина (21). Образование *цис*- и *транс*-изомеров 5,6-дигидрокси-5,6-дигидротимина 22 объясняют протеканием конкурентной реакции диспропорционирования 5- и 6-пероксидных радикалов. В результате образуются высокореакционноспособные алкоксирадикалы, способные отрывать атом водорода от различных соединений, что и приводит к накоплению производного 22. Кроме того, в алкоксирадикалах может протекать реакция раскрытия пиримидинового кольца посредством расщепления связи C(5)–C(6). Дальнейшие превраще-

Схема 7

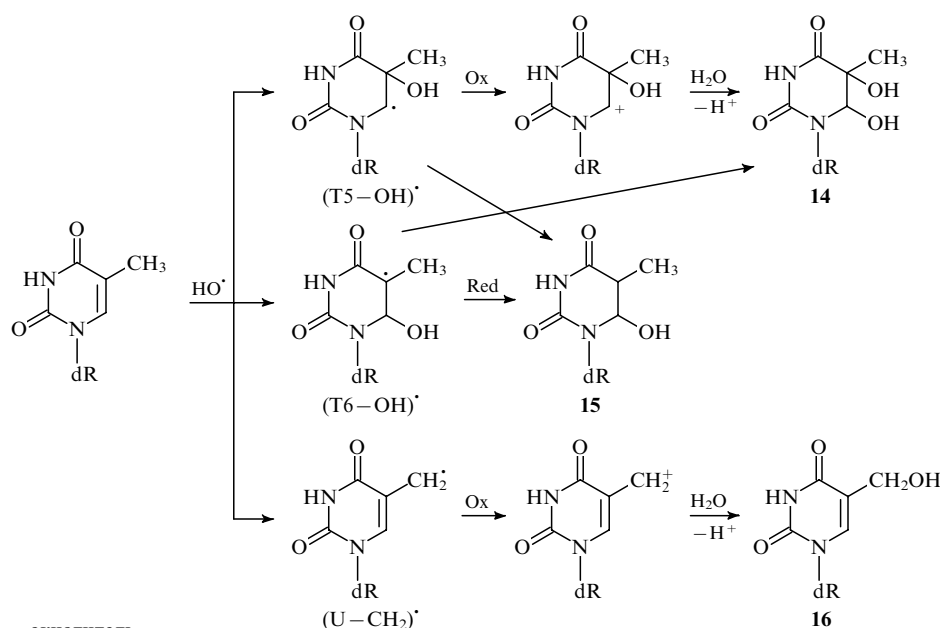
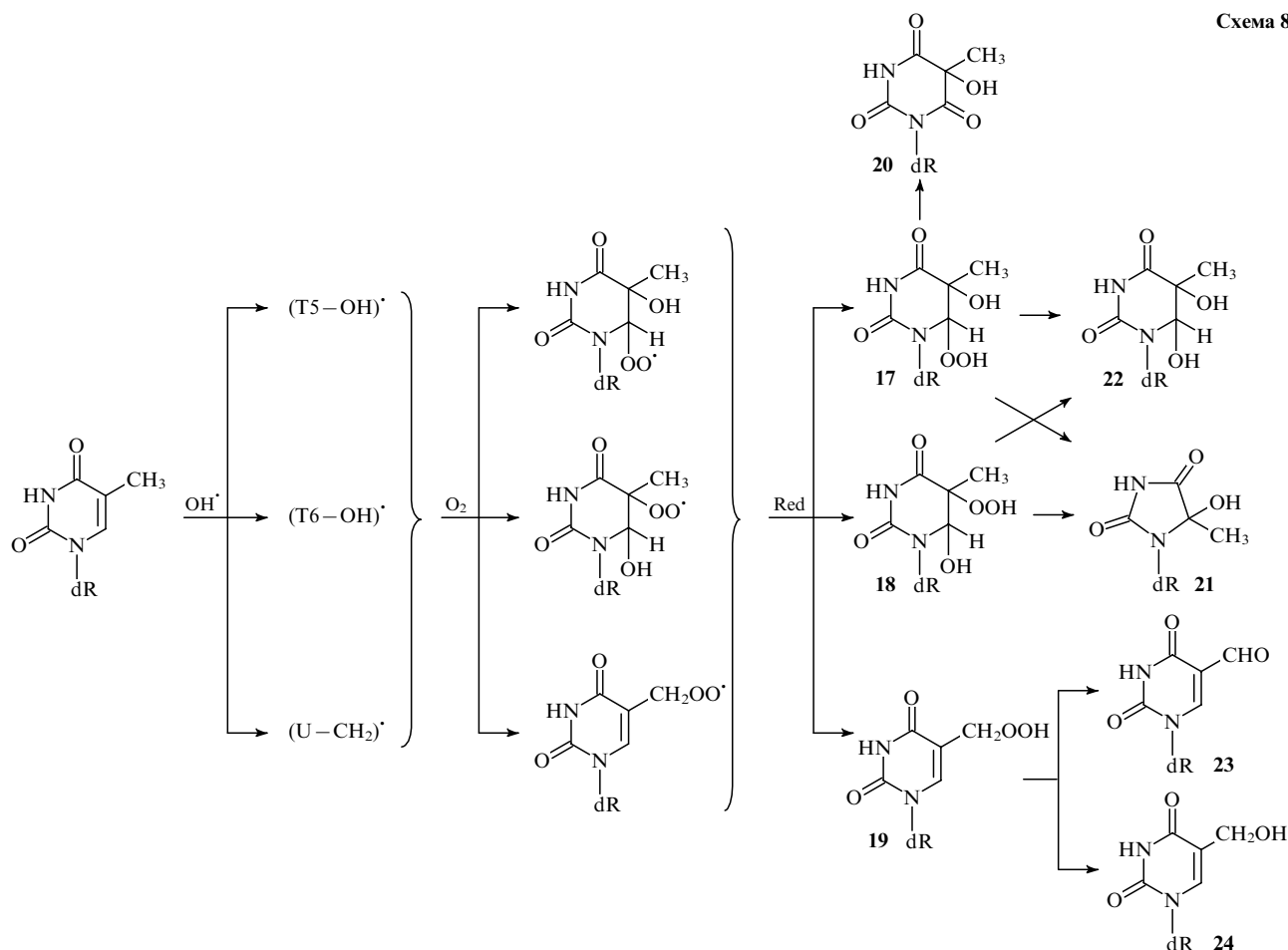


Схема 8



ния приводят либо к фрагментации с образованием производных мочевины, либо к замыканию цикла с образованием dR-производного 5-гидрокси-5-метилгидантоина **21**.

Вследствие разложения алкилгидропероксида 5-метил-2'-деоксиурацила **19** накапливаются два продукта: 5-формил-2'-деоксиурацил **23** и 5-гидроксиметил-2'-деоксиурацил **24** (см. схему 8).

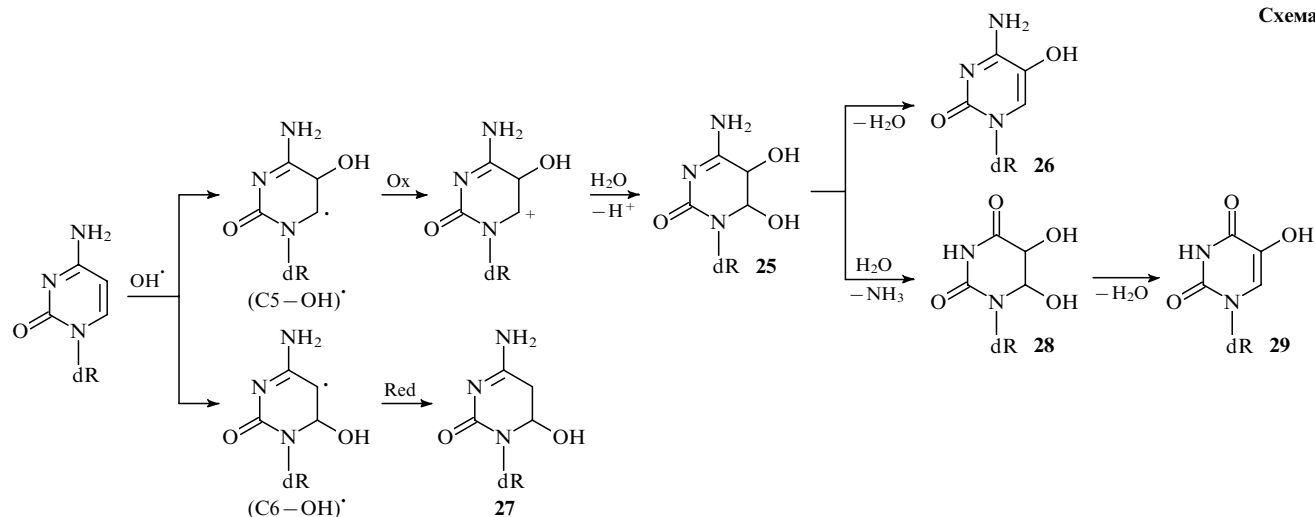
Таким образом, главными продуктами окисления остатка тимина под действием гидроксильных радикалов являются dR-производные 5,6-дигидрокси-5,6-дигидротимина, 5-гидроксиметилурацила, 6-гидрокси-5,6-дигидро-

тимина, 5-гидрокси-5-метилгидантоина и 5-гидрокси-5-метилбарбитуровой кислоты.

6. Окисление остатка цитозина

При взаимодействии гидроксильных радикалов с остатком цитозина, как и при взаимодействии с остатком тимина, происходит преимущественное присоединение OH-радикалов по атому C(5) гетероцикла — порядка 87% реакционных частиц. Только 10% OH-радикалов присоединяются по атому C(6) (схема 9).⁸⁶ Образующиеся радикалы двух типов

Схема 9



(C5—OH)[•] и (C6—OH)[•] по своим окислительно-восстановительным свойствам аналогичны радикалам остатка тимина (T5—OH)[•] и (T6—OH)[•]. Радикал (C5—OH)[•] обладает восстановительными свойствами, а радикал (C6—OH)[•] является окислителем.⁸⁶

Механизм окисления цитозина гидроксильными радикалами аналогичен механизму окисления тимина. При окислении $(C5-OH)^{\bullet}$ образуется карбокатион, присоединение гидроксил-аниона к которому приводит к образованию dR-производных *цис*- или *транс*-5,6-дигидрокси-5,6-дигидроцитозина (25). В свою очередь 25 может претерпевать дегидратацию с образованием dR-производных 5-гидроксцитозина (26) (см. схему 9).⁸⁷ В результате восстановления радикала $(C6-OH)^{\bullet}$ образуется dR-производное 6-гидрокси-5,6-дигидроцитозина (27). Кроме того, наблюдается реакция дезаминирования, в которой образуются dR-производные урацила: *цис*- или *транс*-5,6-дигидрокси-5,6-дигидроурацил (28) и 5-гидроксиурацил (29). Механизм дезаминирования окончательно не установлен.

В аэробных условиях происходит присоединение молекулярного кислорода к радикалам $(C5-OH)^\bullet$ и $(C6-OH)^\bullet$ с диффузионной константой скорости. В результате образуются пероксидные радикалы, при восстановлении которых появляются соответствующие dR-производные гидропероксидов: *транс*- и *цис*-формы 6-гидропероксида 5-гидроксис-5,6-дигидроцитозина (**30**) и 5-гидропероксид 6-гидроксис-5,6-дигидроцитозина (**31**) (схема 10).^{77, 80}

При разложении 5- и 6-гидропероксидов цитозина **30** и **31** в качестве основных продуктов образуются dR-производные 5-гидроксигидантоина (**32**) и *транс*-1-карбамоилимидазолидин-4,5-диола (**33**) (см. схему 10). Производное **32** образуется вследствие внутримолекулярной перегруппировки при разрыве связи C(5)–C(6), тогда как образование **33** можно объяснить разрывом связи C(4)–C(5). На одной из первых стадий окисления цитозина dR-производные 5- и 6-гидропероксидов подвергаются дезаминированию. При этом основ-

ным продуктом окисления является dR-изодиазуровая кислота (34). Следует отметить, что среди продуктов окисления остатка цитозина в аэробных условиях были обнаружены 25, 26, 28 и 29.^{77, 80} Образование этих продуктов можно объяснить повторной атакой радикала (C5—OH)′ гидроксильным радикалом, в результате которой образуется dR-производное 5,6-дигидрокси-5,6-дигидроцитозина (25), подвергающееся дегидратации или дезаминированию согласно схеме 9. Продуктами более глубокой деструкции остатка цитозина являются dR-формамид, биурет, dR-мочевина, щавелевая кислота и уреиды.³⁹

Таким образом, главными продуктами окисления остатка цитозина радикалами $\text{HO}^\bullet$ являются dR-производные 5,6-дигидрокси-5,6-дигидроцитозина, 5-гидроксицитозина, 6-гидрокси-5,6-дигидроцитозина, 5,6-дигидрокси-5,6-дигидроурацила, 5-гидроксиурацила, 5-гидроксигидантоина, *транс*-1-карбаомиллимидазолидин-4,5-диола и dR-изодиалуровая кислота.

в. Окисление остатка гуанина

Среди азотистых оснований гуанин подвергается наибольшему окислению как радикалами $\text{HO}\cdot$, так и другими окислителями, поскольку имеет самый низкий потенциал окисления среди других компонентов нуклеиновых кислот ($E_{\text{dG}/\text{dG}}^\circ = 1.29 \text{ В}$, $E_{\text{dA}/\text{dA}}^\circ = 1.42 \text{ В}$, $E_{\text{dC}/\text{dC}}^\circ = 1.6 \text{ В}$, $E_{\text{dT}/\text{dT}}^\circ = 1.7 \text{ В}$ при pH 7 (см.^{47, 48)}). В настоящее время установлены продукты окисления гуанина гидроксильными радикалами и механизмы их образования.^{78, 81, 85}

При взаимодействии с гуанином гидроксильные радикалы присоединяются преимущественно по атому C(4) (60–75%) и, в меньшей степени, по атому C(8) (~17%) пуринового кольца с образованием радикалов (G4–OH)[•] и (G8–OH)[•] соответственно (схема 11).⁷⁴

Образующиеся на первом этапе радикалы $(G4-OH)^\bullet$ и $(G8-OH)^\bullet$ имеют различную реакционную способность по

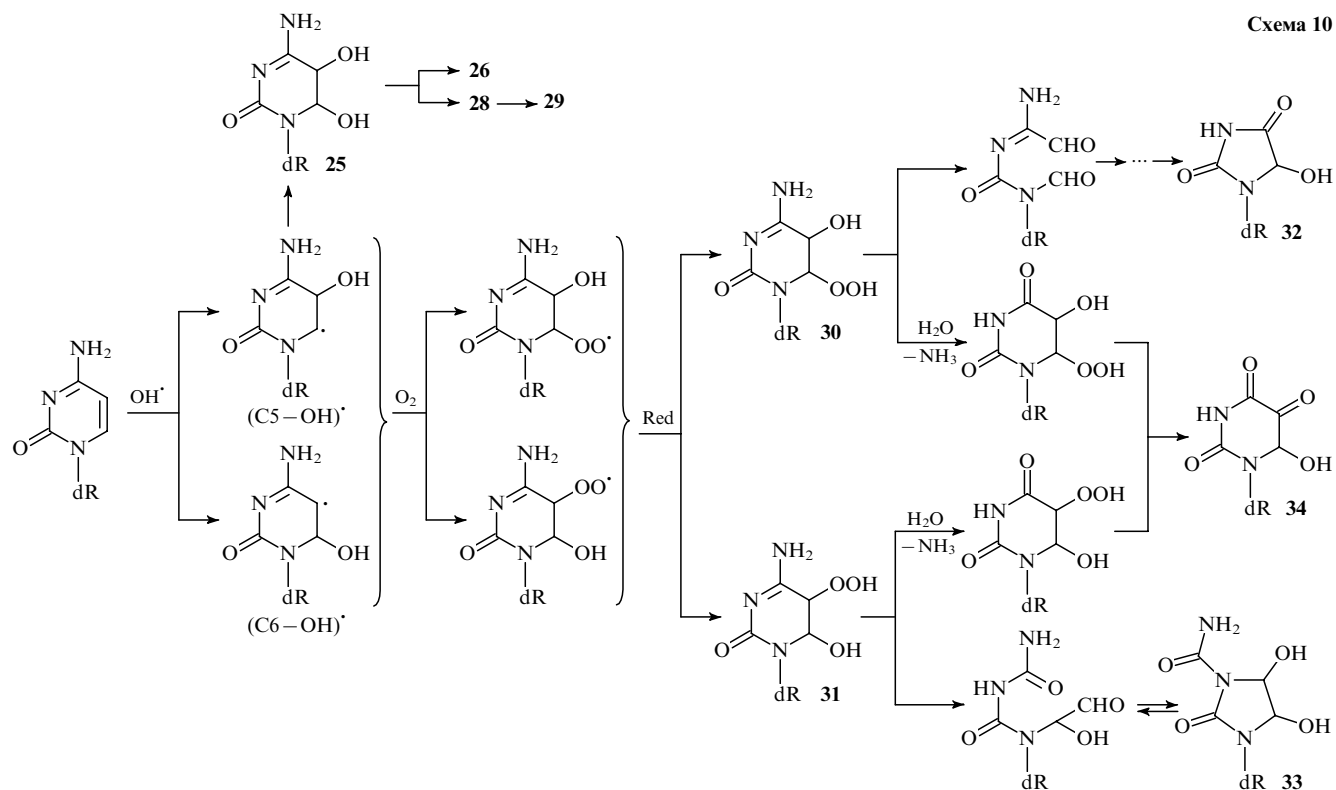
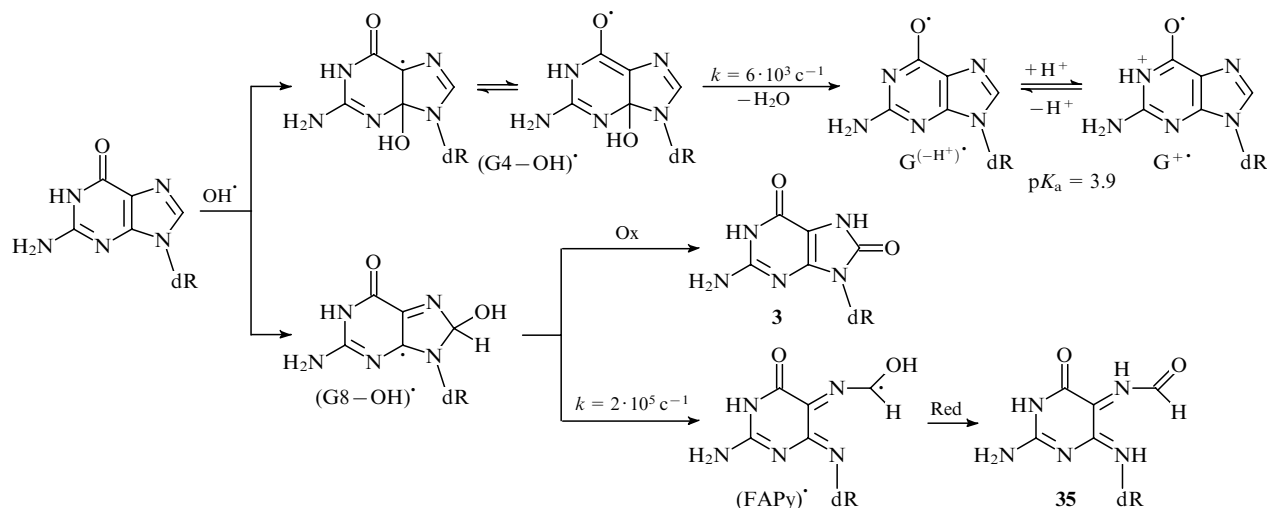


Схема 10

Схема 11



отношению к молекулярному кислороду, окислителям и восстановителям.⁷⁴ Так, радикал $(G4-OH)^\bullet$ проявляет окислительные свойства, например по отношению к N,N,N',N' -тетраметил- n -фенилендиамину и $[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$. Кроме того, он претерпевает медленную дегидратацию с образованием катион-радикала (или его депротонированной формы), обладающего более сильными окислительными свойствами. Образовавшиеся радикалы $G^{+\bullet}$ и $G^{(-H^+)^\bullet}$ практически не взаимодействуют с молекулярным кислородом ($k < 10^6$ (моль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ с $^{-1}$)), но при этом реагируют с высокими скоростями с супероксидным и другими радикалами. Превращения радикала $G^{(-H^+)^\bullet}$ под действием $O_2^\bullet$ приводят к образованию dR-производных имидазолон и дегидрогуанидиногидантоина (см. раздел IV).

В противоположность радикалу $G^{(-H^+)^\bullet}$ радикал $(G8-OH)^\bullet$ реагирует с молекулярным кислородом с диффузионной константой скорости ($k = 4 \cdot 10^9$ (моль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ с $^{-1}$)), а в отсутствие кислорода претерпевает быстрое раскрытие имидазольного цикла ($k = 2 \cdot 10^5$ с $^{-1}$) с образованием радикала (FAPy) $^\bullet$. Кроме того, радикал $(G8-OH)^\bullet$ проявляет восстанавливающие свойства по отношению к такому окислителю, как $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$. Превращения радикала $(G8-OH)^\bullet$ приводят к образованию dR-производных 8-оксо-7,8-дигидрогуанина и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формамидопиримидина (35) (см. схему 11). В качестве окислителя в водных растворах чаще всего выступает молекулярный кислород, в результате его взаимодействия с радикалом $(G8-OH)^\bullet$ образуются супероксидный радикал и dR-производное 8-оксо-7,8-дигидрогуанина.

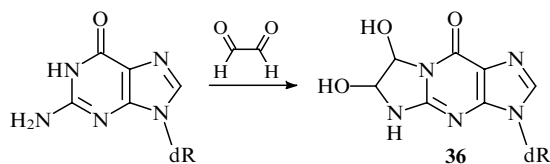
Распределение различных типов продуктов окисления остатка гуанина зависит от природы заместителя dR и от способа генерирования OH-радикалов.^{78,85} Так, при γ -облучении главными продуктами окисления 2'-дезоксигуанозина были производные оксозолон 13 и имидазолон 12. При этом образование продукта 2 было незначительным ($< 3\%$).⁸⁵ Однако при генерировании гидроксильных радикалов по реакции Фентона в системе $Fe^{2+} - ЭДТА/H_2O_2$ выход 2 был значительно выше (достигал 30%).⁷⁸ При окислении двухцепочечной ДНК наблюдается другое распределение продуктов модификации гуанина. При γ -облучении доля соединений 12 и 13 составляла $\sim 30\%$ в общем выходе продуктов окисления гуанина, тогда как выход соединения 2 составил $\sim 50\%$. Кроме того, наблюдали образование dR-производного 35 со значительным выходом ($\sim 20\%$).⁸⁸ При

генерировании гидроксильных радикалов по реакции Фентона главными продуктами окисления гуанина были 2 и 35.⁷⁸

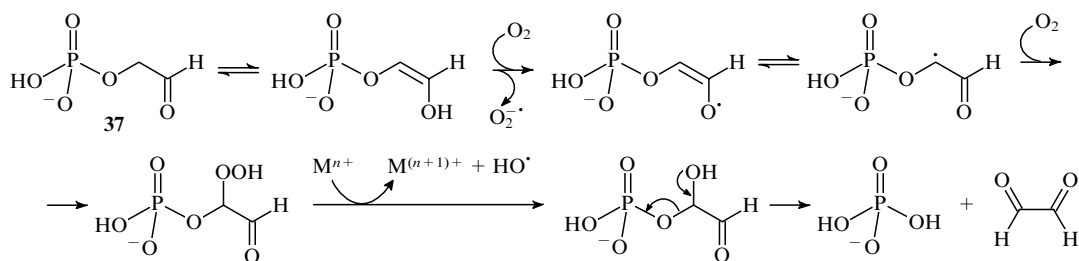
Следует рассмотреть другой тип модификации гуанина. Одним из продуктов окисления 2'-дезоксирiboзы является 3'-фосфогликольальдегидный фрагмент (более подробно механизм окисления 2'-дезоксирiboзы гидроксильными радикалами рассмотрен ниже), который может взаимодействовать с остатком гуанина с образованием 1,N(2)-глиоксалевого аддукта гуанина (36) (схема 12). Подобный тип модификации гуанина был впервые установлен авторами работы⁸⁹ при окислении ДНК гидроксильными радикалами, генерируемыми по реакции Фентона в системе $Fe^{2+} - ЭДТА/O_2$. Показано, что в результате окисления ДНК в данной системе образуется тот же продукт модификации гуанина, что и при взаимодействии гуанина с чистым глиоксалем. Позже было установлено, что при взаимодействии 2-фосфогликолевого альдегида 37 с гуанином также формируется глиоксальный аддукт гуанина.⁹⁰

Первоначально авторы работы⁹⁰ предположили, что образование глиоксала включает стадию окисления альдегида 37 молекулярным кислородом по аналогии с механизмом образования глиоксала из гликолевого альдегида⁹¹ (см. схему 12, механизм I). В результате такого окисления образуется гидроксильный радикал. Однако исследования методом ЭПР показали, что превращения 37 приводят к значительно более низкому выходу гидроксильных радикалов, чем аналогичные превращения гликолевого альдегида.⁹⁰ Кроме того, было показано, что, в отличие от взаимодействия гликолевого альдегида с ДНК, при взаимодействии 37 с ДНК добавление в реакционную смесь сорбита или этанола, являющихся ловушками гидроксильных радикалов, не влияло на образование глиоксалевого аддукта гуанина. Установлено, что образование dR-производного 36 не зависит и от присутствия в реакционной смеси молекулярного кислорода. На основании этих данных предложен нерадикальный механизм образования глиоксала из 37, включающий фосфат-фосфоновую перегруппировку (см. схему 12, механизм II). В работах^{92,93} приведены данные о протекании реакции обратного типа. Так, добавление глиоксала к диэфирам фосфоновой кислоты приводило к образованию 37. Таким образом, авторы статьи⁹⁰ предположили, что полученные ими данные свидетельствуют об обратимости взаимодействия глиоксала с диэфирами фосфоновой кислоты в водных растворах.

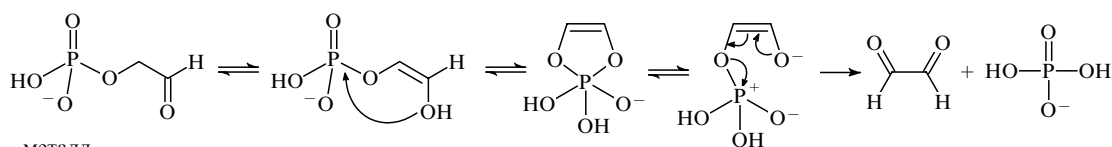
Схема 12



Механизм I

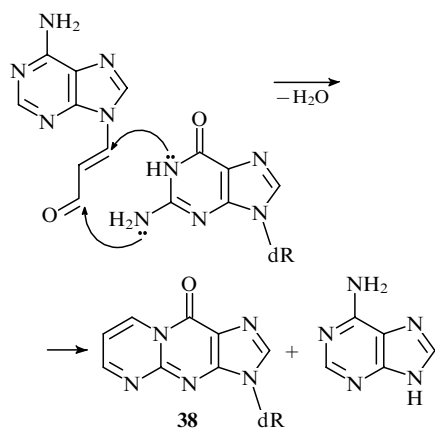


Механизм II



M — металл.

Другим возможным продуктом модификации остатка гуанина при окислении 2'-дезоксирибозы является 1,N(2)-пропеновый аддукт гуанина (**38**).⁹⁴



При окислении дезоксирибозы по атому C(4') гидроксильными радикалами одним из продуктов является пропеналь гетероцикла, обладающий электрофильными свойствами. Известно, что наличие пропенала оснований в микролярных концентрациях летально для клеток,⁹⁵ но механизм его генотоксичности изучен мало. В работе⁹⁴ показано, что при взаимодействии пропенала аденина с ДНК селективно образуется **38**. Его накопление наблюдали и при обработке ДНК такими антибиотиками, как Fe(II)-блеомицин и калихеамицин, которые приводят к окислению дезоксирибозы по атому C(4') с образованием пропеналей оснований.^{96,97}

Таким образом, главными продуктами окисления остатка гуанина гидроксильными радикалами являются dR-производные имидазолон, оксазолон, 8-оксо-7,8-дигидрогуанина и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формамидопиримидина. Кроме того, возможно образование 1,N(2)-глиоксального и 1,N(2)-пропенового аддуктов гуанина.

г. Окисление остатка аденина

При взаимодействии с аденином и его аналогами OH-радикал присоединяется преимущественно по двойной связи C(4)=C(5) пуринового кольца к атому углерода в положении 4 (~80%) и в меньшей степени по двойной связи N(7)=C(8) к атому углерода в положении 8 (~15%).⁷⁵ В результате образуются радикалы (A4-OH)[•] и (A8-OH)[•] (схема 13).

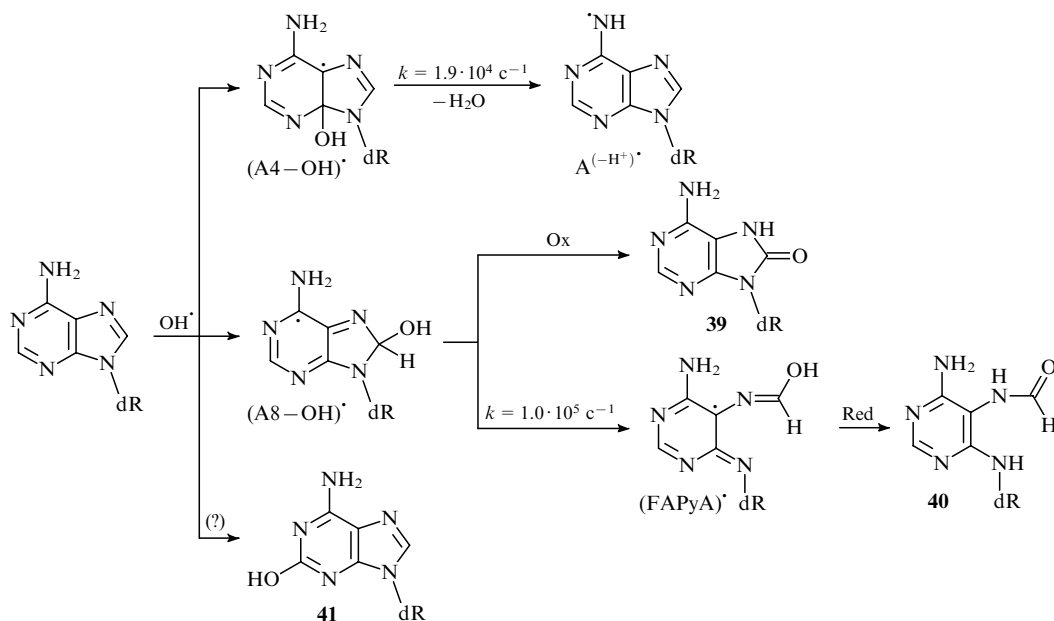
Радикал (A8-OH)[•] обладает восстанавливающими свойствами. Его окисление приводит к образованию dR-производного 8-оксо-7,8-дигидроаденина **39**. В отсутствие окислителей (A8-OH)[•] претерпевает внутримолекулярное раскрытие имидазольного цикла с образованием радикала (FAPyA)[•], при восстановлении которого образуется dR-производное 4,6-диамино-5-формамидопиримидина **40**. Активация процесса раскрытия цикла происходит в присутствии как H⁺, так и OH⁻ (см.⁷⁵).

Радикал (A4-OH)[•] является слабым окислителем, но после дегидратации образуется радикал A^(-H⁺), обладающий значительно более сильными окислительными свойствами. Так, он может окислять радикал (A8-OH)[•], при этом образуются неокисленный аденин и **39**. Отщепление молекулы воды и образование A^(-H⁺) тормозится в кислых средах.

Следует отметить, что в ряде работ зафиксировано образование dR-производного 2-гидроксиаденина или изогуанина (**41**) при генерировании гидроксильных радикалов в системе Fe²⁺–ЭДТА/O₂ (см. схему 13).^{76,79} Однако механизм этой реакции не установлен.

Распределение различных типов продуктов окисления остатка аденина зависит от способа генерирования OH-радикалов. В системе Fe²⁺–ЭДТА/O₂ не наблюдали образования dR-производного **39**,⁷⁶ тогда как при γ-облучении оно наряду с **40** — основные продукты окисления аденина.⁹⁸ Образование **39** наблюдали и при обработке 2'-дезоксиаденозина или ДНК пероксиазотистой кислотой O=N–O–OH, при разложении которой образуется гидроксильный радикал.⁹⁹

Схема 13



Таким образом, при окислении аденина гидроксильными радикалами основными продуктами являются dR-производные 4,6-диамино-5-формамидопиримидина, 8-оксо-7,8-дигидроаденина и в некоторых случаях 2-гидроксиаденина.

2. Окисление углеводных фрагментов в составе нуклеиновых кислот

При взаимодействии с рибозофосфатным остовом ДНК гидроксильные радикалы отрывают атом водорода от различных положений 2'-дезоксирiboзы.^{35, 39} В результате образуются C(1')-, C(2')-, C(3')-, C(4')- и C(5')-радикалы. В анаэробных условиях после окисления таких радикалов и присоединения молекулы воды появляются соответствующие гидроксипроизводные 2'-дезоксирiboзы (схема 14).

В анаэробных условиях 1'-гидроксипроизводное нестабильно и быстро высвобождает гетероцикл (ВН). В результате образуется производное лактона **42**, которое остается связанным с сахарофосфатным остовом ДНК. Наличие такого повреждения может приводить к расщеплению ДНК при нагревании или в кислой среде.

Конечным продуктом окисления по атому в положении 2' как в анаэробных, так и в аэробных условиях является четырехуглеродный фрагмент дезоксириboзы (эритрозы) **43**, но механизм его образования предложен только для аэробных условий.³⁵ В щелочных условиях может происходить ретроальдовый распад с образованием 3'- и 5'-фосфогликолевых альдегидов **44**.

Окисление по атому углерода в положении 3' приводит к образованию соответствующего 3'-гидроксипроизводного, которое нестабильно и в результате нескольких процессов β-элиминирования отщепляет 3'- и 5'-фосфатные «концы» и свободный гетероцикл. Окисленный остаток дезоксириboзы выделяется в виде 2-метилфуран-3(2H)-она (**45**).

После отщепления атома водорода от атома C(4') и образования соответствующего 4'-гидроксипроизводного происходит высвобождение гетероциклического основания. При этом остаток дезоксириboзы **46**, окисленный по атому в положении 4', остается связанным с цепью ДНК. В щелочных условиях происходит отщепление 3'-концевого фраг-

мента. Во другом фрагменте цепи остается продукт окисления сахара — 3-гидрокси-5-оксоциклопент-1-ен (**47**).

При окислении по атому углерода в положении 5' в анаэробных условиях образуется 5'-альдегидонуклеозид (**48**).

В присутствии молекулярного кислорода происходит присоединение O₂ к радикалу пентозы и образуются соответствующие пероксидные радикалы **49–53** (см. схему 14).

При восстановлении радикала **49** образуется алкилгидропероксид, при дальнейшем превращении которого, видимо по механизму Рассела,[‡] появляется алкокси-радикал. Высвобождение гетероцикла сопровождается образованием производного лактона **42**, связанного с ДНК.

При окислении по атому C(2') дезоксириboзы пероксидный радикал **50** разлагается по механизму Рассела с образованием алкокси-радикала. Последний подвергается фрагментации с разрывом связи C(1')–C(2'), после которой происходят повторное присоединение молекулы кислорода, элиминирование гетероцикла и молекулы CO₂. Появление в итоге производного эритрозы **43** не сопровождается расщеплением нуклеиновой кислоты в физиологических условиях.

При восстановлении радикала **51** образуется гидропероксид, подвергающийся внутримолекулярной перегруппировке Криге, которая приводит к разрыву цепи ДНК с образованием 5'-фосфатных и 3'-фосфогликоль-альдегидных «концов» **44**. Выделяющиеся гетероциклы содержат остаток акриловой кислоты (**54**).

При окислении по атому углерода в положении 4' дезоксириboзы пероксидный радикал **52** принимает электрон от восстановителя и превращается в нестабильный гидропероксид. Предполагается, что последний подвергается перегруппировке Криге. В ходе этой перегруппировки атом C(3') мигрирует от атома C(4') на атом кислорода пероксида, что сопровождается гетеролитическим разрывом связи O–O. Атом углерода в положении 2', активированный появлением карбонильной группы при атоме C(4'), может депротонироваться, инициируя реакцию элиминирования фосфата от атома C(3'), образование пропеналя гетероцикла **55** и фосфогликолевой кислоты **56** на 5'-конце разрыва цепи ДНК.

‡ Подробнее об этом механизме см. работу³⁹.

Схема 14

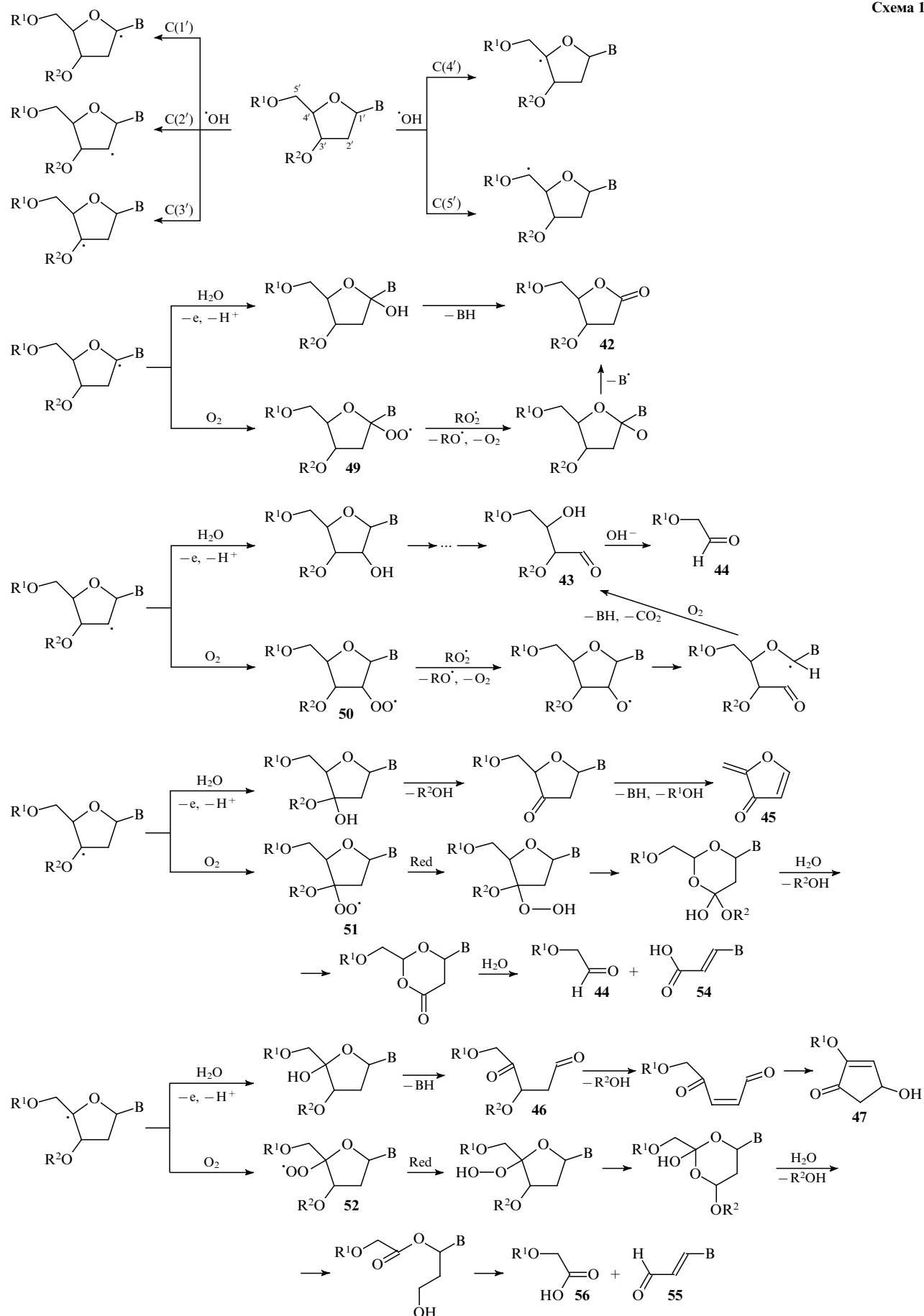
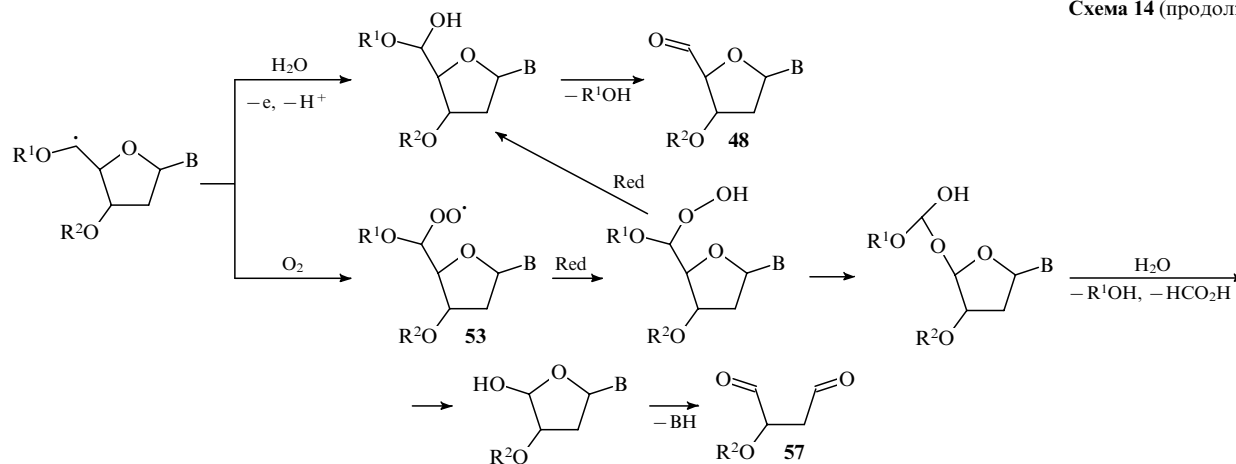


Схема 14 (продолжение)



Продуктами окисления по атому C(5') дезоксирибозы являются 5'-альдегидонуклеозид **48** и тетраальдоза **57** в свободном состоянии либо связанная с ДНК. Тетраальдоза образуется в результате внутримолекулярной перегруппировки Криге, затем происходит элиминирование 5'-концевого фрагмента, содержащего 3'-формилфосфатную группу, которая спонтанно гидролизует с образованием свободного 5'-фосфатного конца. В результате восстановления исходного гидропероксида образуется 5'-гидроксипроизводное. После элиминирования фосфоэфирного фрагмента из положения 5' образуется 5'-альдегидонуклеозид.

Следует отметить, что при взаимодействии с двухцепочечной ДНК гидроксильные радикалы отрывают атом водорода от атомов углерода в положениях 1'–5' рибозы с различной эффективностью. Это объясняется тем, что в структуре двойной спирали ДНК доступность различных атомов водорода рибозы для взаимодействия с растворителем и, следовательно, с гидроксильными радикалами различна.

Так, в работе¹⁰⁰ показано, что гидроксильный радикал, взаимодействуя с двухцепочечной ДНК, отрывает атом водорода от атомов углерода 2'-дезоксирибозы в следующем порядке: 5'-Н > 4'-Н > 3'-Н ≈ 2'-Н ≈ 1'-Н. В качестве источника ОН-радикалов была выбрана система Fe^{2+} – ЭДТА/ H_2O_2 /аскорбиновая кислота, так как ее наиболее часто используют в методе футпринтинга связанных с ДНК белков.¹⁰¹ В качестве субстратов¹⁰⁰ использовали синтетические дуплексы ДНК, в которых один из нуклеотидов был специфическим образом помечен дейтерием. Например, все остатки нуклеотида тимина в дуплексе ДНК содержали дейтерий в 4'-положении 2'-дезоксирибозы, тогда как во всех остальных положениях этого и трех других нуклеотидов были атомы водорода. Степень расщепления ДНК по дейтерированным нуклеотидам сравнивали с расщеплением по не меченным дейтерием нуклеотидам и с контрольным дуплексом ДНК, не содержащим атомов дейтерия. При анализе данных учитывали кинетический изотопный эффект ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}} > 1$). Кроме того, из рентгеноструктурных данных для В-формы ДНК авторы рассчитали относительную доступность для растворителя различных протонов 2'-дезоксирибозы (табл. 1).

Из представленных данных видно, что эффективность взаимодействия различных атомов водорода рибозы с гидроксильными радикалами коррелирует с их доступностью по отношению к молекулам растворителя. Наиболее

подвержены атаке ОН-радикалами атомы водорода при атомах C(5') и C(4'), поскольку именно они в наибольшей степени доступны для молекул растворителя.

Особый интерес представляют повреждения, появляющиеся при окислении как углеводного фрагмента, так и азотистого основания. Так, C(5')-радикал дезоксирибозы может взаимодействовать с атомом C(8) пуринового основания, в результате образуются C(5')–C(8)-цикло-2'-дезоксирибопурины **58** и **59** (схема 15). Появление циклопуриновых производных наблюдается при γ -облучении^{102, 103} и при генерировании гидроксильных радикалов по реакции Фентона.^{76, 78} Возможно и образование циклопиримидиновых производных. Например, авторами работы⁸⁰ при окислении 2'-дезокситидина зафиксировано образование C(5')–C(6)-цикло-5-гидрокси-5,6-дигидро-2'-дезоксисуридина **60**. Как и в случае с циклопуриновыми производными, на первом этапе C(5')-радикал дезоксирибозы взаимодействует с атомом углерода в положении 6 пиримидинового основания с образованием радикала (5'–6-cyclo-C'). После присоединения молекулы кислорода к атому в положении 5 пиримидинового цикла получается пероксидный радикал, дальнейшие превращения которого приводят к образованию соединения **60** (см. схему 15).

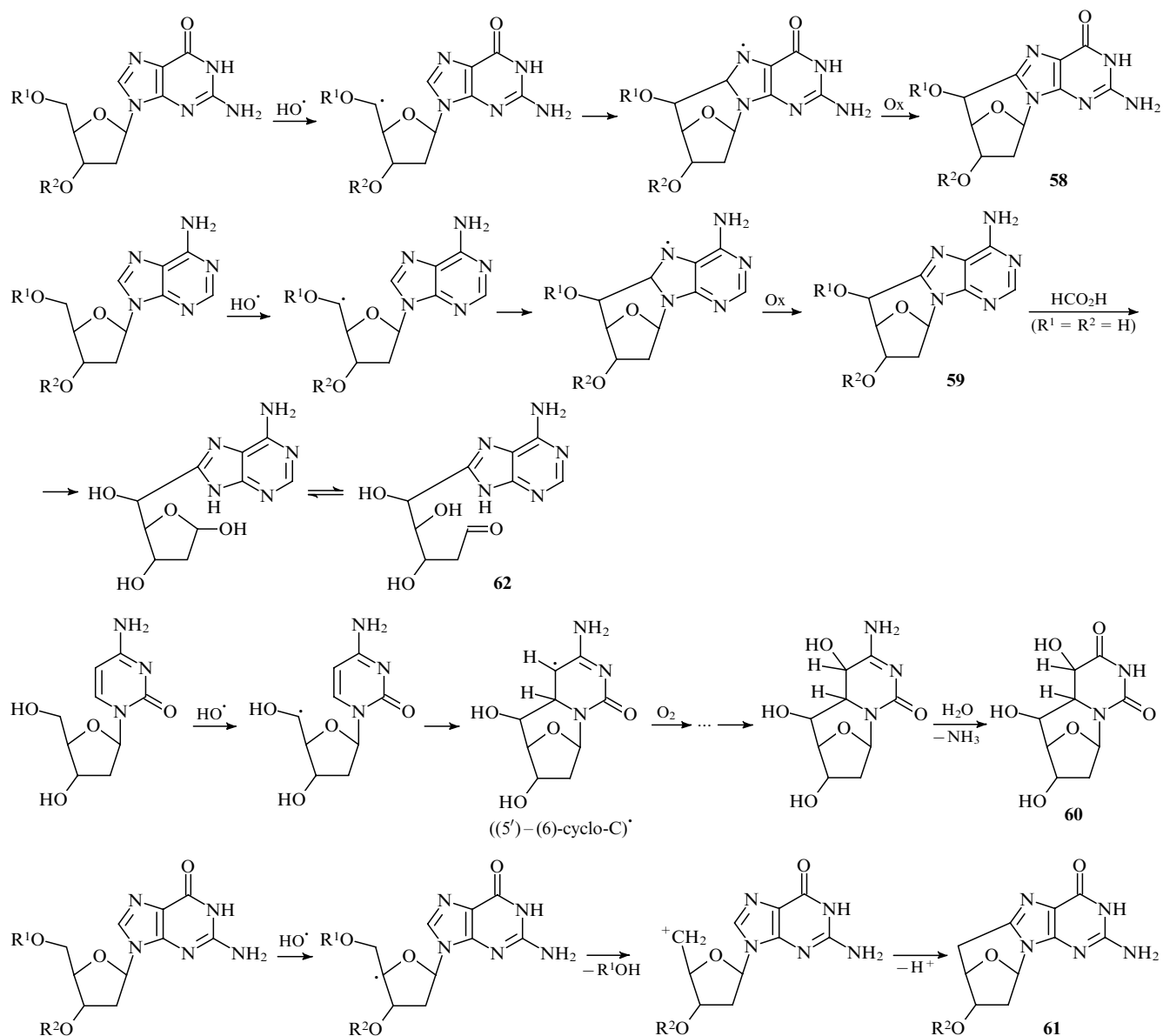
Следует отметить, что в работе⁷⁸ также наблюдали образование другого циклического производного гуанина — C(5')–C(8)-цикло-2',5'-дидезоксигуанина **61** (см. схему 15). Данное соединение образуется при отрыве атома водорода

Таблица 1. Относительные эффективности отрыва атома водорода гидроксильными радикалами от остатка 2'-дезоксирибозы в двухцепочечной ДНК и доступности атомов водорода для растворителя.¹⁰⁰

Относительный параметр, %	Положение атома углерода				
	5' + 5''	4'	3'	2' + 2''	1'
Эффективность взаимодействия с ОН-радикалами	57 ± 10	22 ± 6	17 ± 5	13 ± 3	11 ± 4
Доступность для растворителя	46	28	14	11	1

Примечание. Расчет проведен с использованием рентгеноструктурных данных для В-формы ДНК; двумя штрихами обозначены вторые атомы водорода при атомах углерода C(2) и C(5).

Схема 15



от атома в положении 4' дезоксирибозы и последующем элиминировании 5'-фосфатной группы.

На примере C(5')—C(8)-цикло-2'-дезоксиаденина показано, что с формированием связи C(5')—C(8) значительно повышается стойкость C(1')—N(9)-гликозидной связи к кислотному гидролизу (см. схему 15).¹⁰⁴ Так, было отмечено, что по сравнению с 2'-дезоксирiboаденином скорость гидролиза гликозидной связи уменьшается в ~40 раз. При этом наблюдали образование 5-(6-амино-9H-пурин-8-ил)-2-дезоксипентозы **62**.

С учетом изложенного выше можно сделать заключение, что при взаимодействии гидроксильных радикалов с рибозо-фосфатным остовом ДНК происходит отрыв атомов водорода от разных положений 2'-дезоксирибозы. Вследствие различных перегруппировок в составе образовавшихся радикалов в большинстве случаев происходит разрыв цепи НК. В аэробных условиях основными продуктами окисления углеводного фрагмента являются производные лактона и эритрозы, фосфогликолевый альдегид, фосфогликолят, пропеналь и акрилат основания, тетраальдоза и 5'-альдегидонуклеозид. Возможно также образование циклических

производных: C(5')—C(8)-цикло-2'-дезоксирибопуринов и C(5')—C(8)-цикло-2'-дезоксирибопиримидинов, C(5')—C(8)-цикло-2',5'-дидезоксигуанина. При взаимодействии гидроксильных радикалов с двухцепочечной ДНК скорость отрыва атомов водорода от 2'-дезоксирибозы уменьшается в ряду 5'-H > 4'-H > 3'-H ≈ 2'-H ≈ 1'-H и напрямую зависит от доступности для растворителя.

VI. Окисление ДНК высоковалентными оксокомплексами металлов

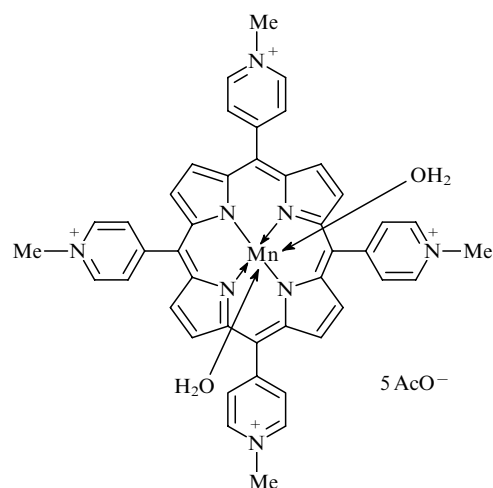
Как упоминалось выше, восстановление кислорода ионами металлов переменной валентности может происходить с предварительным координированием молекул O₂ или частиц, соответствующих их частичному восстановлению. В результате формируются оксокомплексы металлов, находящихся в высоковалентных состояниях, способные селективно окислять различные органические субстраты. Оксокомплексы металлов играют важнейшую роль в ферментативном окислении. Алканомоноксигеназы, такие как цитохром P450 и метаномоноксигеназа, способны эффек-

тивно катализировать гидроксирование алканов в мягких условиях с высокой селективностью. Еще важнее то, что подобные ферменты осуществляют регио- и стереоселективное внедрение атома кислорода окислителя в неактивированные связи C—H различных соединений в одну стадию. Данные природные ферментативные системы пока лучшие в отношении как скорости, так и селективности окисления.

В настоящее время проводят исследования различных катализаторов на основе оксокомплексов металлов.¹⁰⁵ Наиболее детально изучены процессы окисления ДНК комплексами порфирина—марганец(III), блеомицин—железо(II) и 1,10-фенантролин—медь(I).

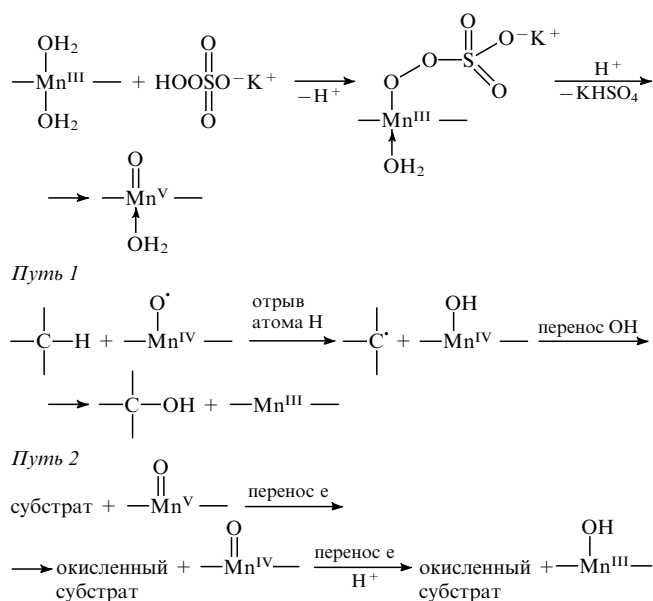
1. Окисление ДНК мезо-тетракис(*N*-метилпиридин-4-ил)порфирином марганца(III)

В работах Меньера с соавт.^{23, 24, 106–118} в качестве окисляющего агента использовали дигидрат-мезо-тетракис-(*N*-метилпиридин-4-ил)порфирина марганца(III) (Mn-TMPyP).



Это соединение активировали с помощью KHSO_5 , превращая в высоковалентную форму $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$ (схема 16).

Схема 16



Процесс окисления субстратов марганцем в такой форме может протекать по двум путям (см. схему 16): внедрение атома кислорода по связи C—H (остаток дезоксирибозы в

случае ДНК); отрыв электрона от субстратов (остаток гуанина в ДНК).¹⁰⁷

Окисление ДНК оксокомплексом $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$ зависит от нуклеотидного состава ДНК и определяется типом ее связывания с порфирином. Авторы работы¹⁰⁷ условно выделили три возможных пути окисления:

- 1) гидроксирование по атому C(5') остатка дезоксирибозы;
- 2) гидроксирование по атомам C(1') и C(4') остатка дезоксирибозы;
- 3) окисление остатка гуанина.

Гидроксирование по атому C(5') дезоксирибозы происходит в областях ДНК, богатых А/Т, когда порфирин располагается в малой бороздке ДНК. Было показано, что Mn-TMPyP имеет высокое сродство к тринуклеотидной последовательности, содержащей только пары А·Т, так называемому (А·Т)₃-сайту.^{108, 109} Связывание порфирина марганца в малой бороздке в (А·Т)₃-сайте приводит к сближению окисляющей частицы $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$ и C(5')-атома 2'-дезоксирибозы, располагающейся на 3'-конце последовательности (А·Т)₃. Таким образом, высокоспецифичная реакция гидроксирования по атому C(5') дезоксирибозы обусловлена высоким сродством Mn-TMPyP к сайту (А·Т)₃ и сближением реакционного центра со связью C—H.^{110–112}

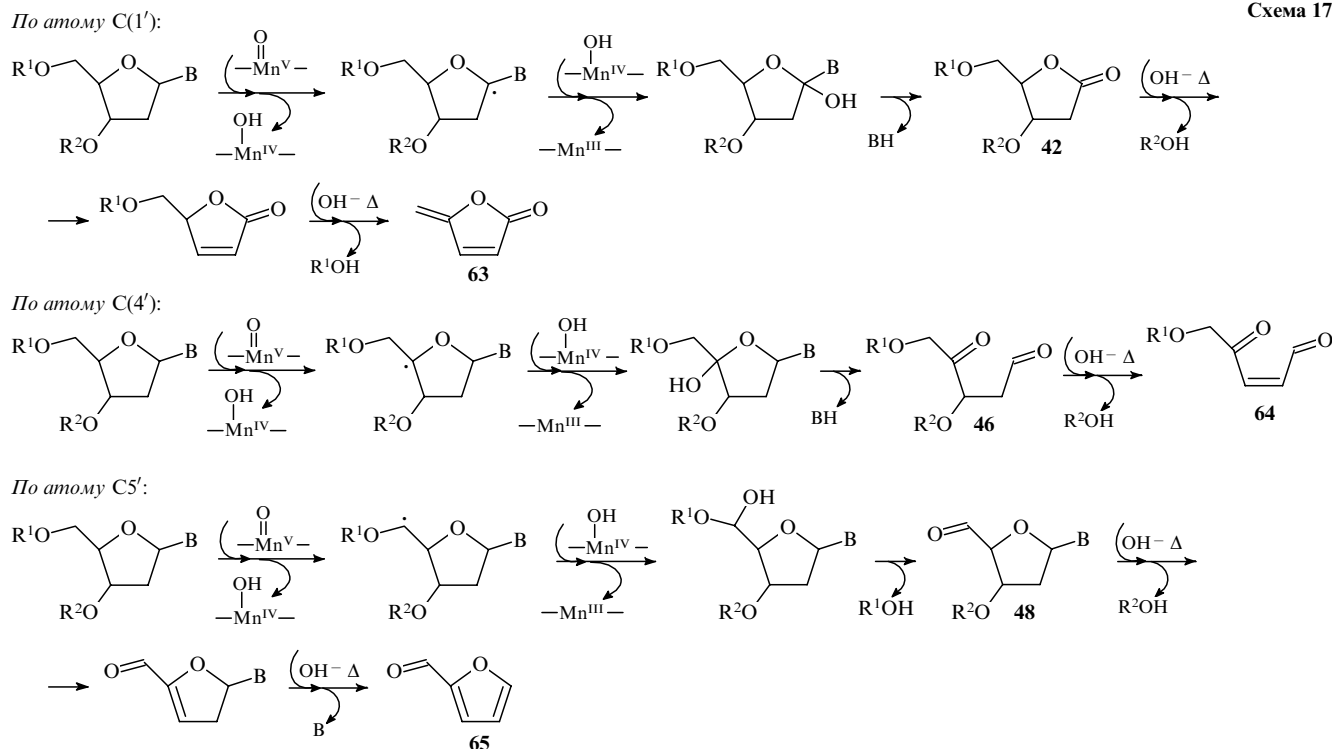
В областях ДНК, богатых G/C, связывание Mn-TMPyP в малой бороздке становится невозможным. Это связано с тем, что аминогруппы гетероциклов, располагающиеся в малой бороздке, мешают укладке молекул порфирина. Наличие оксогруппы в аксиальном положении макроцикла порфирина также препятствует его интеркаляции между парами оснований в ДНК. В связи с этим в областях ДНК, богатых G/C, наблюдали гидроксирование по атому углерода в положении 1' дезоксирибозы.¹¹³ Возможность окисления по атому C(1') в двухцепочечной ДНК до конца не выяснена, поскольку атом углерода в положении 1' расположен глубоко в малой бороздке и его пространственное сближение с группой $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$ ограничено. Следует отметить, что при окислении коротких дуплексов ДНК наблюдали заметное гидроксирование по атому C(1') концевой нуклеотида.¹⁰⁷ Кроме того, в этом случае наблюдали также гидроксирование по атому C(4') дезоксирибозы концевой нуклеотида. Подобный «концевой» эффект может быть следствием частичного стэкинга концевой пары нуклеотидов короткого дуплекса и макроцикла порфирина, т.е. следствием пространственного сближения окисляющей группы и субстрата.¹⁰⁷

Механизмы гидроксирования по атомам углерода в положениях 1', 4' и 5' дезоксирибозы отражены на схеме 17. При окислении по атому C(1') и после обработки OH^- детектировали 5-метиленфуран-2(5H)-он (63), при окислении по атому C(4') — соединение 64, при окислении по атому C(5') — фурфурол 65.

Третий тип окисления ДНК высоковалентным комплексом порфирина марганца включает отрыв электрона от остатка гуанина.^{23, 24, 114} Для выяснения механизма окисления гуанина авторы использовали набор субстратов с постепенным усложнением структуры: дезоксигуанозин,¹¹⁵ динуклеотидмонофосфат^{116, 117} и короткие дуплексы олигодезоксирибонуклеотидов.¹¹⁸ На основании данных масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР и экспериментов с меченой водой H_2^{18}O авторы предложили следующий механизм окисления остатка гуанина оксокомплексом марганца.

На первой стадии происходит отрыв двух электронов и одного протона от гуанина, в результате образуется катион гуанина ($\text{G}^{(-\text{H}^+)}^+$). Положительный заряд локализуется на атоме углерода в положении 5 гетероцикла. Образовавшийся катион гуанина подвергается нуклеофильной атаке

Схема 17



либо молекулой воды, либо молекулой перексосульфата. При этом образуются два типа промежуточных соединений: 5-гидроксигуанин (G5–OH) и 5-перексосульфат гуанина. После повторной атаки водой по атомам C(6) и C(8) гетероцикла происходит раскрытие пиримидинового цикла по связи C(5)–C(6) и последующее декарбоксилирование. При повторном окислении комплексом $Mn^V=O$ образуются dR-производные гуанидиногидантоина **6** и дегидрогуанидиногидантоина **8**. Гидролиз гуанидиногидантоина приводит к накоплению dR-производного имидазолон **12**. Повторное окисление dR-производного дегидрогуанидиногидантоина **8** комплексом $Mn^V=O$ приводит к накоплению dR-производного парабановой кислоты **9** (схема 18).

Следует отметить, что при окислении концевго гуанина в коротком дуплексе ДНК наблюдали образование dR-производного спироиминодигидантоина **6** (схема 19).¹⁰⁷ Данное повреждение гуанина не детектировали при окислении внутрипочечного гуанина. Как и в случае гидроксирования по атомам углерода в положениях 1' и 4' дезоксирибозы, подобный «концевой» эффект объясняют пространственным сближением окисляемой и окисляющей групп, вследствие чего процесс окисления гуанина протекает по другому пути.

Для того чтобы оценить количественный вклад трех возможных путей окисления комплексом $Mn^V=O$, авторы работы¹⁰⁷ использовали короткие дуплексы ДНК различной последовательности. Показано, что гидроксирование по атому углерода в положении 5' дезоксирибозы в (A·T)₃-сайте было в ~1000 раз эффективнее, чем окисление остатка гуанина. При этом внутрипочечная GG-последовательность окислялась в ~10 раз более эффективно, чем единичный остаток гуанина, но при этом все же в 100 раз менее эффективно, чем сайт (A·T)₃. Однако если остаток гуанина располагался на концах олигонуклеотидного дуплекса, его окисление было практически так же эффективно, как и окисление сайта (A·T)₃.

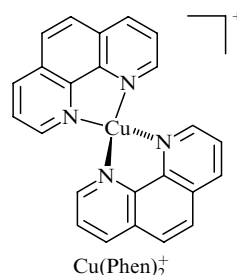
Чтобы произошло внедрение атома кислорода в связь C–H, необходимо близкое пространственное расположение окисляемой связи и оксокомплекса металла. Подобное тес-

ное взаимодействие возможно при связывании порфирина в (A·T)₃-сайте, что и приводит к эффективному гидроксированию по атому C(5') дезоксирибозы. Отрыв электрона от гуанина также зависит от расстояния между группой $Mn^V=O$ и гетероциклическим основанием и протекает наиболее эффективно в случае их близкого контакта.¹⁰⁷

Таким образом, отрыв электрона от остатка гуанина или гидроксирование дезоксирибозы не являются конкурирующими процессами при окислении ДНК оксокомплексом марганца. Окисление гуанина было значительным только в тех случаях, когда обеспечивалось пространственное сближение с окисляющей группой, например в случае окисления гуанина, располагающегося на концах дуплекса. При окислении углеводного фрагмента главными продуктами окисления являются 5'-альдегидонуклеозид, а также производные лактона и 4'-оксо-2'-дезоксирибозы; при окислении остатка гуанина — dR-производные гуанидиногидантоина, дегидрогуанидиногидантоина и имидазолон.

2. Окисление ДНК бис(1,10-фенантролиновым) комплексом меди(I)

Селективное окисление по атому C(1') дезоксирибозы характерно для комплекса Cu–(1,10-фенантролин) ($Cu(Phen)_2^+$) (схема 20).



Нуклеазная активность комплекса $Cu(Phen)_2^+$ была впервые обнаружена Сигманом с соавт.¹¹⁹ Данный комплекс связы-

Схема 18

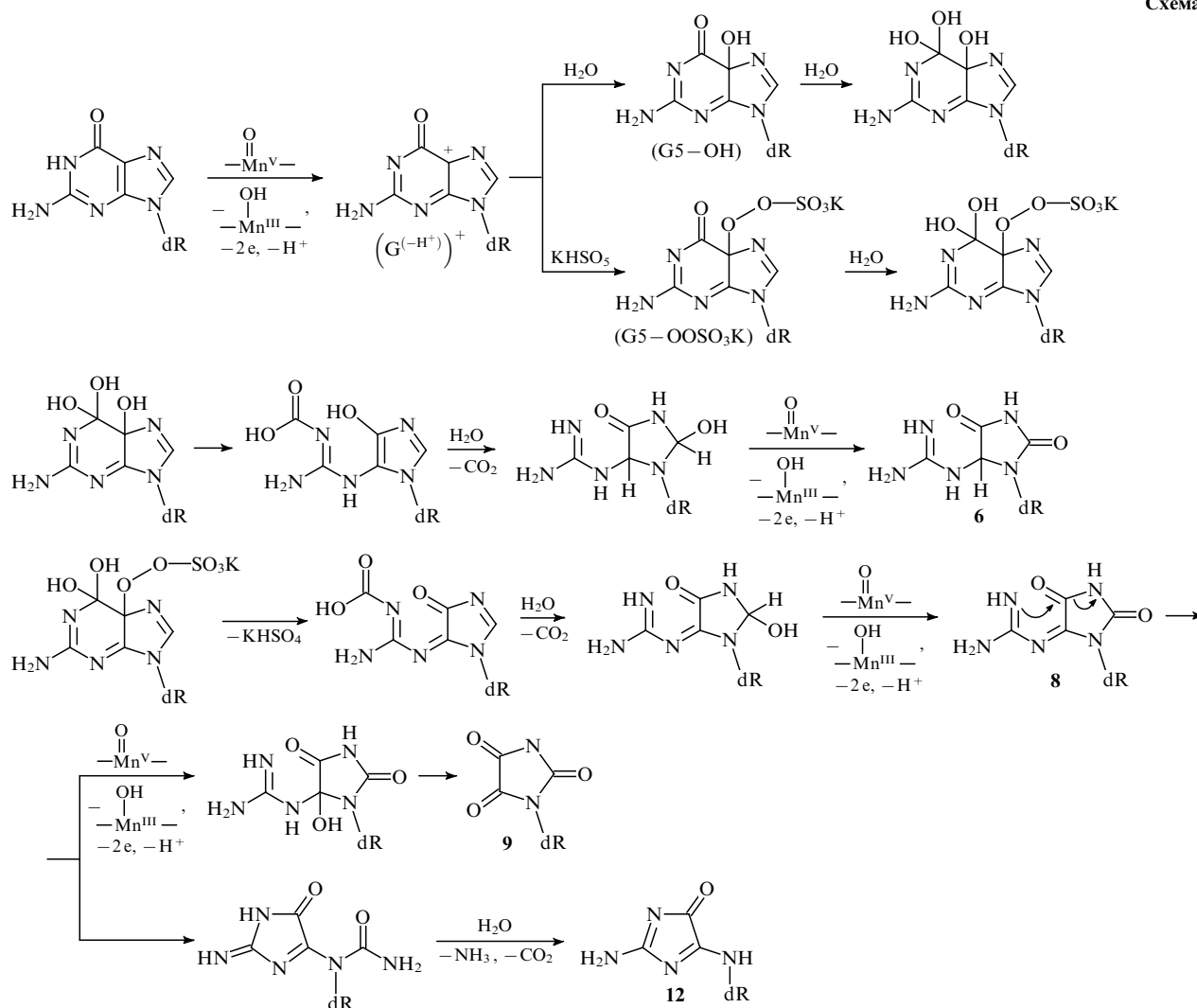
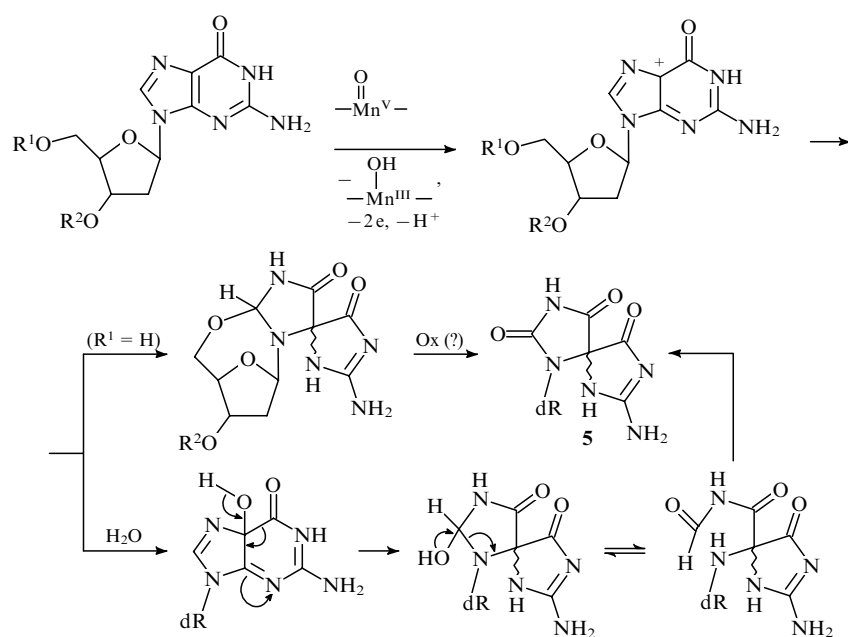
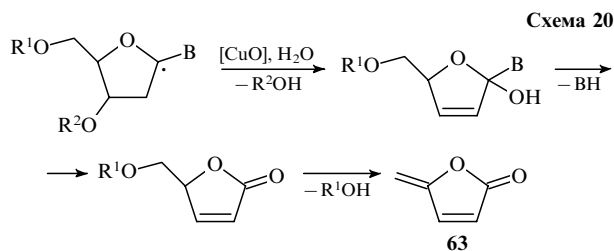


Схема 19





вается в малой бороздке¹²⁰ и приводит к расщеплению двухцепочечной ДНК в присутствии пероксида водорода.¹²¹

В качестве окисляющей частицы в этом случае выступают, скорее всего, оксокомплексы трехвалентной меди — $[\text{CuO}]^+$, $[\text{CuOH}]^{2+}$ и CuO_2H .^{122, 123} Предполагаемый механизм расщепления ДНК под действием фенантролинового комплекса меди, включающий гидроксильрование по атому $\text{C}(1')$ остатка дезоксирибозы,¹²⁴ изображен на схеме 20.

Конечными продуктами окисления являются свободное основание, 3'- и 5'-фосфатные концы и 5-метилтенфуран-2(5H)-он **63**.^{120, 125, 126} При проведении экспериментов в H_2^{18}O было показано, что атом кислорода карбонильной группы в 5-метилтенфуран-2(5H)-оне «приходит» из растворителя.¹²⁴ С учетом этого был сделан вывод, что на одной из первых стадий окисляется $\text{C}(1')$ -радикал дезоксирибозы и образуется соответствующий карбокатион. В результате нуклеофильной атаки молекулой воды получается 1'-гидроксипроизводное, дальнейшие превращения которого и приводят к расщеплению цепи ДНК (см. схему 20). Главная особенность процесса окисления заключается в том, что разрыв цепи происходит при комнатной температуре и не требует дополнительных стадий нагревания или обработки щелочью. Другой интересной особенностью является тот факт, что в отличие от других процессов, ведущих к расщеплению цепи ДНК, в данном случае не происходит раскрытия фуранозного цикла 2'-дезоксирибозы.

В литературе есть данные, что комплекс $\text{Cu}(\text{Phen})_2^+$ способен отрывать атом водорода и от атома $\text{C}(4')$, что также приводит к расщеплению ДНК. Но этот процесс является побочным по сравнению с процессом отрыва атома водорода от атома $\text{C}(1')$ (см.¹²⁷). В этом случае конечные продукты те же, что и при аэробном окислении 2'-дезоксирибозы гидроксильными радикалами: пропеналь гетероцикла и фосфогликолятный продукт (см. схему 14). Поскольку в В-форме ДНК атом водорода, находящийся при атоме углерода в положении 4', доступен для молекул растворителя,¹⁰⁰ то вклад этого процесса может быть значительным при окислении длинных дуплексов ДНК.

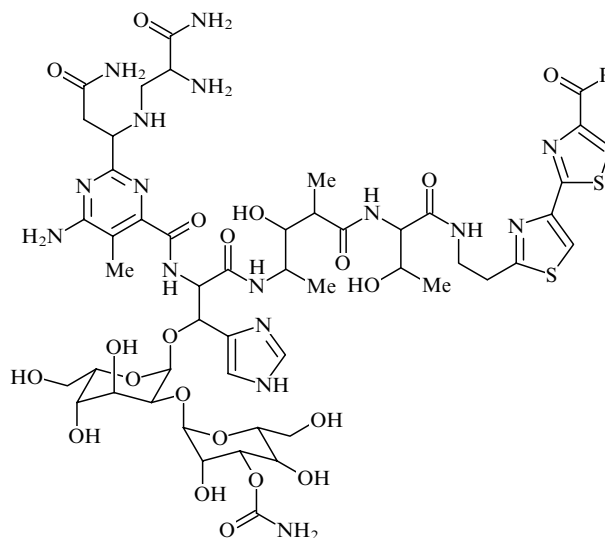
Следует отметить, что пространственная структура ДНК влияет на процесс окисления фенантролиновым комплексом меди(I). Так, расщепление А-формы ДНК протекает менее эффективно, чем В-формы. Вероятно, это связано с менее благоприятными контактами между комплексом и достаточно широкой малой бороздкой А-формы спирали ДНК.¹²⁸ При взаимодействии комплекса $\text{Cu}(\text{Phen})_2^+$ с Z-формой ДНК, в которой малая бороздка либо отсутствует, либо мала, расщепления цепи ДНК не наблюдали.¹²⁸ При окислении одноцепочечной ДНК расщепление было менее эффективным, чем при окислении двухцепочечной ДНК,¹²⁹ причем в первом случае процесс может протекать в сайт-специфичной манере.¹³⁰ При окислении РНК наблюдали противоположную картину: одноцепочечные петли РНК расщеплялись более эффективно, чем двухцепочечные регионы.¹²⁹ Следова-

тельно, пространственное строение нуклеиновой кислоты существенно влияет на эффективность окисления.

Таким образом, при окислении ДНК фенантролиновым комплексом меди происходит разрыв цепи ДНК и появление в качестве продукта окисления 2'-дезоксирибозы 5-метилтенфуран-2(5H)-она.

3. Окисление ДНК комплексом блеомицина железа(II)

Блеомицины (Blm) представляют собой группу гликопептидных противоопухолевых антибиотиков, вызывающих дегградацию ДНК в присутствии ионов Fe^{3+} и молекулярного кислорода.¹³¹



Блеомицин A₂: R =

блеомицин B₂: R =

В качестве окисляющей частицы выступает так называемый «активированный блеомицин», образующийся в результате двухэлектронного восстановления тройного комплекса $\text{Blm} \cdot \text{Fe}^{3+} \cdot \text{O}_2$. Активировать блеомицин можно, воздействуя на него пероксидом водорода (схема 21).^{132, 133} Природа окисляющей частицы в активированном блеомицине интенсивно исследовалась. По результатам исследования методом ESI-MS, окисляющей частицей, скорее всего, является пероксид железа или высоковалентный оксокомплекс $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O} \leftrightarrow \text{Fe}^{\text{IV}}-\text{O}^\bullet$, способный оторвать атом водорода от молекулы дезоксирибозы.^{132, 134}

Схема 21

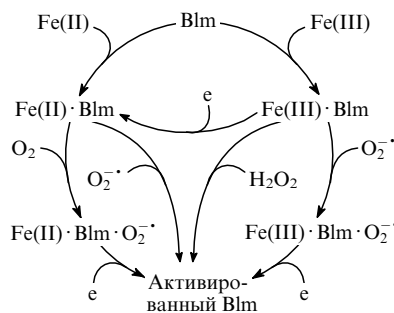
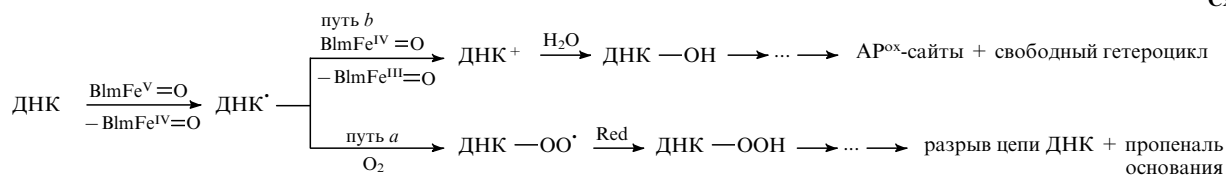


Схема 22



На основании данных по расщеплению различных ДНК, содержащих атомы трития или дейтерия в специфических сайтах дезоксирибозы, и исследования изотопного эффекта был сделан вывод, что отщепление атома водорода от атома углерода в положении 4' дезоксирибозы является скоростью-лимитирующей стадией.^{135–137}

Механизм окисления ДНК активированным блеомицином аналогичен механизму окисления дезоксирибозы гидроксильными радикалами по атому С(4'). На первой стадии образуется С(4')-радикал пентозы, дальнейшие превращения которого зависят от наличия в ближайшем окружении свободного молекулярного кислорода (схема 22).

При наличии в ближайшем окружении молекулы O₂ (путь *a*) образуются *транс*-пропенали гетероциклов **55**. Этот процесс сопровождается расщеплением ДНК на два фрагмента, один из которых содержит 5'-концевой фосфат, а второй — 3'-концевой фосфогликолят **56** (см. схему 14). При недостатке O₂ (путь *b*) происходит высвобождение гетероциклического основания, при этом образуются апиримидиновые/апуриновые сайты при окисленном остатке 2'-дезоксирибозы **46** (AP^{ox}-сайты), расщепление по которым происходит только в щелочных условиях (см. схему 14). При нормальном давлении кислорода количество выделяемых свободных гетероциклов практически равно количеству пропеналей гетероциклов. При повышении давления кислорода предпочтительно протекает реакция по пути *a*, тогда как при недостатке O₂ (система Fe(III) и H₂O₂) наблюдается исключительно путь *b*.^{96, 135}

Таким образом, при окислении ДНК активированным комплексом блеомицина с железом происходит селективное окисление фрагмента 2'-дезоксирибозы по атому С(4'). Среди продуктов окисления обнаружены апиримидиновые/апуриновые сайты при окисленном остатке дезоксирибозы, свободные гетероциклы, *транс*-пропенали гетероциклов и 3'-концевой фосфогликолят.

VII. Заключение

Приведенные литературные данные свидетельствуют об огромном интересе к окислению НК активными формами кислорода. В результате исследований выделено и охарактеризовано несколько десятков продуктов модификации НК и установлены механизмы их образования. При окислении НК первостепенную роль играют различные комплексы переходных металлов. Деструкция НК под действием металлокомплексов связана с их способностью генерировать АФК. При этом в качестве основных частиц, отвечающих за деструкцию нуклеиновых кислот в различных окислительных системах, выступают прежде всего свободные гидроксильные радикалы. Синглетный кислород и координированные кислородные частицы в форме оксокомплексов металлов, находящихся в высоких состояниях окисления, также способны окислять НК.

Гидроксильные радикалы взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами и модельными соединениями с диффузионными константами скорости. Преобладающими процессами

являются присоединение по двойным связям гетероциклов и отрыв атомов водорода от связей С—Н остатка рибозы. Гидроксильные радикалы взаимодействуют преимущественно с гетероциклами, при этом происходит их необратимая модификация. Окисление остатка рибозы в большинстве случаев приводит к разрывам цепи ДНК.

Эффективность окисления НК высоковалентными оксокомплексами металлов непосредственно зависит от образования комплекса окисляющего агента с нуклеиновой кислотой. Так, для порфирина Mn(III), активированного с помощью KHSO₅ в высоковалентную форму Mn^V=O, показано, что в зависимости от строения нуклеиновой кислоты он способен либо селективно окислять гуанин, либо приводить к окислению остатка 2'-дезоксирибозы по атомам С(1'), С(4') и С(5'). Аналогичным образом, фенантролиновый комплекс меди связывается в малой бороздке ДНК и в присутствии пероксида водорода приводит к разрыву цепи ДНК. При этом пространственное строение нуклеиновой кислоты — один из ключевых факторов, влияющих на эффективность окисления.

Литература

1. M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telser. *Mol. Cell. Biochem.*, **266**, 37 (2004)
2. M. D. Evans, M. Dizdaroglu, M. S. Cooke. *Mutat. Res.*, **567**, 1 (2004)
3. G. Waris, H. Ahsan. *Carcinogenesis*, **5**, 14 (2006)
4. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, J. Telser. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 44 (2007)
5. B. Halliwell. *Biochem. J.*, **401**, 1 (2007)
6. L. Gros, M. K. Saparbaev, J. Laval. *Oncogene*, **21**, 8905 (2002)
7. M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec. *FASEB J.*, **17**, 1195 (2003)
8. M. Audebert, J. B. Charbonnier, S. Boiteux, J. P. Radicella. *DNA Repair.*, **1**, 497 (2002)
9. T. D. Tullius, B. A. Dombroski. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5469 (1986)
10. R. Bonnett. *Rev. Contemp. Pharmacother.*, **10**, 1 (1999)
11. I. J. MacDonald, T. J. Dougherty. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **5**, 105 (2001)
12. A. V. Feofanov, A. I. Grichine, L. A. Shitova, T. A. Karmakova, R. I. Yakubovskaya, M. Egret-Charlier, P. Vigny. *Biophys. J.*, **78**, 499 (2000)
13. Пат. 6004953 США (1999)
14. Е. Г. Гиренко, С. А. Борисенкова, О. Л. Каля. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1137 (2002)
15. C. B. Chen, M. B. Gorin, D. S. Sigman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4206 (1993)
16. C. B. Chen, D. S. Sigman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7147 (1986)
17. О. А. Коваль, Е. Л. Черноловская, В. В. Литвак, В. В. Власов. *Изв. АН. Сер. хим.*, 2380 (2003)
18. G. B. Dreyer, P. B. Dervan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 968 (1985)
19. B. C. Chu, L. E. Orgel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 963 (1985)
20. P. E. Vorobjev, V. F. Smith, I. A. Pyshnaya, A. S. Levina, V. F. Zarytova. *Bioconjug. Chem.*, **14**, 1307 (2003)

21. T.Le Doan, L.Perrouault, C.Helene, M.Chassignol, N.T.Thuong. *Biochemistry*, **25**, 6736 (1986)
22. Е.М.Иванова, С.В.Мамаев, О.С.Федорова, Е.И.Фролова. *Биорг. химия*, **14**, 551 (1988)
23. B.Mestre, A.Jakobs, G.Pratviel, B.Meunier. *Biochemistry*, **35**, 9140 (1996)
24. B.Mestre, M.Pitié, C.Loup, C.Claparols, G.Pratviel, B.Meunier. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1022 (1997)
25. L.Mastruzzo, A.Woisard, D.D.F.Ma, E.Rizzarelli, A.Favre, T.Le Doan. *J. Photochem. Photobiol.*, **60**, 316 (1994)
26. O.S.Fedorova, A.P.Savitskii, K.G.Shoikhet, G.V.Ponomarev. *FEBS Lett.*, **259**, 335 (1990)
27. D.Magda, R.A.Miller, J.L.Sessler, B.L.Iverson. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7439 (1994)
28. D.Magda, M.Wright, R.A.Miller, J.L.Sessler, P.I.Sansom. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3629 (1995)
29. C.Casas, C.J.Lasey, B.Meunier. *Bioconjug. Chem.*, **4**, 366 (1993)
30. В.М.Белков, Н.Ф.Крынецкая, Е.М.Волков, З.А.Шабарова, Н.Ю.Крайнова, Г.Н.Новодарова, М.Е.Вольпин. *Биорг. химия*, **21**, 446 (1995)
31. D.Magda, M.Wright, S.Crofts, A.Lin, J.L.Sessel. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6947 (1997)
32. R.Bonnett. *Chem. Soc. Rev.*, **24**, 19 (1995)
33. D.S.Sigman, A.Mazumder, D.M.Perrin. *Chem. Rev.*, **93**, 2295 (1993)
34. B.Meunier. In *Metal-oxo and Metal-peroxo Species in Catalytic Oxidations*. (Ed. B.Meunier). Springer-Verlag, Berlin, 2000. P. 3
35. W.K.Pogozelski, T.D.Tullius. *Chem. Rev.*, **98**, 1089 (1998)
36. J.Cadet, T.Douki, D.Gasparutto, J.-L.Ravanat. *Mutat. Res.*, **531**, 5 (2003)
37. G.Pratviel, B.Meunier. *Chem. – Eur. J.*, **12**, 6018 (2006)
38. J.Cadet, T.Douki, J.-L.Ravanat. *Acc. Chem. Res.*, **41**, 1075 (2008)
39. Д.Г.Кнорре, О.С.Федорова, Е.И.Фролова. *Успехи химии*, **62**, 70 (1993)
40. B.Halliwell, J.M.C.Gutteridge. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. (3rd Ed.). (Eds B.Halliwell, J.M.C.Gutteridge). Oxford University Press, Oxford, 1999. P. 246
41. P.W.White. *Bioorg. Chem.*, **18**, 440 (1990)
42. D.R.Kearns. *Chem. Rev.*, **71**, 395 (1971)
43. J.Cadet, R.Teoule. *Photochem. Photobiol.*, **28**, 629 (1978)
44. И.Б.Афанасьев. *Успехи химии*, **48**, 977 (1979)
45. T.A.Dix, J.Aikens. *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 2 (1993)
46. R.Misiaszek, C.Crean, A.Joffe, N.E.Geacintov, V.Shafirovich. *J. Biol. Chem.*, **279**, 32106 (2004)
47. C.A.M.Seidel. *J. Phys. Chem.*, **100**, 5541 (1996)
48. S.Steenken, S.V.Jovanovic. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 617 (1997)
49. M.Dizdaroglu. *Mutat. Res.*, **275**, 331 (1992)
50. A.W.M.Nieuwint, J.M.Aubry, F.Arwert, H.Kortbeek, S.Herzberg, H.Joenje. *Free Radical Res. Commun.*, **1**, 1 (1985)
51. M.V.M.Lafleur, A.W.M.Nieuwint, J.M.Aubry, H.Kortbeek, F.Arwert, H.Joenje. *Free Radical Res. Commun.*, **2**, 343 (1987)
52. C.Sheu, C.S.Foote. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6439 (1995)
53. J.-L.Ravanat, P.Di Mascio, G.R.Martinez, M.H.G.Medeiros, J.Cadet. *J. Biol. Chem.*, **275**, 40601 (2000)
54. Y.Ye, J.G.Muller, W.Luo, C.L.Mayne, A.J.Shalloo, R.A.Jones, C.J.Burrows. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13926 (2003)
55. J.C.Niles, J.S.Wishnok, S.R.Tannenbaum. *Org. Lett.*, **3**, 963 (2001)
56. W.Luo, J.G.Muller, E.M.Rachlin, C.J.Burrows. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 927 (2001)
57. V.Duarte, D.Gasparutto, L.F.Yamaguchi, J.-L.Ravanat, G.R.Martinez, M.H.G.Medeiros, P.Di Mascio, J.Cadet. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12622 (2000)
58. O.Schiemann, N.J.Turro, J.K.Barton. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 7214 (2000)
59. L.P.Candeias, S.Steenken. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1094 (1989)
60. L.P.Candeias, S.Steenken. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 699 (1992)
61. K.Hildenbrand, D.Schulte-Frohlinde. *Free Radical Res. Commun.*, **11**, 195 (1990)
62. V.Shafirovich, A.Dourandin, W.Huang, N.E.Geacintov. *J. Biol. Chem.*, **276**, 24621 (2001)
63. R.Misiaszek, C.Crean, N.E.Geacintov, V.Shafirovich. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2191 (2005)
64. V.Shafirovich, A.Dourandin, W.Huang, N.P.Luneva, N.E.Geacintov. *J. Phys. Chem.*, **103**, 10924 (1999)
65. V.Shafirovich, A.Dourandin, N.E.Geacintov. *J. Phys. Chem.*, **105**, 8431 (2001)
66. V.Shafirovich, J.Cadet, D.Gasparutto, A.Dourandin, N.E.Geacintov. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 233 (2001)
67. S.Steenken, S.V.Jovanovic, M.Bietti, K.Bernhard. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2373 (2000)
68. W.Luo, J.G.Muller, C.J.Burrows. *Org. Lett.*, **3**, 2801 (2001)
69. B.Armitage. *Chem. Rev.*, **98**, 1171 (1998)
70. G.V.Buxton, C.L.Greenstock, W.P.Helman, A.B.Ross. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **17**, 513 (1988)
71. M.Kuwabara, O.Inanami, D.Endoh, F.Sato. *Biochemistry*, **26**, 2458 (1987)
72. S.V.Jovanovic, M.G.Simic. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5968 (1986)
73. A.J.S.Vieira, S.Steenken. *J. Phys. Chem.*, **91**, 4138 (1987)
74. L.P.Candeias, S.Steenken. *Chem. – Eur. J.*, **6**, 475 (2000)
75. A.J.S.C.Vieira, S.Steenken. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6986 (1990)
76. N.Murata-Kamiya, H.Kamiya, M.Muraoka, H.Kaji, H.Kasai. *J. Radiat. Res.*, **38**, 121 (1997)
77. Y.Luo, E.S.Henle, S.Linn. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21167 (1996)
78. E.S.Henle, Y.Luo, W.Gassmann, S.Linn. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21177 (1996)
79. H.Kamiya, H.Kasai. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19446 (1995)
80. J.R.Wagner, C.Decarroz, M.Berger, J.Cadet. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4101 (1999)
81. T.Douki, S.Spinelli, J.-L.Ravanat, J.Cadet. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1875 (1999)
82. T.Douki, J.Onuki, M.H.G.Medeiros, E.J.H.Bechara, J.Cadet, P.Di Mascio. *FEBS Lett.*, **428**, 93 (1998)
83. E.Gajewski, G.Rao, Z.Nackerdien, M.Dizdaroglu. *Biochemistry*, **29**, 7876 (1990)
84. J.R.Wagner, J.E.van Lier, M.Berger, J.Cadet. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2235 (1994)
85. J.Cadet, T.Delatour, T.Douki, D.Gasparutto, J.-P.Pouget, J.-L.Ravanat, S.Sauvaigo. *Mutat. Res.*, **424**, 9 (1999)
86. L.S.Myers, M.L.Hollis, L.M.Theard, F.C.Peterson, A.Warnick. *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2875 (1970)
87. S.Tremblay, T.Douki, J.Cadet, J.R.Wagner. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20833 (1999)
88. T.Douki, R.Martini, J.-L.Ravanat, R.J.Turesky, J.Cadet. *Carcinogenesis*, **18**, 2385 (1997)
89. N.Murata-Kamiya, H.Kamiya, N.Iwamoto, H.Kasai. *Carcinogenesis*, **16**, 2251 (1995)
90. M.Awada, P.C.Dedon. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1247 (2001)
91. P.Thornalley, S.Wolff, J.Crabbe, A.Stern. *Biochim. Biophys. Acta*, **797**, 276 (1984)
92. J.A.Mikroyannidis, A.K.Tsolis, D.J.Gourghiotis. *Phosphorus Sulfur, Relat. Elem.*, **13**, 279 (1982)
93. F.Ramirez, S.L.Glaser, A.J.Bigler, J.F.Pilot. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 496 (1969)
94. P.C.Dedon, J.P.Plataras, C.A.Rouzer, L.J.Marnett. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11113 (1998)
95. A.P.Grollman, M.Takeshita, K.M.R.Pillai, F.Johnson. *Cancer Res.*, **45**, 1127 (1985)
96. S.M.Hecht. *Acc. Chem. Res.*, **19**, 383 (1986)
97. P.C.Dedon, I.H.Goldberg. *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 311 (1992)
98. J.Cadet, M.Berger. *Int. J. Radiat. Biol.*, **47**, 127 (1985)
99. T.Douki, J.Cadet. *Free Radical Res. Commun.*, **24**, 369 (1996)
100. B.Balasubramanian, W.K.Pogozelski, T.D.Tullius. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9738 (1998)
101. M.A.Price, T.D.Tullius. *Methods Enzymol.*, **212**, 194 (1992)

102. A.F.Fuciarelli, F.Y.Shum, J.A.Raleigh. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 883 (1986)
103. M.Dizdaroglu. *Biochem. J.*, **238**, 247 (1986)
104. J.A.Theruvathu, P.Jaruga, M.Dizdaroglu, P.J.Brooks. *Mech. Ageing Dev.*, **128**, 494 (2007)
105. Е.П.Талзи. *Сорос. образоват. журн.*, **6**, 35 (2000)
106. B.Meunier, S.P.de Visser, S.Shaik. *Chem. Rev.*, **104**, 3947 (2004)
107. S.Mourgues, A.Kupan, G.Pratviel, B.Meunier. *ChemBioChem.*, **6**, 2326 (2005)
108. L.Ding, J.Bernadou, B.Meunier. *Bioconjug. Chem.*, **2**, 201 (1991)
109. J.C.Dabrowiak, B.Ward, J.Goodisman. *Biochemistry*, **28**, 3314 (1989)
110. B.Ward, A.Skorobogaty, J.C.Dabrowiak. *Biochemistry*, **25**, 6875 (1986)
111. M.Pitie, G.Pratviel, J.Bernadou, B.Meunier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3967 (1992)
112. G.Pratviel, V.Duarte, J.Bernadou, B.Meunier. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7939 (1993)
113. M.Pitie, J.Bernadou, B.Meunier. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2935 (1995)
114. B.Mestre, G.Pratviel, B.Meunier. *Bioconjug. Chem.*, **6**, 466 (1995)
115. C.Vialas, G.Pratviel, C.Claparols, B.Meunier. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11548 (1998)
116. A.Chworos, C.Seguy, G.Pratviel, B.Meunier. *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 1643 (2002)
117. A.Chworos, Y.Coppel, I.Dubey, G.Pratviel, B.Meunier. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5867 (2001)
118. B.Vialas, C.Claparols, G.Pratviel, B.Meunier. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2157 (2000)
119. D.S.Sigman, D.R.Graham, V.D'Aurora, A.M.Stern. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12269 (1979)
120. M.Kuwabara, C.Yoon, T.Goyne, T.Theदारahn, D.S.Sigman. *Biochemistry*, **25**, 7401 (1986)
121. L.E.Marshall, D.R.Graham, K.A.Reich, D.S.Sigman. *Biochemistry*, **20**, 244 (1981)
122. G.R.A.Johnson, N.B.Nazhat. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 1990 (1987)
123. K.Yamamoto, S.Kawanishi. *J. Biol. Chem.*, **264**, 15435 (1989)
124. M.M.Meijler, O.Zelenko, D.S.Sigman. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1135 (1997)
125. L.M.Pope, K.A.Reich, D.R.Graham, D.S.Sigman. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12121 (1982)
126. T.Goyne, D.S.Sigman. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2846 (1987)
127. D.S.Sigman. *Acc. Chem. Res.*, **19**, 180 (1986)
128. L.E.Pope, D.S.Sigman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3 (1984)
129. G.J.Murakawa, C.H.Chen, M.D.Kuwabara, D.P.Nierlich, D.S.Sigman. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 5361 (1989)
130. S.A.Kazakov, T.G.Astashkina, S.V.Mamaev, V.V.Vlassov. *Nature (London)*, **335**, 186 (1988)
131. R.M.Burger. *Chem. Rev.*, **98**, 1153 (1998)
132. R.M.Burger, J.Peisach, S.B.Horwitz. *J. Biol. Chem.*, **256**, 11636 (1981)
133. R.M.Burger, T.A.Kent, S.B.Horwitz, E.Munck, J.Peisach. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1559 (1983)
134. J.W.Sam, X.-J.Tang, J.Peisach. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5250 (1994)
135. J.Stubbe, J.W.Kozarich. *Chem. Rev.*, **87**, 1107 (1987)
136. J.C.Wu, J.W.Kozarich, J.Stubbe. *Biochemistry*, **24**, 7562 (1985)
137. J.C.Wu, D.W.Vanderwall, J.Stubbe, J.W.Kozarich, C.J.Turner. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 10843 (1994)

OXIDATION OF DNA AND ITS COMPONENTS WITH ACTIVE OXYGEN SPECIES

A.A.Kuznetsova, D.G.Knorre, O.S.Fedorova

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences*

8, Prosp. Acad. Lavrentieva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax + 7(383)333–3677

The mechanism of oxidation of nucleosides, nucleotides and DNA by active oxygen species including singlet oxygen, superoxide and hydroxyl radicals and high-valence metal oxo complexes are considered. Bibliography — 137 references.

Received 12th February 2009

Свидетельство о регистрации № 0110235 от 08.02.93 в Министерстве печати и информации Российской Федерации.
Учредители: Российская академия наук, Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН

Номер набран и сверстан с использованием системы **Advent 3B2 Total Publishing System** на оборудовании, поставленном фирмой «Turpion Ltd».

Подписано к печати с оригинал-макета 03.07.09. Формат 60 × 90 1/8. Печать офсетная.
Усл. п. л. 12.0. Уч.-изд. л. 12.5. Тираж 500 экз. Заказ 1153.

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленных диапозитивов в ППП «Типография «Наука»
121099 Москва, Шубинский пер., 6.
