

# Оксидативні пошкодження ДНК

Н. В. Скрипник, О. О. Маслова

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

skrypnyk@i.com.ua

---

*Проаналізовано деякі характеристики основних типів оксидативних пошкоджень ДНК: модифікації азотистих основ та дезоксирибози, одноланцюгові та дволанцюгові розриви, апуринові/апиримідинові сайти, міжвалентні взаємодії ДНК з білками. Наведено хімічну структуру найдослідженіших форм оксидативних пошкоджень ДНК. Зазначено найпоширеніші генотоксичні агенти (активні форми кисню, вільні радикали, алкілюючі чинники). Розглянуто сучасні методи якісних і кількісних досліджень пошкоджень ДНК.*

*Ключові слова: оксидативний стрес, пошкодження ДНК, генотоксичні агенти.*

---

**Вступ.** За нормальних умов у клітині відбувається величезна кількість різноманітних пошкоджень ДНК. Проте наявні у клітині порушення за норми потрібно відмежовувати від таких, що інколи штучно створюються у пробірці.

Пошкодження ДНК можуть викликатися різними хімічними і фізичними агентами екзогенного та ендогенного походження. До екзогенних чинників, здатних порушити структуру ДНК, належать іонізуюча радіація, ультрафіолетове випромінювання, деякі ліки, барвники тощо. Ендогенно утворюються активні форми кисню, азоту, вільні радикали, метилуючі агенти, навіть за умов нормального метаболізму створюється достатня кількість факторів, шкідливих для ДНК. Усі ці сполуки спричиняють пошкодження ДНК, які є наслідком реакцій алкілування, гідролізу та окиснення і вимагають репарації. При цьому утворюються одноланцюгові та дволанцюгові розриви, сайти випадання основ (AP-сайти), модифікації основ і дезоксирибози, міжвалентні взаємодії (зшивки) з білками. Час-

тина із згаданих пошкоджень може бути ефективно виправлена, а частина – ні. Звичайно, такі зміни у структурі не можуть не вплинути на функції ДНК. Однак у клітині завжди присутній певний сталий рівень модифікованої ДНК [1–5].

В огляді розглянуто лише оксидативні пошкодження ДНК, що виникають як під час нормального метаболізму, так і за умов оксидативного стресу. Спектр подібних пошкоджень дуже широкий – це і модифікації азотистих основ, і зміни в структурі дезоксирибози, і розриви ланцюга, тому коли мова йде про оксидативні пошкодження ДНК, потрібно сприймати це як сукупність різноманітних порушень, викликаних групою конкретних агентів [1–5].

**Типи оксидативних пошкоджень ДНК та групи агентів, що їх спричиняють.** Пошкодження ДНК виникають у результаті низки хімічних реакцій: окисно-відновних, алкілування, гідролізу тощо. У клітині перманентно присутній певний рівноважний рівень пошкоджень ДНК. Вважається, що показником патологічного стану клітини є не на-

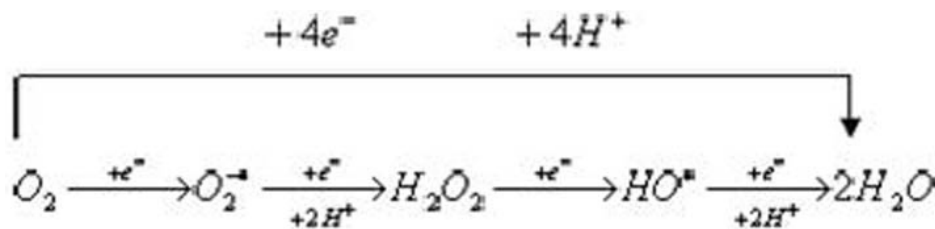


Рис. 1. Шляхи утворення АФК при чотириелектронному відновленні кисню в клітині

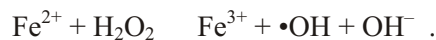
явність певного виду пошкоджень, а їхній рівень, що перевищує норму на порядки [1–6].

Оксидативні пошкодження ДНК у великій кількості утворюються під час оксидативного стресу під впливом вільних радикалів та інших активних форм кисню [1–7]. Вільні радикали, що мають неспарені електрони, є небезпечними та напрочуд реакційноздатними сполуками. Практично весь час вони утворюються у клітині під час метаболічних перетворень у мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі тощо. Незважаючи на короткий період напівжиття (1 нс для ОН-радикала у клітині), вільні радикали суттєво впливають на макромолекули організму [2, 8]. Прості підрахунки показують, що при швидкості дифузії 500 м/с та розмірі молекули з атомом або хімічною групою у збудженому стані 0,5 нм за  $10^{-9}$  с радикал може подолати відстань  $0,5 \cdot 10^{12}$  нм, а це дорівнює близько 1000 його діаметрів [9]. До вільних радикалів належать деякі активні форми кисню (АФК), азоту (АФА), ліпідні радикали (пероксид – ROO $\cdot$ , алкоксил – RO та ін.), а також семіхінони (QH). Реагуючи з молекулою ДНК, вільні радикали можуть стати причиною розривів ланцюга та модифікації основ і дезоксирибози [2, 5].

АФК – поняття дещо ширше, ніж вільні радикали, бо вмщує, окрім вільних радикалів кисню (супероксид-аніон  $O_2^{\cdot -}$  та гідроксил-радикал ОН $\cdot$ ), ще й перекис водню, синглетний кисень (з електроном у синглетному стані –  $^1O_2$  на відміну від нормального триплетного), озон, а також деякі «некла-сичні» АФК [1, 5, 7]. Ці та інші сполуки здатні викликати найбільшу групу пошкоджень: зміни структури азотистих основ, дезоксирибози, одноланцюгові та дволанцюгові розриви, міжмолекулярні зшивки. Саме вони є одним із показників оксидативного стресу, що має негативний вплив на клітину та організм у цілому [1–7].

Найбільший внесок в ендогенне утворення активних форм кисню роблять дихальний ланцюг мітохондрій (саме тому мітохондріальна ДНК часто обирається як об'єкт досліджень оксидативних пошкоджень), система цитохрому Р-450 в ендоплазматичному ретикулумі, бета-окиснення жирних кислот. Ці сполуки утворюються і протягом інших реакцій метаболізму, а деякі клітини імунної системи (макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли) знешкоджують чужорідні агенти саме за допомогою АФК. Екзогенними стимуляторами утворення АФК можуть бути ультрафіолетові промені, іонізуюча радіація та деякі хімічні речовини [1, 5, 6, 8]. Потрапивши в організм, кисень має відновитися до води, приєднавши 4 електрони і 4 протони, проте навіть за нормальних умов до 5 % кисню приєднує не 4, а 1, 2 або 3 електрони, що призводить до утворення відповідних АФК: вільного супероксид-аніона  $O_2^{\cdot -}$ , перекису водню ( $H_2O_2$ ) та найактивнішого гідроксил-радикала (ОН $\cdot$ ) (рис. 1.) [8, 10].

Перекис водню сам по собі має низьку реакційну здатність, але за наявності металів із змінною валентністю (заліза, міді) він вступає у так звані Фентонівські реакції [11]:



Ще одним перетворенням є реакція Габера-Вейса [12] з формуванням великої кількості ОН-радикалів:



За нормальних умов пероксиди знешкоджують-ся ферментними системами (супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, каталази, пероксидази), а захист від оксидативного стресу забезпечується сукупністю природних антиоксидантів: токоферолу,

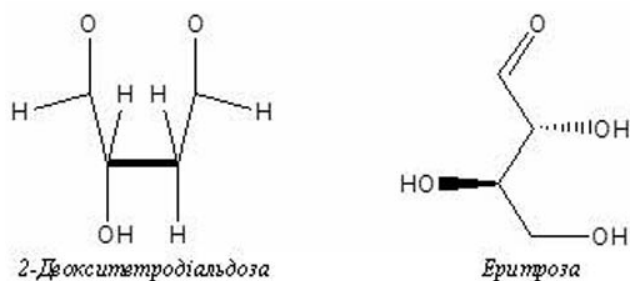


Рис. 2. Похідні дезоксирибози, утворені в результаті атаки гідроксильного радикала

феритину, каротиноїдів, аскорбінової та сечової кислот тощо [13].

ОН-радикали реагують з дезоксирибозою з утворенням різних похідних (еритрози, 2-деокси-тетрадiальдоза (рис. 2)) та розривів ланцюга, а з усіма типами азотистих основ – з утворенням со-тець проміжних продуктів [2].

Через нестійкість більшості з утворених проміжних продуктів лише для деяких з них вдалося чітко визначити біохімічні особливості. Основні форми оксидативних пошкоджень азотистих основ показано на рис. 3 [1, 5].

Переважну частину пошкоджень, спричинених ОН-радикалом, вивчали за умов *in vitro* та *in vivo* з використанням гамма-опромінення [1, 3]. Гідроксил-радикал здатний відривати атом водню від метильної групи тиміну та від кожного з С-Н зв'язків 2'-деоксирибози [1]. Приєднання до подвійних зв'язків в основах характеризується константою швидкості від 3 до  $10 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , а відрив атома водню –  $210^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Чутливим до ОН-радикала є С4-С5 зв'язок у піримідинах та атоми С4, С5, С8 у пуринах. Атака гідроксил-радикала спричиняє різні модифікації піримідинових основ: утворення 5-ОНdU (рис. 3, б), 5-ОНdC (рис. 3, з), урацилгліколю (рис. 3, д), тимінгліколю (рис. 3, е) та інших сполук [1–7].

Взаємодія ОН-радикала з пуринами теж призводить до змін – утворюються формамідопіримідини (Фару), 8-оксогуанін (8-ОНdG) (рис. 3, а) (основний маркер оксидативного стресу *in vitro* та *in vivo*), 8-гідроксидеооксиаденозин (8-ОНdA) (рис. 3, в) та ін. Фару – це пурини з відкритим імідазольним кільцем: 2,6-діаміно-4-гідрокси-5N-метил-формамідопіримідин (Фару-Г) (рис. 3, є) та 4,6-діаміно-

5-формамідопіримідин (Фару-А) (рис. 3, ж) [1]. Утворення 8-ОНdG або майже еквівалентного йому 8-охо-7,8-дигідрогуаніну (8-охо-G) є найпоширенішим результатом оксидативних пошкоджень. Ці сполуки легко перетворюються одна в одну, тому їх прийнято називати 8-охо-G. Кількісний аналіз 8-охо-G найчастіше здійснюють для визначення рівня оксидативного стресу. Це пов'язано з високим вмістом цих сполук у клітинах та наявністю великої кількості відносно об'єктивних методик дослідження [1–7]. Нині для ефективного проведення кількісного аналізу створено цілу низку комерційних наборів [1, 4, 14, 15]. Гліколі та гідрати цитозину частіше, ніж нормальний цитозин, спричинюють трансверсії внаслідок відриву аміногруп [1, 16]. Аддукти азотистих основ з ОН-радикалом – це група сполук, що мають окисно-відновну амбівалентність та здатні вступати у складні реакції [1].

Деякі модифіковані основи самі стають вільними радикалами та призводять до ланцюгових реакцій. Наприклад, радикали цитозину С5-ОН-6-пероксил та С6-ОН-5-пероксил причетні до утворення 4-аміно-5-гідрокси-2,6(1Н,5Н)-піримідиндіону та 4-аміно-6-гідрокси-2,5(1Н,6Н)-піримідиндіону [1, 3, 5].

При взаємодії ДНК з озоном, синглетним киснем та іншими АФК також утворюється низка похідних азотистих основ [3, 4].

Оксид азоту (NO) часто утворюється в клітині з аргініну за участі NO-синтетази. Його взаємодія з ДНК призводить до дезамінування основ та появи транзицій [6].

Гіпохлорит ( $\text{ClO}^-$ ) індукує спектр пошкоджень, аналогічний дії синглетного кисню [3, 4].

Ультрафіолетове світло індукує формування так званих піримідинових димерів двох типів (рис. 4) [17, 18].

Видиме світло спричиняє реакції, ідентичні таким, що викликані синглетним киснем, і фотореакції I типу (пов'язані з дією фотосенсибілізаторів, таких як гематопорфірин, рибофлавін, метиленовий синій тощо) [3, 4]. Але подібні модифікації відрізняються від спричинених ОН-радикалом, який викликає приблизно однакові кількості розривів, AP-сайтів та різноманітних модифікацій

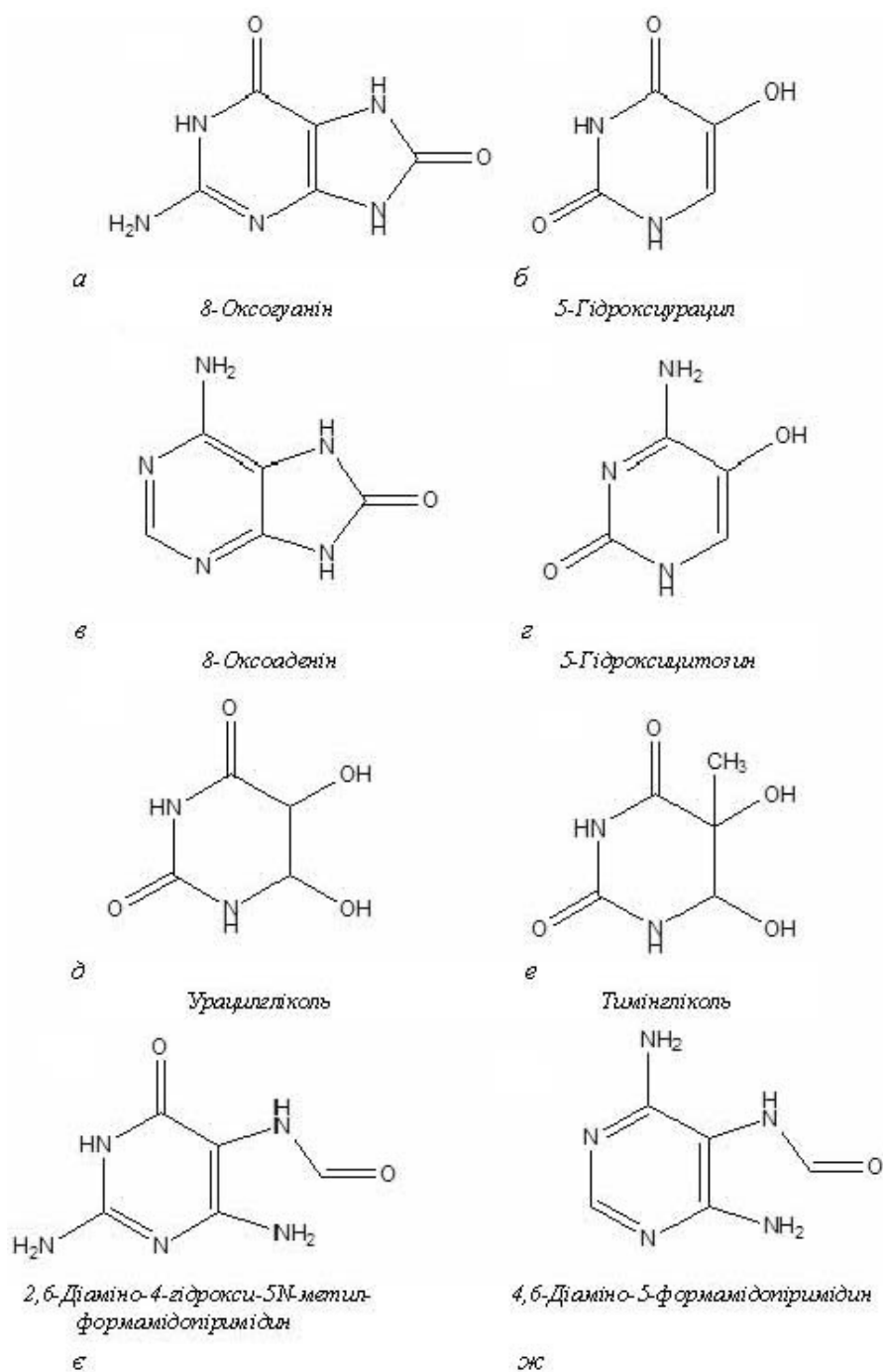


Рис. 3. Найпоширеніші модифікації азотистих основ, викликані дією АФК

основ. Синглетний же кисень та більшість фотосенсибілізаторів призводять, в основному, до порушень, чутливих до дії ферменту ексцизійної репарації основ формамідопіримідин-ДНК-глікозилази, – 8-охо-Г та формамідопіримідинів [3, 4, 18, 19].

Велика кількість активних форм кисню з'являється під час запальних процесів як результат діяльності клітин імунної системи. У процесах ак-

тивації макрофагів беруть участь ферменти НАДН-оксидаза та мієлопероксидаза, що формують ОН-радикали та гіпохлорит, які причетні до знищення чужорідних агентів. Тому оксидативний стрес є одним із показників хронічного запалення [1, 6, 10].

Ще одним типом пошкоджень, індукованих вільними радикалами (особливо – гідроксильним

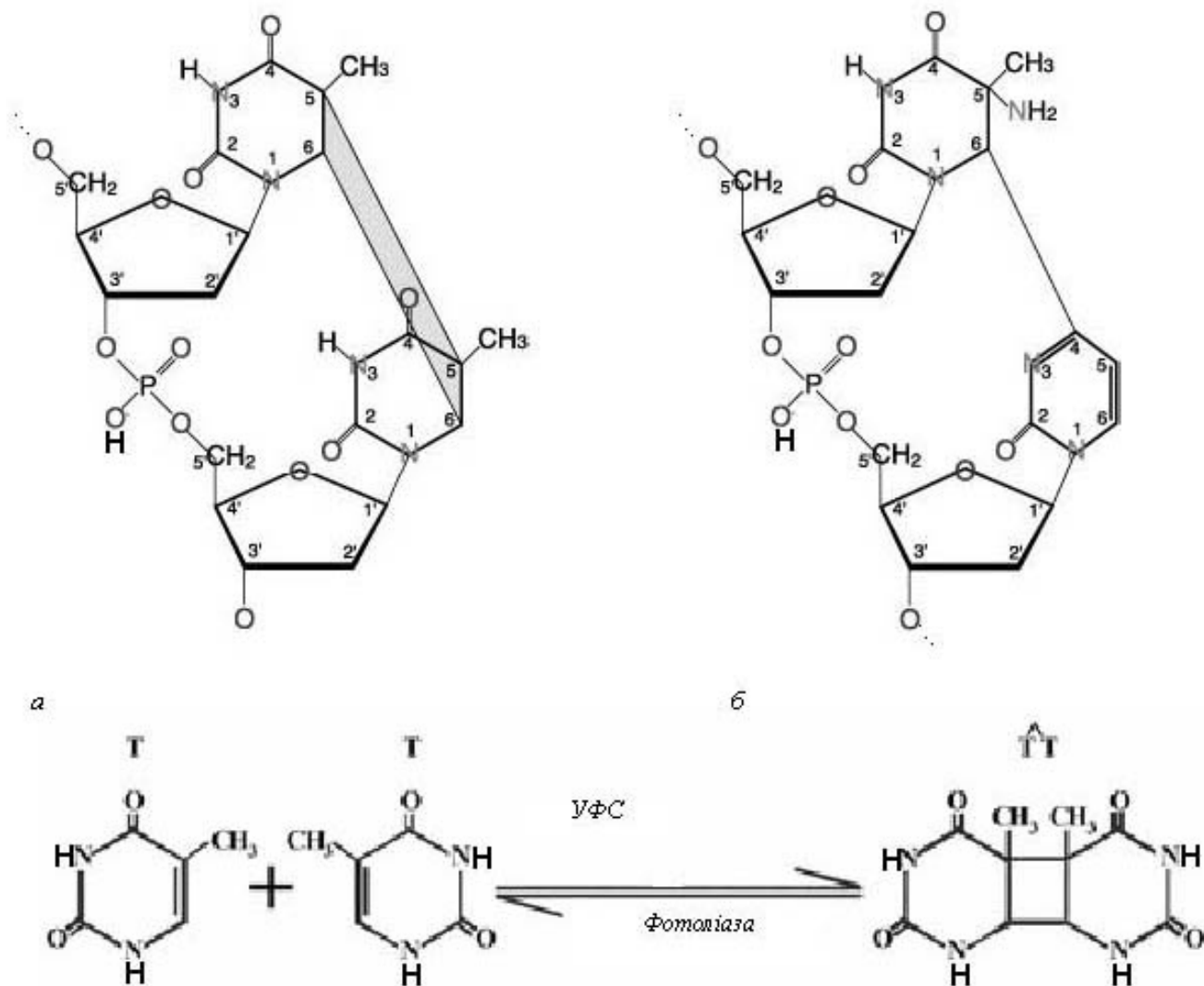


Рис. 4. Продукти, що утворюються під впливом ультрафіолетових променів: *а* – циклобутанові димери; *б* – 6-4-димери; *в* – тимін-тимінові димери

радикалом і малондальдегідом), вважають міжвалентні взаємодії нуклеїнових кислот і білків [1, 2]. Одними з поширених прикладів є тимін-тирозинові та тимін-лізинові взаємодії. Тимін також здатний взаємодіяти з гліцином, аланіном, валіном, лейцином, ізолейцином та треоніном. З тирозином інколи взаємодіє цитозин [2].

Алкілювання ДНК – процес спонтанного (без участі ферментних систем організму) приєднання алкільної групи у певному положенні азотистої основи [20]. Алкільна група може бути переміщена у вигляді карбаніону, карбкатіону чи вільного радикала. Алкілюючі агенти є досить великою групою речовин, здатних пошкоджувати структуру макромо-

лекул. Вони можуть приєднувати до інших молекул алкільні бічні групи (метильні, етильні, пропілові, бутилові тощо). Алкілюючі чинники класифікують не лише за типом групи, що переноситься, а й за кількістю таких груп (існують моно-, біфункціональні та ін. агенти). Найчастіше приєднуються метильні групи [20–23]. Алкілювання ДНК не є предметом даної роботи, але деякі його основні риси будуть нами висвітлені, адже оксидативний стрес призводить до збільшення пошкоджень ДНК й іншими агентами [5].

Алкілюючі агенти можуть бути як екзо-, так і ендогенного походження. До перших належать епоксиди, бета-лактони, діазосполуки (діазометан



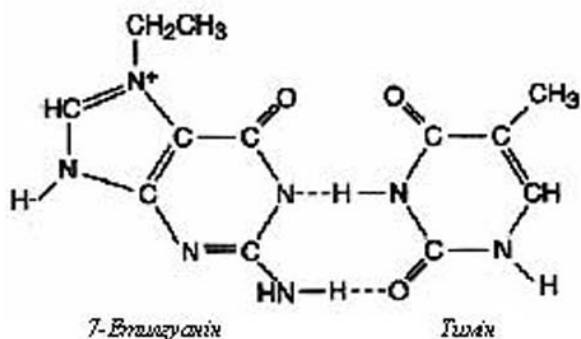


Рис. 5. Утворення водневих зв'язків між електронейтральним 7-етилгуаніном та тиміном

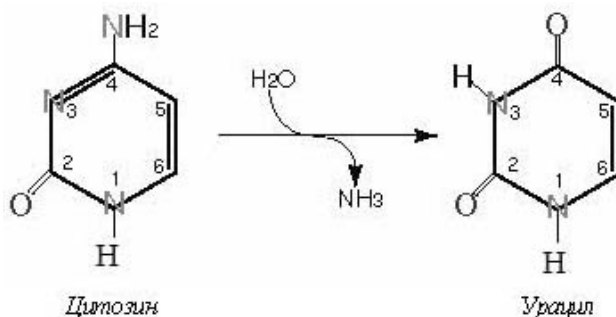


Рис. 7. Дезамінування цитозину з утворенням урацилу

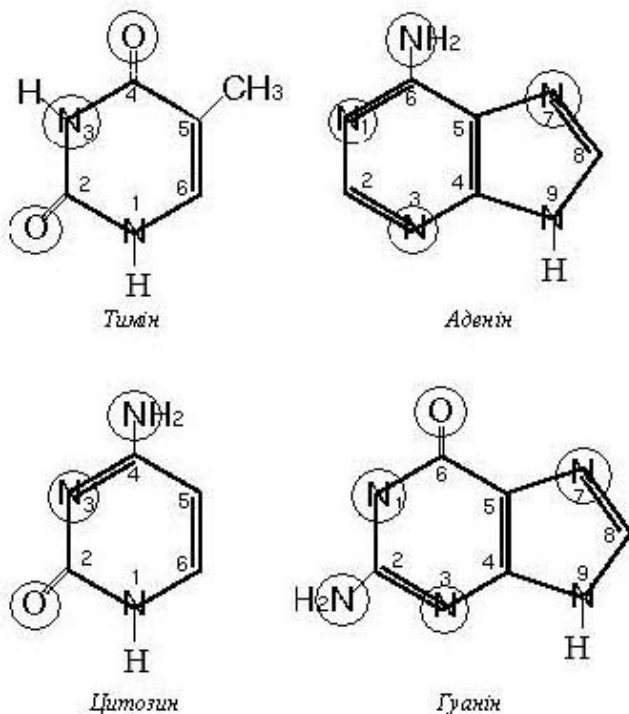


Рис. 6. Сайти можливого алкілування азотистих основ (позначені колами)

$\text{CH}_2\text{N}=\text{N}$ ), нітросполуки – N-метил-N-нітро-N-нітросогуанідин  $\text{CH}_3\text{N}(\text{NO})\text{C}(=\text{NH})\text{NHNO}_2$  тощо. Останній є одним із найнебезпечніших екзогенних алкілюючих агентів. До найвідоміших ендогенних алкілюючих агентів належить S-аденозилметіонін. Деякі алкілюючі агенти використовують як проти-пухлинні препарати [20].

Найпоширенішими продуктами алкілування азотистих основ є  $\text{O}^6$ -метилгуанін,  $\text{O}^4$ -алкілтимін, 3-метиладенін, 7-метилгуанін та 7-етилгуанін, що може спарюватися з тиміном (рис. 5) [20].

Сайтами, алкілування яких може призвести до мутацій, є N-1, N-2, N-3, N-7, O-6 гуаніну, N-1, N-3, N-6, N-7 аденіну, N-3, N-4, O-2 цитозину та N-3, O-2, O-4 тиміну (рис. 6) [21–23]. Особливості процесу алкілування ДНК розглянуто у деяких оглядах [24, 25].

Пошкодження внаслідок гідролізу призводять до декількох типів уражень: дезамінування, депуринізації та депіримідинізації – тобто до утворення сайтів втрати основ (AP-сайтів) [1, 20].

У результаті втрати аміногрупи з цитозину утворюється урацил (рис. 7), з гуаніну – ксантин, а з аденіну – гіпоксантин [16]. Найнебезпечнішими вважають дезамінування цитозину та його похідних. Дезамінування 5-метилцитозину (рис. 8) спричинює утворення тиміну [20].

Поява AP-сайтів є досить поширеною групою пошкоджень. Пуринові основи втрачаються легше, ніж піримідини. Ці процеси часто відбуваються у мозку, серці, печінці, кишечнику, рідше – у нирках і легенях. Також AP-сайти з'являються в результаті діяльності ферментів репарації. Наприклад, глікозилази вирізають модифіковану основу з появою AP-сайта. Причиною їхнього утворення є гідроліз N-глікозильних зв'язків, а також атака вільних радикалів у положеннях 1', 2' або 4' дезоксирибози (рис. 9) [5, 26, 27].

**Методи якісних і кількісних досліджень пошкоджень ДНК.** Методи дослідження оксидативних та інших пошкоджень ДНК можна розділити на дві групи. До першої належать методи, застосування яких для аналізу потребує гідролізу молекули, до другої – методи, за допомогою яких вивчають цілу молекулу [5, 7, 13, 17].

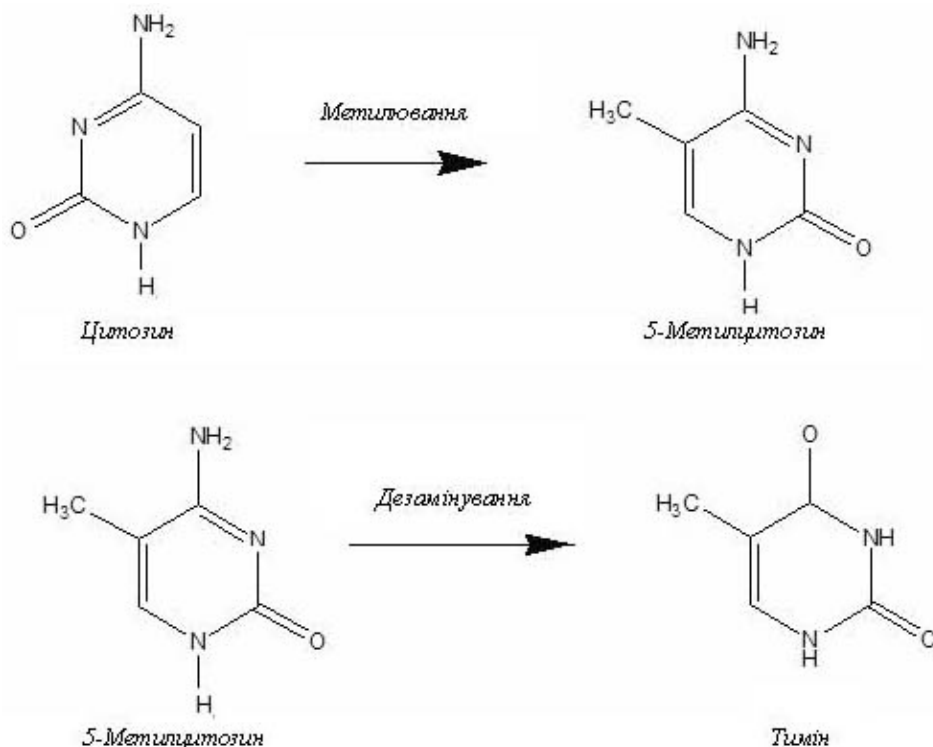


Рис. 8. Реакції метилування та подальшого дезамінування цитозину

ДНК має бути попередньо хімічно чи ензиматично гідролізована для проведення флуоресцентних, хроматографічних і деяких радіологічних досліджень. Найбільшою підгрупою є хроматографічні методи, найефективнішими серед них виявилися метод рідинної хроматографії з високою роздільною здатністю, поєднаний з електрохімічною детекцією (HPLC-ECD), а також метод газової хроматографії з мас-спектрометриєю (GC/MS) [3, 5, 7, 13, 17, 28].

При застосуванні методів, що належать до другої групи, використовують специфічні ферменти [3, 5]. Після ферментативної обробки матеріал аналізують за допомогою гель-електрофорезу одиночних клітин (SCGE), методу лужного розплітання [29] та ін.

Досить популярним є використання ферменту формамідопіримідин-N-глікозилази (fpg) та його еукаріотних гомологів (зокрема hOGG1), а також ендонуклеази III [30–33]. Існує ціла низка комерційних наборів для визначення пошкоджень за допомогою ферментів. Найчастіше застосовують бактеріальні глікозилази, проте деякі виробники пропонують набори з людськими та дріжджовими гомологами цих ензимів [17, 31]. Зручним для вико-

ристання ферментом є fpg, що складається з 269 амінокислотних залишків і має молекулярну масу 30,2 кДа. Ген, що кодує цей білок, містить 807 пар нуклеотидів. Fpg розпізнає 8-охо-G, формамідопіримідини (пурини з відкритим імідазольним кільцем) та має здатність вирізати AP-сайти, тобто володіє ліазною активністю. Він максимально активний при значеннях pH від 6,5 до 8,5, fpg не потребує двовалентних катіонів [30, 33].

Метод проби комет полягає у визначенні ступеня пошкодження ДНК, виходячи із співвідношення довжини «хвоста», який утворюється при русі пошкоджених ділянок нуклеїнової кислоти під час електрофорезу, до діаметру ядра, де концентрується неушкоджена ДНК [13]. Для візуалізації використовують флуоресцентні барвники, такі як акридиновий оранжевий, бромистий етидіум, бромистий пропідіум та найсучасніший SYBR®Green [34].

Цілу ДНК аналізують також імунологічними методами. До них належать тести типу ELISA (наприклад, ARP-проба), радіоімунний аналіз та метод «імуно-слот-блот». Ці методи є досить зручними, але недостатньо точними для кількісного аналізу [16, 17, 35].

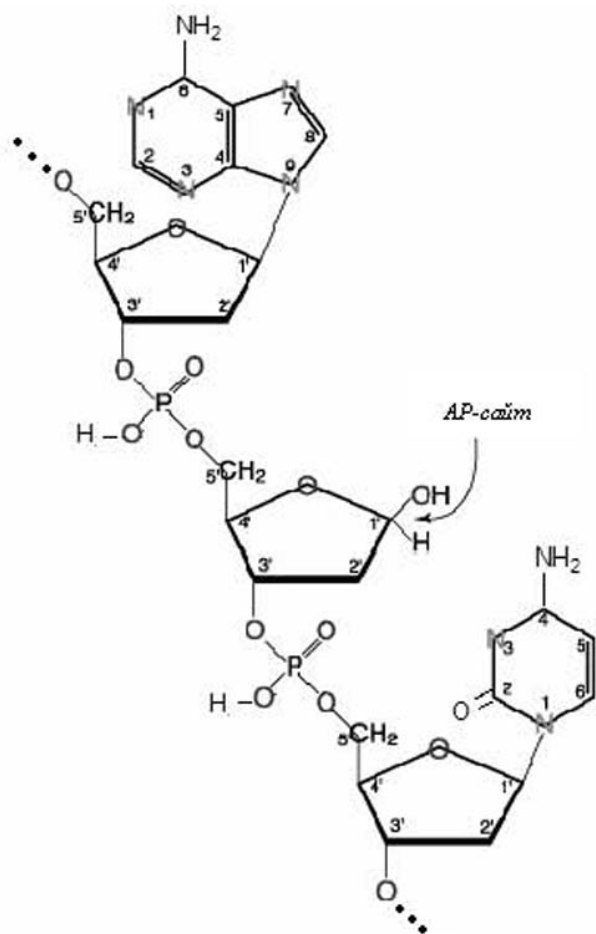


Рис. 9. Схематичне зображення можливого AP-сайта

Методи вивчення пошкоджень генетичного матеріалу розрізняють і за фактом втручання, їх поділяють на інвазивні та неінвазивні (наприклад, до останніх відносять визначення кількості пошкоджень ДНК у сечі) [17, 26, 36].

Підбір методів, за допомогою яких найраціональніше вивчати пошкодження ДНК, – дуже складна процедура. Декілька десятків років ведеться розробка найадекватнішої методики, проте проблема існує і донині. Різниця між результатами, отриманими за допомогою різних методів, вражає [17]. Так, за даними, одержаними методом GC/MS, кількість 8-ОНдГ у клітинах сягає сотень залишків на  $10^6$  нормальних гуанінів. Метод HPLC-ECD дав інший результат – приблизно 5–50 залишків на  $10^6$  гуанінів. Ензиматичні дослідження з використанням *frp* та подальшим вимірюванням методами проби комет або лужного розплітання виявили

близько 0,5 залишку 8-ОНдГ на  $10^6$  гуанінів [3, 13, 17, 28, 37, 38]. Такі значні розбіжності в даних пояснюються тим, що під час проведення дослідження з'являються артефакти, пов'язані із підготовкою матеріалу, виділенням ДНК тощо. Зокрема, стан досліджуваної молекули залежить від наявності певних ферментів, особливо – ендонуклеаз [3, 28, 37, 38].

Останнім часом набув популярності метод кількісної полімеразної ланцюгової реакції (Q-PCR). Він базується на здатності деяких форм пошкоджень ДНК блокувати реплікацію, знижуючи ефективність ампліфікації [7, 37].

У літературних джерелах існують поодинокі кількісні дані. Число подій, що можуть викликати деструктивний вплив на генетичний матеріал клітини, за різними даними, сягає від 74000 до 500000 на добу [28]. Відомо, що утворення 8-ОНдГ або майже еквівалентного йому 8-охо-G є найпоширенішим результатом оксидативних пошкоджень (від 7500 до 200000 модифікацій у клітині за добу) [16, 28]. Частота утворення 7-метилгуаніну у клітині складає приблизно 4000 подій на добу. 3-Метиладенін також є досить поширеною видозміненою основою з високою частотою утворення (кілька сотень подій на добу) [39]. Поява AP-сайтів – одна з найпоширеніших форм пошкоджень: щодня втрачається до 200000 основ. За деякими даними, спонтанна депуринізація за нормальних умов відбувається з частотою 10000 основ на клітину за добу [27].

При визначенні кількості певних пошкоджень (наприклад, 8-охо-G) виникає ціла низка проблем. Проведено роботи зі штучно синтезованими олігонуклеотидами з відомою кількістю 8-охо-G [17]. Отримані результати продемонстрували, що метод HPLC суттєво занижує виявлений рівень пошкодження. У дослідженнях, де для очищення від білків використано фенол, навпаки, виявлено завищені значення кількості пошкоджень, бо, як відомо, фенол сам здатний пошкоджувати нуклеїнові кислоти. При застосуванні йодиду натрію знайдено нестачу 8-охо-G, що можна пояснити здатністю йодиду натрію репарувати це пошкодження [3, 13, 17, 40].

Деякі вчені вважають, що, можливо, найкращим способом обійти вищезазначені проблеми є визна-



чення пошкоджень ДНК в інтактних клітинах. Для цього придатні імунологічні методи. Однак, хоча використання антитіл є досить вдалим засобом для візуалізації пошкоджень, проте він залишається напівкількісним. Проба комет – також зручний метод, але при його застосуванні теж знижується кількість 8-охо-G. Це, очевидно, пов'язане з тим, що ферменти інколи не дістаються «глибин» хроматину, а два пошкодження, локалізовані поруч, можуть бути вирізані як одне. Інший відомий метод – GC/MS, як уже зазначалося вище, завищує кількісні показники [7, 17, 28, 40, 41]. Отже, жодна з відомих на сьогодні методик не дає змоги точно визначити кількість пошкоджень ДНК, бо розбіжності між результатами досить значні. Тому часто користуються порівняльним аналізом, без вказівок на точні чисельні значення [7, 13, 17, 28].

Також зазначимо, що достатньо велику увагу сьогодні приділяють вивченню пошкоджень мітохондріальної ДНК. Вважається, що саме за ступенем її оксидативного ураження можна визначати вік організму. Проте, за іншою точкою зору, виділення самої мітохондріальної ДНК супроводжується значними оксидативними пошкодженнями, що суттєво завищує виявлений рівень мітохондріальних пошкоджень [37, 38, 40, 42].

Таким чином, зараз не існує чітких даних з приводу кількості 8-охо-G та інших модифікацій у нормальних молодих, старіючих чи хворих клітинах. Усі результати можна вважати лише відносно коректними через відсутність єдиного спільного коефіцієнта перерахунку кількості пошкоджень. Складність отримання кількісних даних полягає також у тому, що точні кількості певних пошкоджень у клітині під впливом певного агента можна спостерігати тільки в момент впливу цього агента, адже системи репарації працюють постійно. Тому методи вивчення пошкоджень ДНК удосконалюються та модифікуються для підвищення їхньої чутливості, а також для максимального зниження рівня пошкоджень під час попередньої обробки матеріалу та усунення артефактів [1, 3, 5, 7, 17, 28]. При визначенні кількості певних, наприклад оксидативних, пошкоджень під час окремих порушень у клітині часто постає питання: чим є пошкодження ДНК – причиною або ж наслідком?

Підтримання цілісності геному є надзвичайно важливим моментом для належного функціонування організмів, що ускладнюється наявністю цілого спектра різноманітних чинників, здатних порушувати постійність геному.

Біологічним наслідкам та значенню оксидативних пошкоджень ДНК присвячено багато робіт, тому в межах даного огляду буде лише зазначено деякі загальні положення.

Проблема оксидативного стресу вважається однією з найактуальніших біологічних проблем уже протягом декількох десятків років. Однією із складових цього явища є пошкодження генетичного матеріалу, що виникають у результаті дії активних форм кисню на ДНК [1–7, 17].

На сьогодні найбільшу увагу привертає до себе питання ролі оксидативного пошкодження ДНК у процесах мутагенезу, канцерогенезу та старіння [1–7, 12, 13]. Низку публікацій присвячено вивченню вільно-радикальної теорії вікових змін організму. Застосування різних методів кількісного аналізу маркерів оксидативного стресу (наприклад, 8-ОНdG) дають, на жаль, різні результати [1, 7, 17, 28]. Однак очевидним видається той факт, що певні модифікації призводять до мутацій, стимулюють канцерогенез, активуючи протоонкогени та пригнічуючи канцеровисупресори, впливають на регуляцію клітинного циклу, протікання процесів транскрипції, реплікації та беруть участь у розвитку процесів старіння [1, 3, 7, 43]. Відомо також, що окремі пошкодження ДНК з'являються при деяких серцево-судинних захворюваннях, хворобах нервової системи тощо. Однією з гіпотез старіння є пригнічення діяльності систем репарації з віком, що призводить до накопичення помилок у ДНК [1–8, 32].

Сьогодні не викликає сумніву, що хімічна реорганізація ДНК може спричинити суттєві зміни: транзиції, трансверсії та делеції [1, 3, 4]. З'ясувалося, що найвищу мутагенну здатність мають O<sup>6</sup>-метилгуанін та O<sup>4</sup>-алкілтимін [20–22]. 8-охо-G також є мутагеном – у складі нуклеозидтрифосфату він вбудовується в ДНК навпроти аденіну ДНК-матриці, викликаючи G:C → T:A трансверсії [1–7]. Проте 8-охо-G не блокує реплікації та транскрипції і не впливає на клітинний цикл [3] на відміну від

тимінгліколю, що є досить поширеним ушкодженням, яке перешкоджає реплікації і є потенційно летальним для клітини [1]. Також здатні блокувати роботу полімераз формамідопіримідини [1, 4]. Мутагенним є дезамінування 5-метилцитозину, що призводить до утворення Т:G пари [1, 20]. Крім здатності викликати мутації, пошкодження ДНК активують процеси малігнізації клітин [1, 6, 12, 44]. Канцерогенез може протікати за двома основними сценаріями: окремі пошкодження ДНК здатні активувати протоонкогени, зокрема, *p21*, *c-myc*, *c-Ha-ras* або пригнічувати гени-канцеровисупресори, наприклад, *p53*, *Rb* [43, 45, 46]. Отримано беззаперечні дані, що свідчать про наявність надлишку 8-OHdG *in vivo* у *ras*-онкогені та в гені-канцеровисупресорі *p53* у разі захворювання на рак легенів, кишечника та печінки [47–51]. Доведено, що рак молочної залози теж пов'язаний з накопиченням пошкоджень ДНК, спричинених окисненням та алкілуванням [52]. Встановлено зв'язок між кількістю накопичених з віком оксидативних пошкоджень ДНК та раком простати [53].

Відомо два типи впливу модифікованої ДНК на клітинний цикл: активуючий, який спричиняє малігнізацію, та гальмівний, що призводить до апоптозу [1, 42, 54].

Особливо варто підкреслити, що роботи останніх років засвідчують наявність зростання кількості оксидативних пошкоджень ДНК під час хронічних запальних процесів. Як результат чітко встановлюється причинно-наслідковий зв'язок між загальним станом клітини та станом її генетичного матеріалу [1, 5, 6, 28].

Процеси старіння організму звичайно пов'язують як із запрограмованими подіями, так і з накопиченням помилок. Найпопулярнішою вважається вільно-радикальна теорія старіння, або теорія оксидативного стресу, яка включає положення, що пояснюють і запрограмованість, і накопичення помилок [42]. Згідно з цією теорією, за час життя організму (навіть при нормальному метаболізмі) утворюється велика кількість вільних радикалів, серед яких активні форми кисню, що спричиняють пошкодження біологічних макромолекул з наступними розладами регуляторних процесів [1, 15, 40, 42, 44]. Ідею участі вільних радикалів у процесах старіння вису-

нуто в середині 50-х років минулого століття Гарманом. У 1990 році вже чітко було визначено можливість впливу окиснення ДНК на протікання старіння [36, 40]. Отримані результати продемонстрували збільшення у 2–3 рази кількості 8-охо-G з віком у піддослідних щурів. Однак одержані результати не виявилися надто переконливими, залишився сумнів через те, що дослідження виконували на ізольованій з використанням фенолу ДНК, внаслідок чого існувала висока ймовірність появи артефактів [1, 3, 7]. Деякі вчені переконливішим вважають вивчення ДНК, ізольованої з використанням йодиду натрію. Така методика дозволяє отримати точніші показники без додаткового утворення пошкоджень [14, 17]. За цими даними, рівень оксидативних пошкоджень ДНК у гризунів значно зростає з віком (з 3 залишків 8-OHdG на  $10^8$  залишків у молодих мишей до 8 залишків на  $10^8$  у старих) [7, 14, 17, 31, 42].

Значну кількість робіт присвячено порівнянню кількості пошкодженої ДНК у мітохондріях та ядрі. Вважається, що з віком найбільше помилок накопичується саме у мітохондріальній ДНК [37, 38]. Досить небезпечним явищем є процеси алкілування ДНК: його наслідком можуть стати мутації та розвиток пухлин. 3-Метиладенін впливає на процес реплікації,  $O^6$ -метилгуанін та  $O^4$ -алкілтимін вважають мутагенними пошкодженнями, а 7-метилгуанін – відносно нешкідливою сполукою (що можна пояснити недостатнім вивченням її особливостей) [20, 22, 26]. Однак існує думка, що метилування цитозину може бути нормальним явищем (один з епігенетичних механізмів). Це окрема тема, якій присвячено значну кількість публікацій [55–57]. У соматичних клітинах дорослого організму людини метилування найчастіше спостерігається в CpG-ділянках (близько 70 % їх є метильованими), а в ембріональних стовбурових клітинах відмічено так зване не-CpG метилування. На ранніх стадіях розвитку (від запліднення до стадії восьми клітин) еукаріотний геном є неметильованим. Починаючи від стадії восьми клітин і до морули відбувається метилування *de novo*. На стадії бластули завершуються процеси метилування, які забезпечують епігенетичне репрограмування [55–57].

Питання репарації не є темою даного огляду, проте необхідно зазначити, що саме наявність систем ефективного виправлення пошкоджень ДНК забезпечує стабільний стан молекули. Детальніше тему репарації розглянуто у багатьох роботах [26, 32].

Репарацію основної маси пошкоджень ДНК пов'язують з наявністю ексцизійної репарації основ (BER) та ексцизійної репарації нуклеотидів (NER) [20, 26]. Перший тип репарації є швидким та відносно простим. Він вимагає участі декількох груп ферментів: глікозилаз, ендонуклеаз, екзонуклеаз, полімераз та ліаз. Зауважимо, що усунення ушкоджених ділянок відбувається досить швидко: за деякими даними, клітина епітелію легень людини здатна позбавитись від шкідливих модифікацій за 8–65 хв (залежно від форми пошкодження) [7]. BER є основним способом виправлення помилок, утворених у результаті алкілування та окиснення ДНК. Дефекти ексцизійної репарації основ призводять до нестабільності геному та впливають на клітинний цикл, що веде до канцерогенезу або апоптозу [1, 26, 32].

Ексцизійна репарація нуклеотидів забезпечує знешкодження помилок на ділянці у декілька нуклеотидів (вирізання циклобутанових димерів, міжмолекулярних зшивок тощо). Цей тип репарації вимагає більше часу та обумовлений діяльністю більш ніж 20 видів ферментів. Виділяють два підтипи NER: глобальну репарацію геному та репарацію, пов'язану з транскрипцією. При порушеннях NER виникають різноманітні захворювання, наприклад, ксеродерма, трихотіодистрофія та синдром Кокейна [1, 7, 20, 26, 32].

Модифікації, утворені в результаті реакцій алкілування, репаруються за участі високоспеціалізованих ферментів алкілтрансфераз [26].

Важливим є виправлення продуктів дезамінування азотистих основ. Транзиції як наслідок цих пошкоджень виявляються при спадкових хворобах, що робить особливо небезпечною цю групу модифікацій. Виправляють порушення, викликані дезамінуванням, ферменти Т:G ДНК-глікозилаза, урацил-ДНК-глікозилаза та ін. [20, 26].

Частина пошкоджень може бути ліквідована прямою елімінацією хімічних груп. Так, для вирізання O<sup>6</sup>-метилгуаніну існує фермент з вузькою суб-

стратною специфічністю – MGMT – O<sup>6</sup>-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза [23, 26].

Виправлення сайтів втрати основ здійснюється AP-ендонуклеазами [27].

Надзвичайно небезпечними є дволанцюгові розриви ДНК. Вони призводять до летальних для клітини наслідків. Дволанцюгові розриви утворюються при перевантаженні молекули різними ушкодженими компонентами, які з'явилися під впливом сильного деструктивного агента, наприклад радіації. Виправлення таких пошкоджень проходить важко [20, 26, 32].

Більшість пошкоджень ДНК, що утворюються у клітині, репарується. Але їхнє надмірне накопичення може призвести до незворотних порушень, у тому числі до летальних наслідків [1, 7, 26, 58, 59].

Насамкінець зазначимо, що відсутність чітких кількісних, а інколи і якісних результатів дослідження пошкоджень ДНК викликає необхідність детального вивчення цієї проблеми. Важливим є підбір адекватної методики з урахуванням форми пошкодження та типу досліджуваних клітин. Деякі форми пошкоджень ще недостатньо вивчені через їхні біохімічні особливості, а деякі – у зв'язку з невеликою кількістю в клітинах [1–7]. Слід врахувати також той факт, що, як показує практика, результати, одержані при дослідженні ізольованої ДНК та генетичного матеріалу інтактних клітин, можуть суттєво відрізнятись. Окрім того, ті порушення ДНК, які визначаються у клітинах, є, насправді, рівноважним станом пошкоджуваності геному. Дуже мало робіт, що виявляють пошкодження у динаміці. Всі кількісні визначення модифікацій ДНК показують їхній певний сталий рівень. Накопичення пошкоджень – результат порушення співвідношення «пошкодження–репарація» [1, 7].

Практично не викликає сумніву, що при отриманні даних про стан ДНК можна зробити висновок стосовно функціонального стану клітини. Вивчення особливостей пошкоджень ДНК також дасть змогу краще зрозуміти процеси канцерогенезу та старіння.

N. V. Skrypnyk, O. O. Maslova

## Oxidative DNA damage

### Summary

Several characteristics of the basic types of oxidative DNA damage are analysed in the present work. They are as follows base and sugar modifications lesions, single-strand and double-strand breaks, apurinic/apyrimidinic sites and DNA-proteins cross-links. The chemical structure of the most investigated types of oxidative DNA damage is shown. The most common genotoxic agents (reactive oxygen species, free radicals, alkylating agents) are also discussed. The methods of identification and measurement of oxidative DNA damage are considered.

Keywords: oxidative stress, DNA damage, genotoxic agents.

H. B. Скрпник, О. А. Маслова

## Оксидативные повреждения ДНК

### Резюме

Проанализированы некоторые характеристики основных типов оксидативных повреждений ДНК: модификации азотистых оснований и дезоксирибозы, одноцепочечные и двухцепочечные разрывы, апуриновые/апириимидиновые сайты, межвалентные взаимодействия ДНК с белками. Приведена химическая структура наиболее изученных форм оксидативных повреждений ДНК. Указаны самые распространенные генотоксические факторы (активные формы кислорода, свободные радикалы, алкилирующие агенты). Рассмотрены современные методики качественных и количественных исследований повреждений ДНК.

Ключевые слова: оксидативный стресс, повреждения ДНК, генотоксические агенты.

## ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease // *The FASEB J.*—2003.—**17**.—P. 1195–1214.
- Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA // *Free Radical Biol. and Med.*—1991.—**10**.—P. 225–242.
- Epe B. DNA damage profiles induced by oxidizing agents // *The FASEB J.*—1997.—**2**.—P. 222–240.
- Epe B., Hegler J. Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting // *Nucl. Acids Res.*—1999.—**3**.—P. 458–469.
- Cadet J., Berger M., Douki T., Ravanat J. L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2002.—**86**.—P. 8764–8797.
- Wiseman H., Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer // *Biochem. J.*—1996.—**1**.—P. 313–314.
- Beckman K. B., Ames B. N. Oxidative decay of DNA // *J. Biol. Chem.*—1997.—**272**.—P. 19633–19636.
- Кулиский В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // *Соросовский образоват. журн.*—1999.—№ 1.—С. 2–6.
- Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия—М.: Мир, 1984—1985—Т. 1–3.
- Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // *Physiol. Rev.*—1979.—**59**.—P. 527–605.
- Marnett L. J. Oxyradicals and DNA damage // *Carcinogenesis.*—2000.—**21**.—P. 361–370.
- Jackson A., Loeb L. A. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer // *Mutat. Res.*—2001.—**477**.—P. 7–21.
- Collins A. R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols // *Amer. J. Clin. Nutr.*—2005.—**81**.—P. 261–267.
- Hamilton M. L., Remmen H. V., Drake J. A., Yang H., Guo Z. M., Kewitt K., Walter C. A., Richardson A. Does oxidative damage to DNA increase with age? // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—**98**.—P. 10469–10474.
- Osterod M., Hollenbach S., Hengstler J. G., Barnes D. E., Lindahl T., Epe B. Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice // *Carcinogenesis.*—2001.—**22**.—P. 1459–1463.
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.*—1993.—**362**.—P. 709–715.
- Halliwell B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far can we come? // *Am. J. Clin. Nutr.*—2000.—**72**.—P. 1082–1087.
- Pfalum M., Boiteux S., Epe B. Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells // *Carcinogenesis.*—1994.—**15**.—P. 297–300.
- Epe B., Pfalum M., Boiteux S. DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems // *Mut. Res.*—1993.—**299**.—P. 135–145.
- Патрушев Л. И. Экспрессия генов – М.: Наука, 2000.—818 с.
- Zhao C., Hemminki K. The *in vivo* levels of DNA alkylation products in human lymphocytes are not age dependent: an assay of 7-methyl- and 7-(2-hydroxyethyl)-guanine DNA adducts // *Carcinogenesis.*—2003.—**23**.—P. 307–310.
- Stern L. L., Mason J. B., Selhub J., Choi S. W. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*—2000.—**9**.—P. 849–853.
- Halford S., Rowan A., Sawyer E., Talbot I., Tomlinson I. O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase in colorectal cancers: detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:C A:T transitions // *Gut.*—2005.—**54**.—P. 797–802.
- Fortini P., Raspaglio G., Falchi M., Dongliotto E. Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay // *Mutagenesis.*—1996.—**11**.—P. 169–175.
- Xiao W., Samson L. *In vivo* evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukaryotic cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—**90**.—P. 2117–2121.
- Frosina G. Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA // *Eur. J. Biochem.*—2000.—**267**.—P. 2135–2149.
- Nakamura J., Swenberg J. A. Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues // *Cancer Res.*—1999.—**59**.—P. 2522–2526.
- Bont R., Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data // *Mutagenesis.*—2004.—**19**.—P. 169–185.
- Kohn K. W., Erickson L. C., Ewig R. A., Friedman C. G. Fractional of DNA from mammalian cells by alkaline elution // *Biochemistry.*—1976.—**15**.—P. 4629–4635.



30. Boiteux S., O Connor T. R., Lederer F., Laval J. Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of fpg structural gene and overproduction of the protein // *EMBO J.*—1987.—**6**.—P. 3177–3183.
31. Rosenquist T. A., Zharkov D. O., Grollman A. P. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—**94**.—P. 7429–7434.
32. Wilson D. M., Thompson L. H. Commentary life without DNA repair // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—**94**.—P. 12754–12757.
33. Morland I., Rolseth V., Luna L., Rognes T., Bjrrds M., Seeberg E. Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA // *Nucl. Acids Res.*—2002.—**30**.—P. 4926–4936.
34. Kassie F., Parzefall W., Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies // *Mutat. Res.*—2000.—**3**.—P. 463–533.
35. Santella R. M. Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans // *Cancer Epidemiol., Biomarkers & Prevention.*—1999.—**8**.—P. 733–739.
36. Fraga C. G. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—**87**.—P. 4533–4537.
37. Yakes F. M., Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—**94**.—P. 514–519.
38. Anson R. M., Hudson E., Bohr V. A. Mitochondrial endogenous oxidative damage has been overestimated // *FASEB J.*—2000.—**14**.—P. 355–360.
39. Rydberg B., Lindahl T. Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction // *EMBO J.*—1982.—**1**.—P. 211–216.
40. Balaban R. S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging // *Cell.*—2005.—**120**.—P. 483–495.
41. Jaruga P., Speina E., Gackowski D., Tudek B., Olinski R. Endogenous oxidative DNA base modifications analysed with repair enzymes and GC/MS technique // *Nucl. Acids Res.*—2000.—**15**.—P. 416–425.
42. Wei Y. H., Lee H. C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging // *Exp. Biol. and Med.*—2002.—**27**.—P. 671–682.
43. Loft S., Mrller P. Oxidative DNA damage and human cancer: need for cohort studies // *Antioxidants & Redox Signal.*—2006.—**8**.—P. 1021–1029.
44. Peter H. Free radicals and human disease // *CRC handbook of free radicals and antioxidants.*—1989.—**1**.—P. 209–221.
45. Zurer I., Hofseth L. J., Cohen Y., Xu-Welliver M., Hussain S. P., Harris C. C., Rotter V. The role of p53 in base excision repair following genotoxic stress // *Carcinogenesis.*—2004.—**1**.—P. 11–19.
46. Brash D. E., Ziegler A., Jonason A. S., Simon J. A., Kunala S., Leffell D. J. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion // *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*—1996.—**2**.—P. 136–142.
47. Narasimhaiah R., Tuchman A., Lin S. L., Naegele J. R. Oxidative damage and defective DNA repair is linked to apoptosis of migrating neurons and progenitors during cerebral cortex development in Ku70-deficient mice // *Cerebral. Cortex.*—2005.—**15**.—P. 696–707.
48. Bohr V. A., Stevnsner T., de Souza-Pinto N. C. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells // *Gene.*—2002.—**286**.—P. 127–134.
49. Cao D., Wei C., Chen L., Huang J., Yang S., Diehl A. M. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease // *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.*—2004.—**287**.—P. 1070–1077.
50. Muller-Vogt U. S., Maurer J. E. E., Grabenbauer G. G., Distel L. V. R., Iro H., Steinhart H. Altered DNA repair capacity in young patients suffering from multiple cancers // *Int. J. Mol. Med.*—2003.—**11**.—P. 669–674.
51. Braig M., Schmitt C. A. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development // *Cancer Res.*—2006.—**66**.—P. 2881–2884.
52. Anderson K. M., Jaruga P., Ramsey C. R., Gilman N. K., Green V. M., Rostad S. W., Emerman J. T., Dizdaroglu M., Malins D. C. Structural alterations in breast stromal and epithelial DNA: the influence of 8,5'-cyclo-2-deoxyadenosine // *Cell Cycle.*—2006.—**5**.—P. 1240–1244.
53. Malins D. C., Johnson P. M., Wheeler T. M., Barker E. A., Polissar N. L., Vinson M. A. Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer // *Cancer Res.*—2001.—**61**.—P. 6025–6028.
54. Dunkern T. R., Kaina B. Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient chinese hamster cells // *Mol. Biol. Cell.*—2002.—**13**.—P. 348–362.
55. Weaver I. C. Epigenetic programming by maternal behavior // *Nat. Neurosci.*—2004.—**7**.—P. 791–792.
56. Jones P. A., Baylin S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer // *Nat. Rev. Genet.*—2003.—**3**.—P. 415–428.
57. Singal R., Ginder G. D. DNA methylation // *Blood.*—1999.—**93**.—P. 4059–4070.
58. Sinha R. P., Hader D. P. UV-induced DNA damage and repair: a review // *Photochem. and Photobiol. Sci.*—2002.—**1**.—P. 225–236.
59. Sekiguchi M., Tsuzuki T. Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention // *Oncogene.*—2002.—**21**.—P. 8895–8904.

УДК 577.21+575.857  
Надійшла до редакції 04.06.07