

УДК 577.342 + 577.346

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА КСАНТОЗИНА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ¹Асадуллина Н.Р., ^{1,2}Гудков С.В., ^{1,2}Брусков В.И.¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;²Пушкинский государственный университет, Пушкино, e-mail: micronelly@rambler.ru

Окислительный стресс является причиной многих патологических процессов в клетке, поэтому изучение новых природных антиоксидантов, нейтрализующих его последствия, является актуальной задачей. С помощью усиленной хемилюминесценции в системе люминол-4-йодофенол-пероксидаза и флуоресцентного зонда – кумарин-3-карбоновой кислоты установлено, что ксантозин (Хао) в концентрациях 0,02–1 мМ уменьшает радиационно-индуцированное образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах. Методом иммуноферментного анализа с использованием специфических к 8-оксогуанину (8-ОГ) антител показано, что Хао в концентрациях 0,02–1 мМ уменьшает индуцированное рентгеновским излучением образование 8-ОГ в ДНК. Используя микроядерный тест, выявлено, что Хао при внутрибрюшинном введении уменьшает количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами у мышей, облученных в дозе 1,5 Гр.

Ключевые слова: ксантозин, активные формы кислорода, рентгеновское излучение

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF XANTHOSINE UNDER X-RAYS EXPOSURE¹Asadullina N.R., ^{1,2}Gudkov S.V., ¹Bruskov V.I.¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS;²Pushchino State University, Pushchino, e-mail: micronelly@rambler.ru

Oxidative stress is the cause of many pathological processes in cells. Thereby the study of new natural antioxidants eliminating its consequences is an actual task. Using the enhanced chemiluminescence with luminol-p-iodophenol-peroxidase system and coumarin-3-carboxylic acid, it was shown that xanthosine (Xao) in the concentration 0,02–1 mM reduced radiation induced formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in aqueous solutions. Using enzyme-linked immunosorbent assay with specific antibodies against 8-oxoguanine (8-OG) it was established that Xao in the concentration 0,02–1 mM decreases the formation of 8-OG, a key biomarker to DNA damage by reactive oxygen species under the action of X-rays. By micronucleus test it was established that intraperitoneal administration Xao reduced the amount of polychromatophilic erythrocytes with micronucleus in mice irradiated by 1,5 Gy.

Keywords: xanthosine, reactive oxygen species, X-ray radiation

Активные формы кислорода (АФК) образуются как в процессе нормального аэробного клеточного метаболизма, так и в результате воздействия ряда факторов окружающей среды, таких как ионизирующее и УФ-излучения, тепло, канцерогены и др. С одной стороны, АФК, образующиеся в клетках и межклеточном пространстве, могут вызывать повреждения биологических структур ДНК, белков, липидов и др., а с другой, они выполняют сигнальную функцию, направленную на нейтрализацию окислительного стресса, обусловленного АФК [7]. Во всех живых организмах существуют системы антиоксидантной защиты клеток, предохраняющие их от избыточного содержания АФК, представленные специализированными ферментами и низкомолекулярными антиоксидантами. Способность снижать концентрацию АФК обусловлена их реакцией с легко окисляемыми группами антиоксидантов. Ранее было установлено, что среди природных пуриновых соединений – гуанозин (Guo), инозин (Ino) и гуанозин-5-монофосфат (ГМФ) обладают ярко выраженными антиоксидантными и радиозащитными свойствами [1, 8, 6].

В данной работе исследованы антиоксидантные свойства ксантозина (Хао), который представляет собой природный продукт катаболизма пуринов.

Цель исследования: с помощью различных тест-систем изучить антиоксидантные свойства ксантозина.

Материалы и методы исследования

Воздействие ионизирующего излучения

Облучение проводили на рентгеновской терапевтической установке РУТ-15 (Мосрентген, Россия) в дозе 7 Гр (1 Гр/мин, фокусное расстояние 37,5 см, ток 20 мА, напряжение 200 кВ) или 4,5 Гр/мин (для иммуноферментного анализа) фокусное расстояние 19,5 см, ток 20 мА, напряжение 200 кВ).

Определение перекиси водорода

Для количественного определения H_2O_2 использовали высокочувствительный метод усиленной хемилюминесценции в системе люминол – 4-йодофенол – пероксидаза. Ксантозин в концентрациях 0,02; 0,05; 0,1; 1 мМ в фосфатном буфере (1 мМ, pH 7,4) подвергали воздействию рентгеновского излучения в стеклянных флаконах (Beckman, США). Интенсивность хемилюминесценции измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Бета-1 («Медиаппаратура», Украина). Калибровку измерений осуществляли с помощью H_2O_2 известной концентрации [5].

Определение гидроксильных радикалов

Гидроксильные радикалы (ОН-радикалы) определяли с помощью специфического флуоресцентного зонда, кумарин-3-карбоновой кислоты, как описано ранее [6]. Хао в концентрациях 0,02; 0,05; 0,1; 1 мМ в 1 мМ в фосфатном буфере, pH 7,4, облучали рентгеновским излучением в стеклянных флаконах. Интенсивность флуоресценции проб измеряли на спектрофлуориметре SFM 25A («Kontron Instruments», Италия) при $\lambda = 400$ нм и $\lambda = 450$ нм в зеркальной кварцевой кювете при комнатной температуре. Для калибровки результатов образования ОН-радикалов использовали растворы аутентичного препарата 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты известной концентрации [4].

Иммуноферментный анализ

Детальное описание использованного метода иммуноферментного анализа опубликовано ранее [7]. Ксантозин в концентрациях 0,02; 0,05; 0,1; 1 мМ в растворе ДНК облучали рентгеновским излучением в пробирках (Erpendorf, Germany). Содержание 8-оксигуанина определяли на основании известной величины его радиационно-химического выхода в ДНК.

Животные

В экспериментах использовались 6-недельные самцы белых мышей (Kv:SHK) (18–20 г). Все экспериментальные протоколы получили одобрение комитета по биоэтике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Микроядерный тест

Хао вводили мышам внутрибрюшинно (45 мкг/г в 0,14 М NaCl) за 15 мин до и через 15 мин после облучения в дозе 1,5 Гр. Данная величина дозы была выбрана как наиболее оптимальная, так как линейная зависимость «доза-эффект» для мышей Kv:SHK при образовании МЯ в ПХЭ проявляется в диапазоне доз 0–1,5 Гр [2]. Мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации через 24 ч после облучения, поскольку максимальный выход ПХЭ с МЯ наблюдается примерно через сутки после воздействия ионизирующей радиации. Процедуры, связанные с изготовлением и окрашиванием гистологических препаратов, описаны ранее [1]. Подсчет ПХЭ, содержащих МЯ, осуществляли с помощью светового микроскопа ЛОМО «МикМед-2» (Россия) с иммерсионным объективом при увеличении $\times 1000$. Ана-

лизировали данные для 5 особей на одну экспериментальную точку, с подсчетом не менее 2000 ПХЭ на мышь.

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что АФК образуются при радиолизе воды под действием ионизирующего излучения. Наиболее долгоживущей разновидностью АФК является H_2O_2 , которая может оказывать как повреждающее действие на различные клеточные структуры, так и играть сигнально-регуляторную роль, связанную с активацией процессов восстановления повреждений или апоптоза [3]. Количество образовавшейся H_2O_2 линейно зависит от поглощенной дозы в диапазоне 1–7 Гр. Исследовано влияние Хао в концентрациях 0,02; 0,05; 0,1 и 1 мМ на образование H_2O_2 в фосфатном буфере под воздействием рентгеновского излучения в дозе 7 Гр (табл. 1). Доза 7 Гр является летальной для большинства млекопитающих. Как видно из результатов табл. 1, Хао уменьшает индуцированное рентгеновским излучением образование H_2O_2 в растворе при увеличении его концентрации до 1 мМ в 3,9 раза. Гидроксильные радикалы являются наиболее реакционно-способной разновидностью АФК и приводят к окислительным повреждениям биологических макромолекул. Исследовано влияние Хао на образование ОН-радикалов в фосфатном буфере под действием рентгеновского излучения в дозе 7 Гр (табл. 1) с использованием специфического для ОН-радикалов флуоресцентного зонда – кумарин-3-карбоновой кислоты. В диапазоне доз 1–7 Гр наблюдается линейная зависимость эффекта от величины дозы. Хао в диапазоне концентраций 0,02–1 мМ снижает генерацию ОН-радикалов в три раза.

Таблица 1

Влияние ксантозина в диапазоне концентраций 0,02–1 мМ на генерацию перекиси водорода, гидроксильных радикалов в фосфатном буфере (1 мМ; pH 7,4) и образование 8-ОГ в растворе ДНК, облученных в дозе 7 Гр. ФИД – фактор изменения дозы. Данные представлены как средние значения и их ошибки по трем независимым экспериментам

Воздействие	H_2O_2 , мкМ	ФИД	ОН-радикалы, мкМ	ФИД	8-ОГ на 10^5 гуанинов в ДНК	ФИД
7 Гр	$0,59 \pm 0,07$	-	$1,78 \pm 0,02$	-	$5,5 \pm 0,3$	-
7 Гр + Хао 0,02 мМ	$0,37 \pm 0,05^*$	1,6	$1,62 \pm 0,02^*$	1,1	$4,5 \pm 0,3^*$	1,2
7 Гр + Хао 0,05 мМ	$0,29 \pm 0,03^*$	2,0	$1,53 \pm 0,01^*$	1,2	$3,4 \pm 0,2^*$	1,6
7 Гр + Хао 0,1 мМ	$0,26 \pm 0,06^*$	2,3	$1,36 \pm 0,01^*$	1,3	$2,6 \pm 0,2^*$	2,1
7 Гр + Хао 1 мМ	$0,15 \pm 0,04^*$	3,9	$0,60 \pm 0,01^*$	3,0	$2,1 \pm 0,1^*$	2,6

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контроля (7 Гр) по критерию Стьюдента.

Известно, что окисление гуанина в ДНК приводит к образованию 8-ОГ, который является ключевым биомаркером повреждения ДНК АФК в процессе радиолиза ДНК. С помощью иммуноферментного анализа, с применением специфических к 8-ОГ антител исследовано влияние Хао на образование 8-ОГ в ДНК под действием рентгеновского излучения в дозе 7 Гр. Как показано в табл. 1, Хао в диапазоне концентраций 0,02–1 мМ снижает радиационно-индуцированное образование 8-ОГ в 2,6 раза. Добавление Хао к необлученной ДНК не влияет на увеличение образования 8-ОГ, из чего следует, что ксантозин не вступает в кросс-реакцию с первичными антителами.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что Хао способен снижать радиационно-индуцированную генерацию перекиси водорода, ОН-радикалов в водных растворах и образование 8-ОГ в ДНК *in vitro* (см. табл. 1). Наши данные согласуются с ранее опубликованными результатами по другим природным пуриновым соединениям. Ранее показано, что Guo, Ino [1] и ГМФ [6] проявляют антиоксидантные свойства. Хао более эффективно, по сравнению с Guo, Ino и ГМФ, уменьшает образование H_2O_2 и ОН-радикалов в водном растворе в концентрации 1 мМ. Антиоксидантная способность по этим тестам увеличивается к ряду Хао > ГМФ > Guo > Ino. Однако в слу-

чае образования 8-ОГ в ДНК антиоксидантный эффект увеличивался следующим образом: Guo > Ino > Хао > ГМФ.

Кроме исследования антиоксидантных свойств Хао *in vitro* проведены исследования его антиоксидантных свойств *in vivo* на мышах. Микроядерный тест является общепринятым методом для оценки эффективности различных защитных средств от генотоксических повреждений, таких как образование ПХЭ с МЯ в красном костном мозге. Было исследовано влияние Хао при его внутрибрюшинном введении мышам за 15 мин до воздействия рентгеновского излучения и через 15 мин после облучения в дозе 1,5 Гр на частоту образования МЯ в ПХЭ в костном мозге (табл. 2). При введении Хао необлученным животным не наблюдается изменения процента ПХЭ с МЯ. Как видно из табл. 2, процент ПХЭ с МЯ после воздействия рентгеновского излучения в дозе 1,5 Гр увеличился почти в 10 раз от 0,5 %, при отсутствии воздействия до 4,8 %. Введение Хао мышам до воздействия рентгеновского излучения привело к уменьшению частоты образования ПХЭ с МЯ примерно в 1,3 раза, при введении после – в 1,6 раза по сравнению с облученным контролем. При аналогичном введении Ino, Guo [1] и ГМФ [6] после облучения наблюдалось уменьшение в 1,5 и 1,7 раза соответственно.

Таблица 2

Влияние ксантозина (45 мкг/г), введенного внутрибрюшинно мышам за 15 мин до и через 15 мин после воздействия рентгеновского излучения в дозе 1,5 Гр, на частоту образования МЯ в ПХЭ в красном костном мозге мышей

Воздействие	Количество животных	Количество ПХЭ	Количество ПХЭ с МЯ	Процент ПХЭ с МЯ
0 Гр	5	10365	56	0,54 ± 0,07*
0 Гр + Хао	5	10236	51	0,50 ± 0,05*
1,5 Гр	5	10287	494	4,81 ± 0,42
1,5 Гр + Хао до облучения	5	10312	371	3,60 ± 0,30*
1,5 Гр + Хао после облучения	5	10312	319	3,10 ± 0,30*

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контроля (7 Гр) по критерию Стьюдента.

Защитный и антиоксидантный эффекты Хао *in vivo* и *in vitro* можно объяснить тем, что ксантозин имеет низкий окислительно-восстановительный потенциал (порядка 1,0 в Red/Ox) [9].

Другие возможные механизмы защитных свойств ксантозина *in vivo* могут быть связаны с влиянием его на процесс репарации ДНК и на нейтрализацию долгоживущих радикалов белка, которые способны генерировать АФК в течение длительного времени после воздействия ионизирующего

излучения [2]. Известно, что производные ксантина являются неконкурентными лигандами аденозиновых рецепторов A_1 и A_2 [10], которые вовлечены в сигнальные пути, связанные с процессами дифференцировки, иммунного ответа и др.

Заключение

Таким образом, установлено, что ксантозин проявляет существенные антиоксидантные свойства *in vitro* и *in vivo*. Полученные данные позволяют предполагать,

что ксантозин может эффективно препятствовать развитию окислительного стресса и может быть перспективным радиозащитным веществом.

Авторы благодарны д.ф.-м.н. А.Б. Гапееву за помощь в оформлении статьи. Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00949-а; 10-04-00800-а) и Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых (МК-108.2010.4).

Список литературы

1. Гуанозин и инозин как природные генопротекторы для клеток крови мышей при воздействии рентгеновского излучения // Радиационная биология. Радиозащита / С.В. Гудков и др. – 2006. – Т. 46, № 6. – С. 713–718.
2. Генотоксическое действие *in vivo* долгоживущих радикалов белка, индуцируемых рентгеновским облучением / О.Э. Карп и др. // Доклады Академии Наук. – 2010. – Т. 434, № 3. – С. 412–415.
3. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – С. 158–174.
4. Черников А.В., Брусков В.И. Генерация гидроксильных радикалов и других редокс-активных соединений в морской воде под действием тепла // Биофизика. – 2002. – Т. 47, № 5. – С. 773–781.
5. Образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах L-аминокислот при воздействии рентгеновского излучения и тепла // Биофизика / И.Н. Штаркман и др. – 2008. – Т. 53, № 1. – С. 5–13.

6. Asadullina N.R., Usacheva A.M., Smirnova V.S., Gudkov S.V. Antioxidative and radiation modulating properties of guanosine-5'-monophosphate // Nucleot. Nucleos. and Nucl. Acids. – 2010. – Vol. 29. – P. 786–799.

7. Bruskov V.I., Malakhova L.V., Masalimov Zk.K., Chernikov A.V. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA // Nucl. Acids. Res. – 2002. – Vol. 30. – P. 1354–1363.

8. Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Smirnova V.S., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA *in vitro* from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice // Radiat. Res. – 2006. – Vol. 165. – P. 538–545.

9. Warne T., Serrano-Vega M.J., Baker J.G., Moukhametzianov R., Edwards P. C., Henderson R., Leslie A.G., Tate C.G., Schertle G.F. Structure of a beta(1)-adrenergic G-protein coupled receptor // Nature. – 2008. – Vol. 454. – P. 486–491.

10. Xinhua Ji., Subramanian P., Helm D., Dryhurst G. Electrochemical Oxidation of Xanthosine. Isolation and Structure Elucidation of a New Dimeric Xanthine Nucleoside // J. Org. Chem. – 1990. – Vol. 55. – P. 1291–1296.

Рецензенты:

Гапеев А.Б., д.ф.-м.н., профессор, зав. лабораторией регуляции в биомедицинских системах Учреждения Российской Академии наук Института биофизики клетки РАН, г. Пущино;

Куликов А.В., д.б.н., ученый секретарь Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской Академии наук, г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 28.07.2011.