



УДК 541.15, 547.97

Хромато-масс-спектрометрический анализ продуктов взаимодействия аденозина с α -гидроксиэтильным радикалом

Стрединина Г.А., Николаева В.В., Фенин А.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

Поступила в редакцию 23.07.2016 г.

В работе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и с диодно-матричным (спектрофотометрическим) детектированием определены продукты взаимодействия аденозина с углерод-центрированным радикалом. Установлено, что основным процессом взаимодействия является присоединение гидроксиэтильного радикала в положение С8. Обнаружены продукты рекомбинации исходного аддукта с гидроксиэтильным радикалом. На основании проделанной работы, показана возможность исследования образования сшивок в молекуле ДНК под действием свободных радикалов.

Ключевые слова: радиоллиз, гидроксиэтильный радикал, аденозин, углерод-центрированные радикалы, сшивки ДНК, хромато-масс-спектрометрический анализ.

Determination of products of reactions adenosine with α -hydroxyethyl radical by HPLC MS

Stredinina G.A., Nikolaeva V.V., Fenin A.A.

Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

The free radicals are the one of the reasons of the variety diseases. Because of rising grade of the concertation of the free radicals are correlating with strong diseases as cancer, atherosclerosis and others. In our times the main interest is caused by oxygen reactions and nitrogen-centered radicals. In spite of this fact, all cases of the reaction of these radicals have with them a formation of carbon-centered radicals. This formation is registered in vitro.

It is well known fact, that the reactions of the hydroxyl radicals with DNA may produce a formation of covalent cross-links between DNA and lipid with DNA-DNA. Carbon-centered radicals are able to join in the nucleotide molecule at the double bonds. Therefore, we observe formation cross-links which are hardly repairable damages.

The aim of the research is to studying of the product of the hydroxyl radicals reactions with the molecule adenosine. The plan of the work on the interactions adenosine with hydroxyethyl radicals is: the extirpation of oxygen out of the solution, radiolysis of hydro-ethanolic solutions (the ethanol concentration is 5%, HCl is 0.1%, nucleoside 10-3 mol/l). The identification of the x-ray the products induced transformations performed by nucleoside by UPLC MS by «Acquity UPLC» with mass-detector TQD”.

The chemical species lose neutral fragment (m/z 132) which is the ribose. It was identified. It means that changes are made in base, but not in the carbohydrate branch. Because of the increasing mass, are discovered that the main interaction process is the connection hydroxyethyl radical with C8. In prospect, the first adduct interacts with the reactions of the recombination, which are disproportion of two adducts, simple dimerization of adduct with the hydroxyethyl radical and the dimerization with the elimination of the hydroxyl group.

In research work, was revealed the products of interaction adenosine with carbon-centered radical by reverse-phase HPLC with DAD and MS-detector. It was established that basic processes of interactions was addition hydroxyethyl radical in C8 position. The products of recombination hydroxyethyl radicals with ini-

tial adducts was been detected. Based on the results of the research conducted, has been shown of research of possibility cross-linker formation in DNA under the influence of free-radicals

Keywords: radiolysis, hydroxyethyl radical, adenosine, carbon-centered radicals, cross-linker formation in DNA, HPLC MS.

Введение

Свободные радикалы являются одной из причин различных заболеваний. С повышенным уровнем образования радикалов связывают такие заболевания как рак, атеросклероз [1]. В настоящее время, основной интерес вызывают реакции кислород и азот-центрированных радикалов, однако, во всех случаях реакции этих радикалов сопровождаются образованием углерод-центрированных радикалов. Образование углерод-центрированных радикалов зарегистрировано *in vitro*. Так в работе [2] зарегистрировано образование гидроксиэтильного радикала в печени мышей, как продуктов метаболизма этанола. Установлено также, что при метаболизме четыреххлористого углерода [3] образуется трихлорметильный радикал и углерод-центрированный радикал липидов. Метильные радикалы зарегистрированы также при метаболизме ацетальдегида [4] и третбутилпероксида [5].

Кроме непосредственного наблюдения радикалов методом спиновых ловушек, были обнаружены продукты взаимодействия метильного радикала с ДНК [5].

Известно, что реакции гидроксильного радикалов с ДНК могут приводить к образованию ковалентных сшивок между ДНК и белком и ДНК-ДНК. Углерод-центрированные радикалы также способны присоединяться по двойным связям в молекуле нуклеотида и, соответственно, привести к образованию сшивок, являющихся трудно репарируемыми повреждениями.

В работе [6] была исследована кинетика взаимодействия гидроксильных радикалов с основаниями и нуклеозидами, и определены продукты этих реакций для гидроксиметильного и гидроксипропильного радикалов. Однако, не были исследованы продукты реакции гидроксиэтильного радикала, и по полученным данным нельзя судить о возможности образования сшивок под действием этого радикала.

Целью нашей работы стало изучение продуктов реакции гидроксиэтильных радикалов с молекулой аденозина.

Эксперимент

В работе использован аденозин (Sigma-Aldrich), структурная формула приведена на схеме 1.

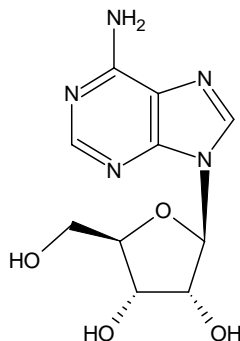


Схема 1. Структурная формула аденозина.

Для изучения взаимодействия нуклеозидов с гидроксиэтильными радикалами проводили радиолиз водно-этанольных растворов (концентрация спирта 5%, соляной

кислоты 0.1%, нуклеозидов $\sim 10^{-3}$ моль/дм³). Кислород удаляли путем трёхкратного замораживания - вакуумирования - размораживания с последующим запаиванием ампул под вакуумом. Растворы облучали при комнатной температуре на установке РХМ- γ -20 (источник излучения ⁶⁰Co, мощность поглощённой дозы 4.5 Гр/мин по дозиметру Фрикке).

Идентификацию продуктов радиационно-индуцированных превращений нуклеозидов выполняли методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии на хроматографе «Acquity UPLC» с масс-детектором TQD. Разделение проводили на колонке ACQUITY UPLC® BEH C18 50x2мм, 1.7 μ m. Подвижная фаза А – деионизованная вода, В – ацетонитрил. Разделение проводили в градиентном режиме, представленном в табл. 1.

Таблица 1. Градиентный режим разделения продуктов радиолиза.

Время, мин	Скорость потока, см ³ /мин	А, %	В, %
0	0.3	100	0
2	0.3	100	0
2.5	0.3	80	20
3.0	0.3	100	0

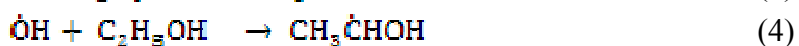
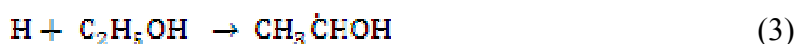
Спектрофотометрическое сканирование вели в диапазоне 200-800 нм. Масс-спектрометрическое определение проводили при следующих условиях: режим работы ESI+, напряжение на капилляре 3.30 кВ; напряжение конуса 31 В; температура источника 200°C; расход газа осушителя (азота) 650 дм³/ч; напряжение на столкновительной ячейке 20 В (газ – аргон высокой чистоты).

Обсуждение результатов

Ввиду низкой концентрации спирта и других растворенных веществ основное поглощение ($\sim 95\%$) энергии ионизирующего излучения в данной системе приходится на воду, в которой образуется значительное количество свободных радикалов, выход которых хорошо известен [7]:



Поскольку концентрация спирта и соляной кислоты велики по сравнению с исследуемыми веществами, гидроксильный радикал и электрон реагируют с ними, давая, в конечном счете, гидроксиэтильный радикал:



Таким образом, гидроксиэтильный радикал можно считать единственным радикалом, который в данной системе может реагировать с исследуемым веществом.

Хроматограмма облученного раствора аденозина (рис.1) показала, что процесс образования свободного основания в нем практически не происходит.

В результате взаимодействия формируются 2 продукта с молекулярной массой 312 и 296. Продукт, характеризующийся ионом с m/z 312, является продуктом присоединения гидроксиалкильного радикала по двойным связям с последующим отрывом атома Н. Поскольку изменения могли происходить как в гликозидной части, так и в пуриновом основании, мы получили масс-спектр вторичных ионов. Данный спектр характеризуется низкоинтенсивным пиком иона 180, высокоинтенсивным пиком 162 и низкоинтенсивным пиком 145. Ион, имеющий m/z 180, появляется

в результате потери нейтрального фрагмента массой 132, что соответствует рибозе. Это означает, что изменения коснулись основания, а не сахарного фрагмента. Ион 162 (рис. 2) является, по-видимому, результатом дальнейшего распада иона с отщеплением молекулы воды.

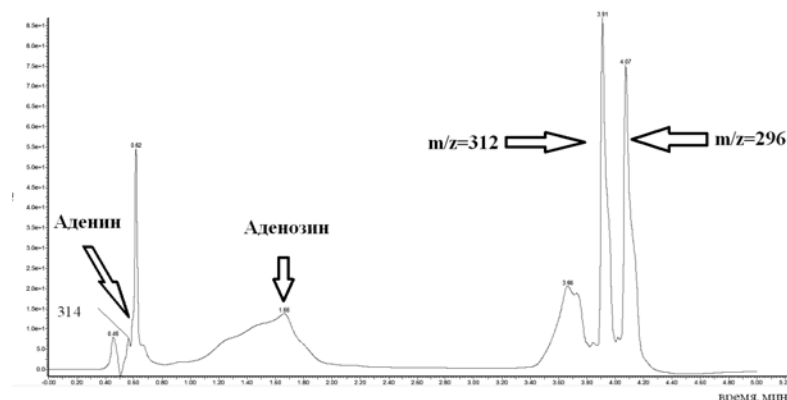


Рис.1. Хроматограмма облученного спиртового раствора аденозина.

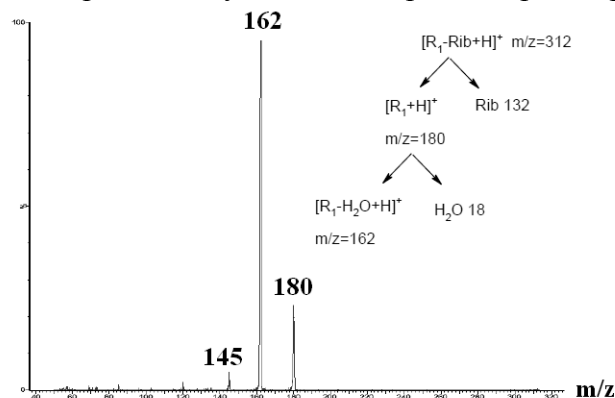


Рис.2. Масс-спектр вторичных ионов первичного иона m/z 312.

Так как гидроксильный радикал, также как и гидроксильный радикал, способен присоединяться по двойным связям, в работе рассмотрено присоединение $\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH}$ по C2 и C8 углеродным атомам.

Квантово-химический расчет электронных спектров предполагаемых структур (метод ZINDO CI, геометрия оптимизирована методом функционала плотности B88-PW91) (рис.3) предсказывает, что в случае присоединения по второму атому углерода должен наблюдаться сдвиг в коротковолновую область, а при присоединении к C8 – сдвиг в длинноволновую область. Спектр оптического поглощения продукта смещен относительно аденозина в длинноволновую область, что говорит о присоединении α -гидроксиэтильного радикала к C8. Расчет энергий также показал преимущество присоединения в положение C8.

Как уже было сказано ранее, второй продукт характеризуется m/z 296, что значительно отличается от того, что должен был бы иметь продукт простой рекомбинации. Ион с m/z 296, масс-спектр вторичных ионов которого представлен на рис. 4, может быть объяснен как продукт присоединения гидроксильного радикала с последующей потерей гидроксильной группы.

Вторичные ионы данного продукта показали, что и в этой молекуле остаток рибозы не поврежден. Таким образом, гидроксильная группа может быть отсоединена исключительно от присоединенного гидроксильного радикала. Если это так, то возможны 2 варианта (рис. 5):

- отрыв с образованием ненасыщенной связи;
- замена ОН-группы на атом Н.

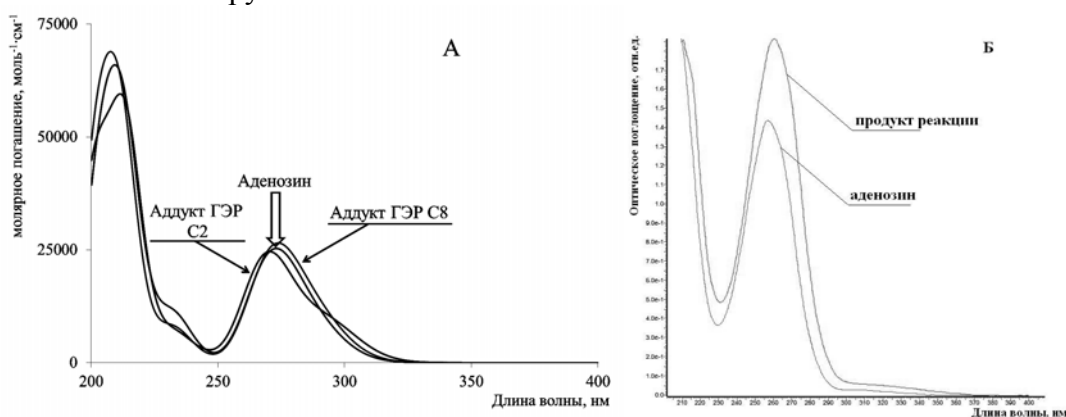


Рис. 3. а) Теоретические спектры оптического поглощения аденозина и аддуктов α -гидроксиэтильного радикала к аденозину по положению C2 и C8; б) спектры оптического поглощения аденозина и продукта с m/z 312, полученные при хроматографировании.

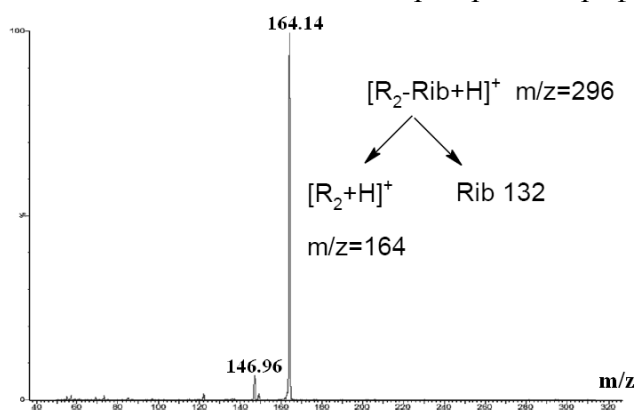


Рис. 4. Масс-спектр вторичных ионов первичного иона m/z 296

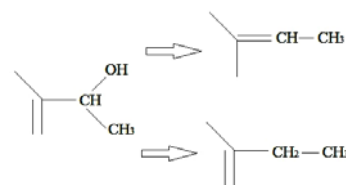


Рис. 5. Схема отрыва ОН-группы от гидроксиалкильного радикала

Образование двойной связи должно приводить к изменению расположения двойных связей в адениновом фрагменте аденозина и, соответственно, к значительному изменению спектра оптического поглощения данного продукта по сравнению с исходным аденозином, что нами не наблюдалось (рис. 6).

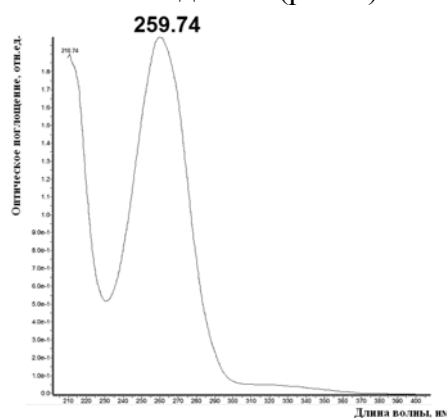


Рис. 6. Спектры оптического поглощения продукта с m/z 296.

Кроме хромато-масс-спектрометрических исследований был проведен анализ раствора после облучения путем прямого ввода в масс-спектрометр. На масс-

спектрометре (рис. 7) наблюдается несколько пиков, имеющих большую массу, чем аденозин. Кроме выше описанных пиков обнаружены ионы с массами 327 и 358. Ион с массой 358 соответствует присоединению двух гидроксиэтильных радикалов. На спектре вторичных ионов (рис. 8) наблюдается следующая последовательность фрагментации: потеря рибозы (358→226), потеря воды (226→208), потеря аминогруппы (208→191), потеря воды (191→173). Потеря двух молекул воды подтверждает правильность сделанного вывода о присоединении двух гидроксиэтильных радикалов, присоединение которых может происходить двумя путями (рис.9). В обоих случаях первой стадией является присоединение гидроксиэтильных радикалов. Далее, возможны два пути образования конечного продукта. Первый путь заключается в том, что из продуктов присоединения гидроксиэтильных радикалов образуются стабильные продукты радиолита, которые мы идентифицировали по ионам 312 и 314. В дальнейшем эти продукты могут вступать в реакцию со вторым гидроксиэтильным радикалом с образованием радикала с массой 358. Однако, последняя стадия процесса – переход из радикальной формы в молекулярную, скорее всего, сопровождалась бы реакцией диспропорционирования с образованием иона 356. Отсутствие значительного количества данного продукта, позволяет говорить о том, что образование продукта происходит путем рекомбинации радикала - аддукта и гидроксиэтильного радикала (схема 2).

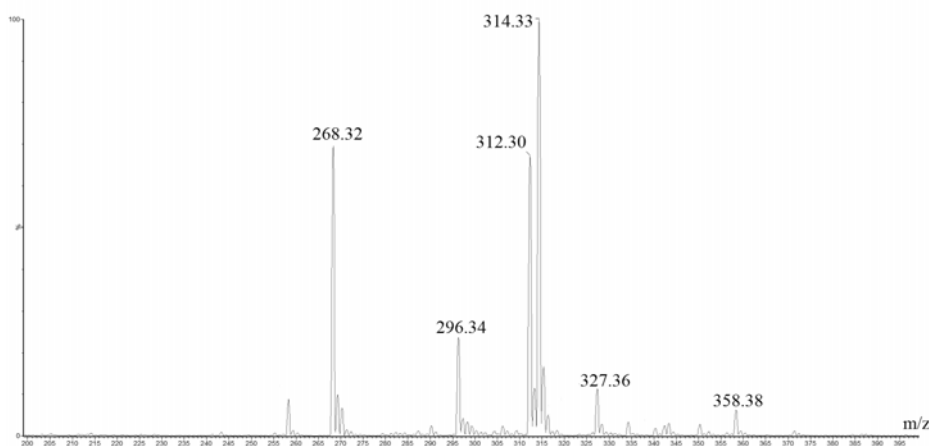


Рис. 7. Масс-спектр продуктов радиолита аденозина, полученный прямым вводом.

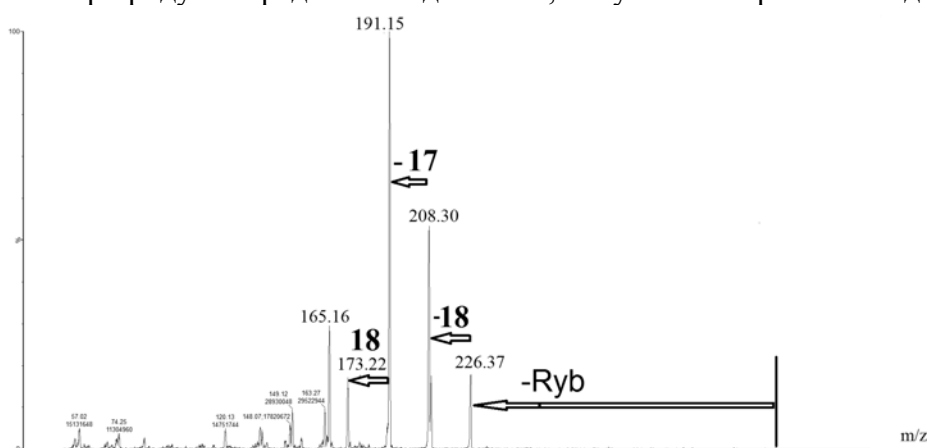


Рис. 8. Масс-спектр вторичных ионов первичного иона m/z 358.

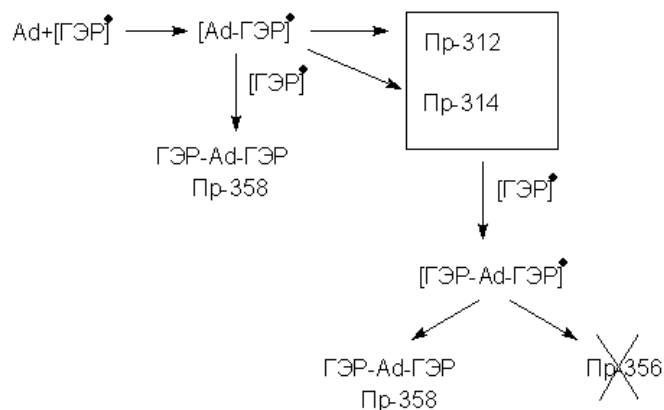


Рис.9. Присоединение гидроксиэтильных радикалов.

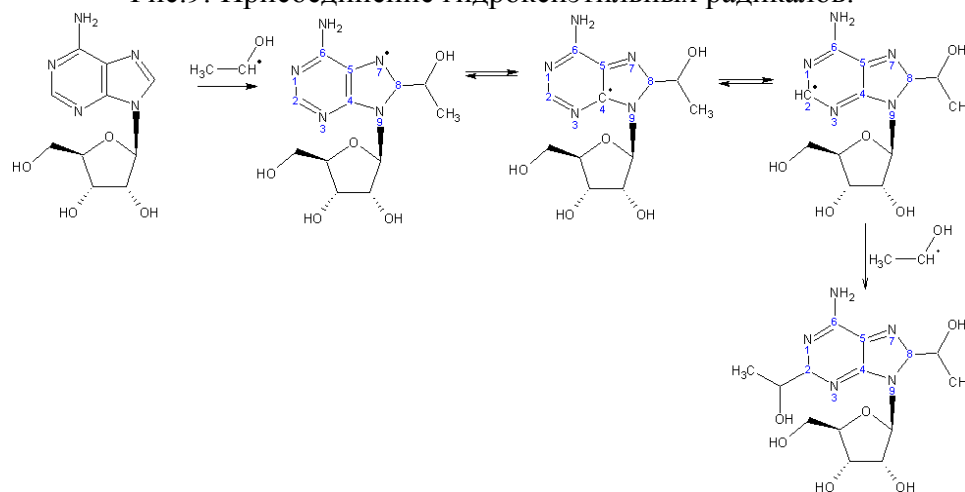
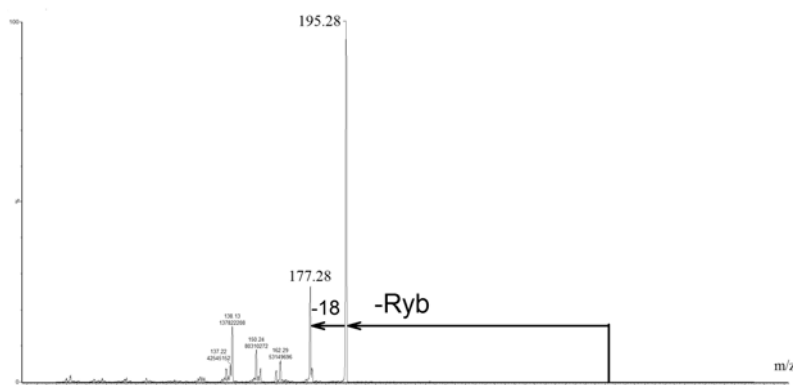


Схема 2. Реакция присоединения второго гидроксиэтильного радикала к аддукту гидроксиэтильного радикала аденина.

Ион 327 имеет нечётную массу, что свидетельствует о нахождении в молекуле чётного числа атомов азота. Сделано предположение, что после присоединения гидроксиэтильного радикала к аденозину происходит присоединение ещё одного гидроксиэтильного радикала, в результате образуется неустойчивое промежуточное соединение, которое элиминирует гидроксильную и амино-группы (схема 3). Спектр вторичных ионов (рис.10) показывает только один переход, соответствующий потере воды ($195 \rightarrow 177$), что подтверждает факт потери гидроксильной группы от второго гидроксиэтильного радикала.

Рис. 10. Масс-спектр вторичных ионов первичного иона m/z 327.

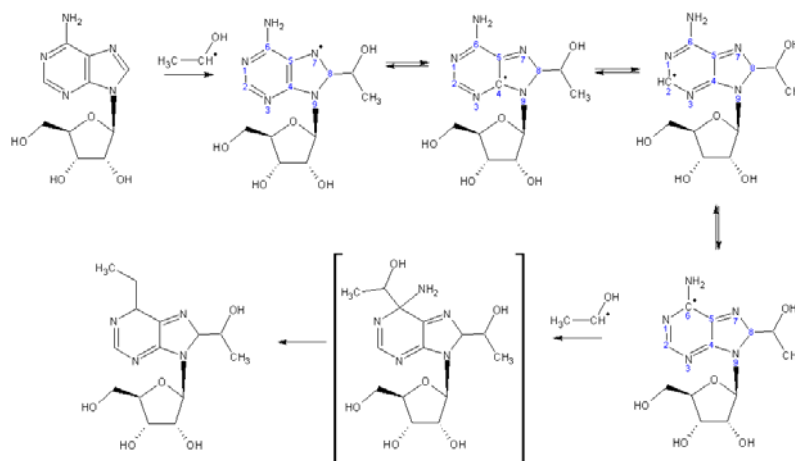


Схема 3. Предполагаемая схема образования продукта с ионом m/z 327.

Образование двух последних продуктов позволяет предположить возможность образования сшивок внутри молекулы ДНК и между молекулами ДНК и белком после взаимодействия с УЦР.

Заключение

Методом хромато-масс-спектрометрии исследованы продукты взаимодействия гидроксиэтильных радикалов с молекулой аденозина и проведена их идентификация. На основании проделанной работы, показана возможность исследования образования сшивок в молекуле ДНК под действием свободных радикалов.

Список литературы

1. Denham Harman// *Mutation Research/DNAging*, 1992. Vol. 275. Iss. 3–6. pp. 257-266 doi:10.1016/0921-8734(92)90030-S
2. Reinke L.A. et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. 1991. Vol. 11. No 1. pp. 31-39. doi:10.1016/0891-5849(91)90185-6
3. McCay P.B. et al. // *Journal of Biological Chemistry*. 1984. Vol. 259. No. 4. pp. 2135-2143.
4. Nakao L.S. et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. 2000. No 8. pp. 721-729 doi:10.1016/S0891-5849(00)00374-9
5. Hix S. et al. // *Chemical research in toxicology*. 2000. No 10. pp. 1056-1064. DOI: 10.1021/tx0001301
6. Aravindakumar C.T. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1994. Vol. 66. No 4. pp. 351-365.
7. Пикаев А.К. Современная радиационная химия. Радиолит газы и жидкостей. М. Наука. 1985.

References

1. Denham Harman, *Mutation Research/DNAging*, 1992, Vol. 275, Iss. 3-6, pp. 257-266 doi:10.1016/0921-8734(92)90030-S
2. Reinke L. A. et al., *Free Radical Biology and Medicine*, 1991, Vol. 11, No 1, pp. 31-39. doi:10.1016/0891-5849(91)90185-6
3. McCay P.B. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1984, Vol. 259, No 4, pp. 2135-2143.
4. Nakao L.S. et al., *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, No 8, pp. 721-729 doi:10.1016/S0891-5849(00)00374-9
5. Hix S. et al., *Chemical research in toxicology*, 2000, No 10, pp. 1056-1064. DOI: 10.1021/tx0001301
6. Aravindakumar C.T. et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 1994, Vol. 66, No 4, pp. 351-365.
7. Pikaev A.K. *Sovremennaya radiatsionnaya khimiya. Radioliz gazov i zhidkosti.* M., Nauka, 1985.

Стрединина Галина Александровна - студентка РХТУ им. Д. И. Менделеева, Москва

Николаева Валентина Викторовна - аспирантка РХТУ им. Д. И. Менделеева, Москва

Фенин Анатолий Александрович - старший преподаватель РХТУ им. Д. И. Менделеева, Москва

Stredinina Galina A. - student of Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

Nikolaeva Valentina V. - Ph.D. student of Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

Fenin Anatoliy A. - senior teacher of Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow. e-mail: fmkfenin@rctu.ru