

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК: 633.88:581.19

БИОХИМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ АНТИКАНЦЕРОГЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

¹Киселев П.А., ²Спиридович Е.В., ²Шутова А.Г., ¹Власенко Е.К.,
¹Бовдей Н.А.

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси г. Минск, 220141,
ул.Купревича 5/2, e-mail kiselev@iboch.bas-net.by

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, 220012,
ул. Сурганова 2в

На базе рекомбинантных белков человека предложена биохимическая модель для поиска веществ, обладающих потенциальной профилактической антиканцерогенной эффективностью.

В последние годы в странах дальнего зарубежья все большее внимание уделяется выращиванию, заготовке и использованию продуктов на базе лекарственных и пряно-ароматических растений. Всемирная организация здравоохранения также определила свою принципиальную позицию по отношению к фитотерапии. В феврале 2004 года приняты рекомендации относительно безопасности и эффективности растительных лекарственных препаратов. Рекомендации содержат указания для национальных органов здравоохранения по выращиванию и сбору лекарственных растений.

Но, в отличие от лекарственных средств с установленной химической структурой действующего вещества, в случае фитопрепаратов действующим началом является не одно вещество, а весь комплекс соединений в целом. Сложность состава сильно затрудняет выяснение фармакологической направленности и терапевтической эффективности растительных препаратов, которые в соответствии с уровнем сегодняшних знаний о принципах их действия можно разделить на три основных группы:

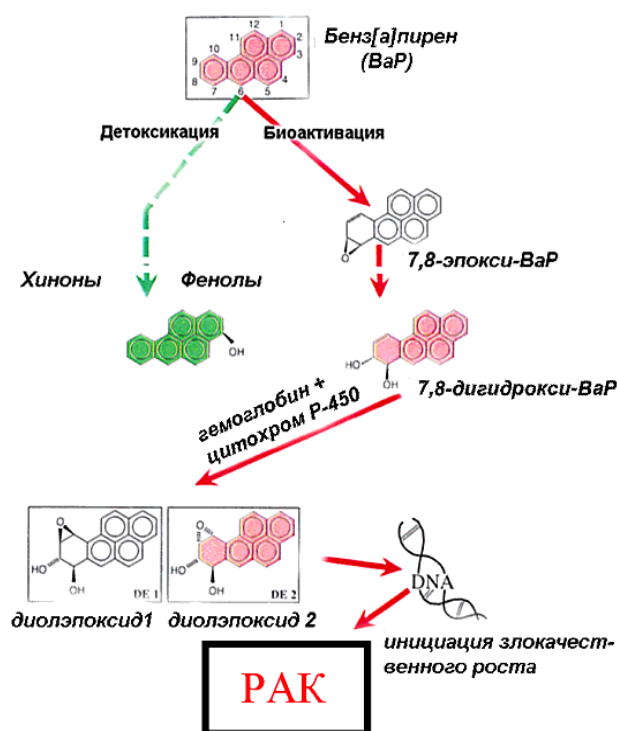
- растительные средства, у которых установлены компоненты, определяющие общую эффективность препарата, и выявлена количественная взаимосвязь «доза-эффект» (например, антрахиноны);
- растительные средства, у которых компоненты, определяющие общую эффективность препарата, выявлены лишь частично (например, зверобой);
- растительные средства, у которых обнаружен фармакологический эффект, однако он не может быть приписан какому-то конкретному веществу или группе веществ (например, пассифлора).

Поскольку на сегодняшнем уровне наших знаний большинство растительных средств следует отнести ко второй и третьей группе, на на-

стоящий момент существуют проблемы не только с их направленным применением, но даже с оценкой качества производимых и используемых препаратов. Несмотря на это высокая экономическая и социальная значимость пряно-ароматических и лекарственных растений сомнений не вызывает. В этом заключаются основные причины, приводящие к интенсификации исследований, направленных на стандартизацию препаратов, выявление индивидуальных физиологически активных компонентов, характеристику потенциального профилактического эффекта растительного сырья в целом. В последнем случае, особенно на первом этапе исследований, все большее применение находят биохимические модели, поскольку они позволяют достаточно объективно оценить действия препаратов, не выходя из разумных временных рамок. Однако, достоверность выводов, получаемых на базе биохимических моделей, во многом тем выше, чем надежнее наши знания о молекулярных механизмах возникновения тех или иных патологий. Поэтому, разработка подходов для анализа физиологического действия веществ с использованием биохимических моделей наиболее часто сопряжена с изучением молекулярных механизмов функционирования клетки и организма в целом. В этом плане повышенный интерес вызывают процессы, связанные с химически индуцированными раковыми заболеваниями. Так, хорошо известно, что полициклические ароматические соединения, типичным представителем которых является бенз(а)пирен (Б(а)П), относятся к промутагенным и проканцерогенным веществам. Их активация в организме осуществляется монооксигеназной ферментной системой в соответствии с приведенной здесь схемой.

Одним из принципиальных компонентов системы трансформации полициклических ароматических соединений в их канцерогенную форму являются изоэнзимы цитохрома P-450. Поэтому этот фермент рассматривается в качестве надежного маркера химического канцерогенеза. Считается, что один из путей достижения профилактического антиканцерогенного эффекта связан с ингибированием каталитической активности цитохрома P-4501A1(CYP1A1) и цитохрома P-4501B1. В таком случае, исследуя влияние растительных препаратов *in vitro* на свойства монооксигеназной системы, можно судить об их потенциальной профилактической эффективности, а саму систему рассматривать в качестве биохимической модели для экспресс-тестирования препаратов на антиканцерогенную активность. Однако очевидно, что наряду с биоактивацией важной функцией CYP1A1 является детоксикация ксенобиотиков. Пути детоксикации (реакции, ведущие к формированию диольных и фенольных производных) в упрощенном виде отражены на схеме ниже на примере бенз(а)пирена.

СХЕМА АКТИВАЦИИ БЕНЗ[а]ПИРЕНА В ЕГО КАНЦЕРОГЕННУЮ ФОРМУ



Понятно, что абсолютное ингибирование монооксигеназного процесса может приводить к накоплению канцерогенных и токсичных веществ в организме с непредсказуемыми последствиями. Исходя из этого, нами предложена новая модель, позволяющая разделить влияние анализируемых веществ на детоксицирующую и биоактивирующую функцию фермента, и тем самым дающую возможность более адекватно оценивать *in vitro* профилактическую эффективность лекарственных средств в отношении химически индуцибельных форм рака. Для этого используется набор тестовых реакций, ключевой из которых является реакция эпоксилирования 7,8-дигидрокси-7,8-дигидробенз(а)пирена (7,8-Диол-Б(а)П) в абсолютно канцерогенный продукт-7 β ,8 α -дигидрокси-9 α ,10 α -эпокси-7,8,9,10-тетрагидробенз(а)пирен (ДЕ2), отражающая функцию биоактивации. Для оценки детоксицирующей функции и характеристики общей каталитической активности цитохрома P4501A1 применены реакции гидроксилирования бенз(а)пирена (Ahh-тест) и деалкилирования 7-этоксирезорфуина (ДАЭР), соответственно.

На первом этапе мы попытались оценить степень достоверности предлагаемой нами модели. В качестве критерия выбран кверцетин и монооксигеназные системы на основе полиморфных вариантов CYP1A1. Обусловлено это тем, что проведенные эпидемиологические исследования позволили установить, что пища, обогащенная кверцетином, может защищать от воз-

никновения некоторых видов рака легкого. Причем наблюдалась положительная корреляция между эффектом кверцетина и фенотипическими особенностями индивидуумов. С другой стороны известно, что ген цитохрома P4501A1 в человеческой популяции отличается полиморфизмом и его аллели по частоте распространения имеют значительные этнические различия. Кроме дикого типа *CYP1A1*1*, наиболее часто встречаются аллель *CYP1A1*4* (белок CYP1A1.4; аминокислотная замена Thr461→Asn), а также сцепленная с геном Msp I аллель *CYP1A1*2B* (белок CYP1A1.2; аминокислотная замена Ile462→Val). С учетом этого и исходя из результатов эпидемиологических исследований можно констатировать, что соединения с выраженной профилактической антиканцерогенной активностью должны обладать значительным и в тоже время генотип-зависимым ингибиторным эффектом в отношении биоактивирующей функции CYP1A1 и его вариантов при умеренном влиянии на процесс детоксикации, тем самым обеспечивая защиту организма, что и должно отражаться предлагаемой моделью. С целью проверки данной гипотезы нами проведено исследование, в котором непосредственно измеряли CYP1A1-генотип-специфичное ингибирование кверцетином реакции образования абсолютного канцерогена ДЭ2 на фоне процесса детоксикации ксенобиотиков. Энзиматическая составляющая модели базировалась на CYP1A1.1 (дикий тип) и его основных вариантах- CYP1A1.2 и CYP1A1.4. В качестве количественной характеристики эффективности ингибитора нами использован параметр IC₅₀. Как известно, его величина соответствует концентрации ингибитора, при которой скорость реакции уменьшается в 2 раза.

Установлено, что кверцетин заметно ингибирует реакцию синтеза абсолютного канцерогена ДЭ2 всеми тремя вариантами CYP1A1. Однако наиболее эффективное воздействие кверцетин оказывал на CYP1A1.1- фермент дикого типа (IC₅₀ = 1,6 ± 0,3 мкМ), а его влияние и на аллельные варианты P-450 было примерно в 2-4 раза слабее.

Отличия в величинах IC₅₀ между CYP1A1.1 и CYP1A1.2, а также диким типом и CYP1A1.4 были достоверны (P = 0,001 для CYP1A1.1 vs. CYP1A1.2 и CYP1A1.1 vs. CYP1A1.4), в то время как разница в величинах IC₅₀ для CYP1A1.2 vs. CYP1A1.4 была статистически менее значима (P = 0,016).

Для проверки механизма ингибирования была изучена кинетика ферментативной реакции. Исследования ферментативной кинетики проводили при концентрации кверцетина от 0 до 10 мкМ и концентрациях субстрата, равных 0, 0,5, 1, 2, 4 и 5 мкМ. Величины K_i и стандартная ошибка (M ± SD) определены методом нелинейной аппроксимации с использованием пакета программы Sigma Plot-Enzyme Kinetics.

Для всех вариантов аппроксимационный анализ приводил к лучшим результатам в рамках модели ингибирования смешанного типа, в сравне-

нии с таковой для конкурентного и значительно лучше, чем неконкурентного типа. Тем не менее, представленные данные не позволяют принять однозначное решение в пользу смешанного или конкурентного типа ингибирования. Однако, величины K_i , определенные в рамках обеих моделей отличались незначительно и в случае смешанного типа ингибирования были равны 2,0, 6,4 и 9,3 мкМ для CYP1A1.1, CYP1A1.2 и CYP1A1.4, соответственно. Как и для IC_{50} , различия в величинах K_i для CYP1A1.1 vs. CYP1A1.2 ($P = 0,004$), и CYP1A1.1 vs. CYP1A1.4 ($P = 0,039$) были статистически достоверны, в то время как этого не наблюдалось в случае CYP1A1.2 vs. CYP1A1.4 ($P = 0,306$).

Реакцию гидроксилирования Б(а)П, катализируемую двумя аллельными вариантами цитохрома P-4501A1, в стандартном Ahh-тесте кверцетин ингибировал незначительно ($IC_{50} \geq 100$ мкМ), что согласуется с данными, полученными нами ранее для дикого типа CYP1A1.

Полученные результаты однозначно указывают на более высокую чувствительность к действию ингибитора в реакции образования канцерогенного продукта дикой формы цитохрома P4501A1 в сравнении с его полиморфными вариантами, что может означать, что люди-носители аллелей *CYP1A1*2* и *CYP1A1*4* подвержены повышенному риску возникновения некоторых раковых заболеваний. Такое утверждение согласуется с данными эпидемиологических исследований, выявивших взаимосвязь между *CYP1A1*2*-генотипом и повышенным риском рака легкого.

Вместе с тем, чтобы считаться хорошим, ингибитор CYP1A1-опосредуемого превращения проканцерогенного вещества должен, с одной стороны эффективно блокировать эпоксидирование 7,8-диол-Б[а]П, а с другой, - не препятствовать гидроксилированию Б[а]П, ведущему к детоксикации ксенобиотика. Этому условию вполне соответствует кверцетин, поскольку его влиянием на реакцию гидроксилирования Б[а]П можно пренебречь, а именно интенсивное протекание этой реакции уменьшает вероятность образования абсолютного канцерогена-ДЕ2.

В целом, полученные данные согласуются с гипотезой о том, что соединения, обладающие профилактическим антиканцерогенным действием должны не только эффективно, но и селективно влиять на биоактивирующую функцию цитохрома P4501A1 человека, что и может быть положено в основу биохимической модели для их направленного поиска.

Summary

A biochemical model based on human recombinant proteins is suggested for the search of substances with potentially preventing anticarcinogenic efficiency.