

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И БИОХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

БЕЛОРУССКИЕ ЛЕКАРСТВА

Материалы
международной научно-практической конференции

Минск, 2-3 ноября 2010 г.

Минск
2010

5. Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects / Hsu TG, Hsu KM, Kong CW, Lu FJ, Cheng H, Tsai K // Med Sci Sports Exerc, 34, 2002, p. 438-442.

REACTION OF RAT IMMUNE CELLS TO EMOTIONAL - PHYSICAL STRESS

Ogurtsova S.E., Anisovich M.V., Maley L.P., Malashevich Y.V., Belyaeva A.V., Vlasenko A.K., Afonin V.YU.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus, E-mail: viktorafonin@ya.ru

Decrease of immunoregulatory index was observed in rats under compulsory swimming with weight. The decrease can be basically connected with growth of CD3⁺CD8⁺ cells.

РОЛЬ ГЕНА *NMO1* В ИНДУКЦИИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ

Огурцова С.Э., Афонин В.Ю., Малей Л.П., Малашевич Я.В., Погребняков И.А.
Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: fatinja_2008@mail.ru

Введение. Ген *NMO1* играет важную роль в химически индуцированном канцерогенезе. Он кодирует фермент NAD(P)H: хиноноксидоредуктазу, участвующую в метаболизме хинонов. Хиноны являются важным классом химиотерапевтических агентов. Метаболическая активация хинонов находится под генетическим контролем различных генов. Один из генов - *NMO1*, кодирует фермент NAD(P)H: хиноноксидоредуктазу, которая по мнению многих авторов ответственна за восстановительную биоактивацию ряда хинонов [1]. Экспрессия гена *NMO1* наблюдается в ответ на введение индукторов. Индукция гена *NMO1* может модифицировать мутагенный эффект хиноновых противоопухолевых промутагенов вследствие изменения баланса редуктаз в сторону увеличения активности NAD(P)H: хиноноксидоредуктазы, что приведет к различному соотношению мутагенных метаболитов с разным механизмом действия.

Цель работы – изучение выхода цитогенетических повреждений в костном мозге мышей в условиях индукции NAD(P)H: хиноноксидоредуктазы, увеличение активности которой находится под контролем гена *NMO1*.

Методы исследования. Эксперимент выполнен на самцах мышей линии C57BL/6J с массой тела 20-25 г. В качестве индуктора гена *NMO1* использовали β-нафтофлаван, который относится к полициклическим углеводородам и повышает активность 2-х ферментов первой

(*CYP1A1*, *CYP1A2*) и 4-х ферментов второй фазы (*UGT1A6*, *GSTA1*, *NMO1*, *ALDH3A1*) биотрансформации ксенобиотиков. β -нафтофлавоны растворяли в кукурузном масле и вводили перорально в дозе 40 мг/кг в течение 3-х дней ежедневно, так как в эти сроки достигается максимальный уровень ферментов метаболизма ксенобиотиков. Митомицин С вводили внутривенно в дозе 3,5 мг/кг через сутки после последнего введения индуктора. Контрольным мышам вводили вместо индукторов кукурузное масло, а вместо промутагенов изотонический раствор.

Для изучения экспрессии генов *NMO1* тотальную РНК выделяли из замороженных, измельченных в жидком азоте образцов печени с помощью реагента «RNeasy Mini kit» («QIAGEN», Германия) согласно прилагаемому протоколу. Реакцию обратной транскрипции (синтез кДНК из полученной РНК) проводили с использованием набора реагентов QuantiTect Reverse Transcription Kit («QIAGEN»). Количественную ПЦР в режиме реального времени осуществляли в присутствии красителя SYBR Green на приборе Chromo4 (Bio-Rad, USA). Образцы кДНК нормировали по контрольному гену «домашнего хозяйства» *β -Actin*. Праймеры для гена *NMO1* и *β -Actin* выбирали с использованием программы «Primer3 Input 0.4.0» и заказывали у фирмы ОДО «Праймтех» (Беларусь). Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы STATISTICA 6.0.

Исследование цитогенетического эффекта промутагенов проводили в костном мозге. Цитогенетические препараты клеток костного мозга готовили по общепринятой методике [2]. В качестве теста на мутагенность использовали учет aberrаций хромосом на стадии метафазы. О цитогенетическом эффекте промутагенов судили по проценту aberrантных клеток, среднему числу aberrаций на aberrантную клетку и исследованную клетку. Для анализа полученных данных применялись статистические программы Microsoft Excel (средняя арифметическая, ошибка средней арифметической, *t*-критерий Стьюдента).

Результаты и обсуждение. Из полученных результатов видно, что введение митомицина С привело к статистически достоверному ($P < 0,001$) увеличению процента aberrантных клеток через 18 часов по сравнению с вариантом «контроль». Уже через 18 часов после введения промутагена процент aberrантных клеток, значительно выше ($20,60 \pm 1,81\%$), чем у мышей, которым вводили изотонический раствор ($0,33 \pm 0,33\%$). Предварительное введение β -нафтофлавона повлияло на степень повреждения генетического материала клеток костного мозга. Рост частоты aberrантных клеток в вариантах с β -нафтофлавоном сопровождался увеличением нагруженности клеток aberrациями. Предварительная индукция ферментов β -нафтофлавоном приводит возрастанию доли клеток с двумя, тремя и большим числом aberrаций. Увеличение процента aberrантных клеток с множественными aberrациями в общем числе изученных клеток сказалось на увеличении среднего числа aberrаций как на исследованную, так и aberrантную клетку. Так, через 18 часов, процент клеток с одной aberrацией уменьшился с 67,96% до 56,82% и соответственно увеличился процент aberrантных клеток несущих 3-10 aberrаций. Как следствие выросло и среднее число aberrаций на исследованную клетку с 0,4 до 0,6 и среднее число aberrаций на aberrантную клетку с 1,95 до 2,27. Среднее число aberrаций на исследованную клетку возросло как за счет увеличения числа aberrантных клеток, так и за счет их нагруженности aberrациями. Таким образом, на основании анализа уровня aberrантных клеток и нагруженности клеток aberrациями хромосом можно заключить, что предварительное введение индуктора β -нафтофлавона привело к увеличению цитогенетического эффекта митомицина С.

Митомицин С, как и большинство хинонов, проявляет свое мутагенное действие после одно ($1e^-$)- или двухэлектронной ($2e^-$) редукции при участии различных редуктаз, результатом чего является образование, соответственно, семихинонов или гидрохинонов [3]. Эти метаболиты обладают разной способностью к конъюгации с глутатионом, что влияет на скорость выведения их из организма, к структурной перестройке с образованием моно- и

биалкилирующих соединений, а также к аутоокислению и вступлению в цикл восстановления-окисления, в процессе которого генерируются реактивные радикалы кислорода, вызывающие фрагментацию хромосом. Поэтому мутагенный эффект хинонов и спектр мутаций могут зависеть от тонкого баланса редуктаз. Единственной $2e^-$ редуктазой, о роли которой в метаболической активации хинонов существуют две взаимоисключающие точки зрения, является НАД(Р)Н:хиноноксидоредуктаза, кодируемая геном *NMO1*. Согласно одной из точек зрения - образующиеся в результате $2e^-$ редукции гидрохиноны легко конъюгируют с глутатионом и выводятся из организма, не причиняя ему никакого вреда [4]. Согласно другой – гидрохиноны вступают в цикл восстановления-окисления, а также легко перестраиваются с образованием алкилирующих метаболитов [5].

Увеличение мутагенности митомицина С на фоне предварительного введения β -нафтофлавоном дает основание предположить, что при индукции экспрессии генов меняется баланс редуктаз в сторону увеличения активности НАД(Р)Н:хиноноксидоредуктазы, которая способствует в результате $2e^-$ редукции образованию гидрохинонов, и, следовательно, к изменению профиля метаболитов в сторону увеличения его мутагенности или к худшей способности к конъюгации с глутатионом и выведению из организма. Это предположение основано на том, что индуцированные β -нафтофлавоном ферменты *CYP1A1* и *CYP1A2* участвуют в реакциях монооксигеназного типа, поэтому не могут иметь отношения к восстановительной биоактивации хинонов, также как и фермент альдегиддегидрогеназа (*ALDH3A1*), которая принимает участие в окислении альдегидов. Маловероятно, что фермент УДФ-трансфераза (*UGT1A6*) участвует в метаболизме митомицина С, т.к. согласно литературным данным, метаболиты митомицин С конъюгируют с глутатионом. Следовательно, только два фермента – *NMO1* и *GSTA1*, индуцируемые β -нафтофлавоном, могут иметь отношение к метаболизму митомицина С. Однако быстрая конъюгация гидрохинона митомицина С с глутатионом привела бы к уменьшению кластогенного эффекта митомицин С на фоне индукции экспрессии генов, а не к наблюдавшемуся увеличению.

Для того, чтобы получить подтверждение нашему предположению, что увеличение выхода цитогенетических повреждений, вызванных митомицином С у индуцированных мышей является следствием индукции экспрессии гена *NMO1* мы оценили базальный и индуцированный β -нафтофлавоном уровень экспрессии этого гена в клетках печени мышей. В нашем исследовании β -нафтофлавоном при выбранной дозе 40 мг/кг массы тела оказал значительное стимулирующее воздействие на экспрессию гена *NMO1*, увеличив уровень его экспрессии. Были обнаружены статистически достоверные различия между активностью гена *NMO1* у животных, получавших β -нафтофлавоном в течение 3-х дней и контрольными животными. В печени индуцированных мышей активность *NMO1* увеличилась в 2,7 раза ($P < 0,01$).

Таким образом, предварительная индукция ферментов β -нафтофлавоном приводит к увеличению выхода цитогенетических повреждений, вызванных митомицином С. Анализ собственных и литературных данных позволяет предположить, что это является следствием индукции *NMO1*, которая способна конкурировать с другими редуктазами за митомицин С как субстрат, а образующийся гидрохинон митомицина С способен к структурной перестройке с образованием алкилирующих метаболитов.

Литература:

1. Ross D., Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics // Methods Enzymol. – 2004. – Vol.382. – P. 115-144.
2. Preston R.J., Dean B.J., Galloway S. Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. // Mutat. Res. –1987. – Vol.189, №2. – P.157-165.

3. Siegel D., Gustafson D.L., Dehn D.L., Han J.V. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. Role as a superoxide scavenger. //Mol. Pharm. – 2004. – Vol.65, №5. – P.25-37.
4. Beall H.D., Winski S.I. Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents. I: NQO1-directed drug development // Front Biosci. – 2000. – Vol.5. – P. D639- 648.
5. Joseph P., Long D.J., Klein-Szanto A.P. Role NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) in protection on against quinone toxicity. // Biochem. Pharm. –2000. – Vol.60, №2. – P.207-214.

ROLE OF GENE *NMO1* IN INDUCTION CYTOGENIC OF DAMAGES IN BONE MARROW CELLS OF MICE BY POLYCYCLIC HYDROCARBONS

Ogurtsova S.E., Afonin V.Yu., Maley L.P., Malashevich Y.V., Pogrebnyakov I.A.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The preliminary induction of enzymes by b-naphthoflavone leads to increase in an output of cytogenic the damages caused by mitomycin C. Research of own and literary data allows to assume, that it is consequence of induction NMO1 which is capable to compete to others reductases for mitomycin C with as a substrate, and formed hydroquinone of mitomycin C with is capable to structural reorganization with formation alkylating metabolite.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ ХИНОНОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРОМУТАГЕНОВ ПРИ ИНДУКЦИИ РАЗЛИЧНЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ

Огурцова С.Э., Малашевич Я.В., Погребняков И.А.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: fatinja_2008@mail.ru

Введение. В настоящее время с обострением экологической ситуации особую актуальность приобретает изучение влияния на организм животных и человека вредных химических факторов. Энзиматические реакции, вовлеченные в процессы метаболической активации ксенобиотиков, поддаются изменению под действием различных химических соединений - индукторов и способны изменять активность ферментов, вовлеченных в эти процессы [1].

С тех пор, как был описан феномен индукции ферментов метаболизма ксенобиотиков, в список индукторов включены уже сотни химических соединений. Однако исследование спектра соединений, которые могут индуцировать различные формы ферментов метаболизма ксенобиотиков, по-прежнему актуально. Исследования последних лет показывают, что эффективными индукторами могут быть не только ПАУ и диоксины с планарной структурой, но и соединения иных химических классов (каратиноиды, индолы и др.).

В настоящее время особый интерес вызывают индукторы, относящиеся к антиоксидантам, представляющие собой соединения различных классов и объединенные на основе общей способности ингибировать свободнорадикальные процессы. Отличительными особенностями действия антиоксидантов на систему биотрансформации ксенобиотиков