

**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

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

является высокая специфичность индукции ферментов 2-ой фазы и слабо выраженное влияние на цитохром P-450 [2]. Большой интерес вызывают каратиноиды, в частности астаксантин и ликопин, которые являются природными эффективными антиоксидантами. До сих пор не выяснены механизмы действия каратиноидов, благодаря которым они ингибируют канцерогенез, эффективны в отношении рака молочной железы, легких, эндометрия и простаты. Как показал обзор литературы, большинство работ посвящено изучению лишь одного из механизмов действия каратиноидов – антиоксидантного [3]. В литературе очень мало работ, посвященных каратиноидам, как индукторам ферментов детоксикации второй фазы биотрансформации ксенобиотиков.

В связи с этим целью настоящей работы было сравнительное изучение в клетках печени экспрессии генов *NMO1* и *GSTA1* в норме, и после действия индукторов, относящимся к антиоксидантам.

**Методы исследования.** Эксперимент выполнен на самцах мышей линии C57BL/6J с массой тела 20-25 г. В качестве индукторов ферментов детоксикации ксенобиотиков использовали астаксантин и ликопин. Астаксантин растворяли в изотоническом растворе, а ликопин – в кукурузном масле и вводили перорально в течение 5-ти дней ежедневно, так как в эти сроки достигается максимальный уровень ферментов метаболизма ксенобиотиков второй фазы. Объем раствора индукторов - 0,2 мл на 20 г веса. Исследуемая доза астаксантина - 25 мг/кг, ликопина – 50 мг/кг.

Для изучения экспрессии генов *NMO1* и *GSTA1* 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»  *$\beta$ -Actin*. Праймеры для генов *NQO1*, *GST1A* и  *$\beta$ -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.

**Результаты и обсуждение.** Гены *NMO1* и *GSTA1* играют важную роль в химически индуцированном канцерогенезе. Есть данные, что при обработке лабораторных животных различными загрязнителями окружающей среды в условиях ингибирования метаболизма *NMO1* и *GST1A* увеличивается риск токсичности и канцерогенеза. Ген *NMO1* кодирует фермент NAD(P)H: хинон оксидоредуктазу, участвующую в метаболизме хинонов. Хиноны - содержатся в выхлопных автомобильных газах, сигаретном дыме, частично в городском воздухе, пищевых продуктах, являются важным классом химиотерапевтических агентов. Показано, что в биотрансформации хинонов принимает участие большое количество ферментов. Большинство из них участвует в одноэлектронной редукции, приводящей к образованию высоко реактивных радикалов. Однако только NAD(P)H: хинон оксидоредуктаза, кодируемая геном *NMO1*, является единственным ферментом, осуществляющим облигатную двухэлектронную редукцию хинонов, в результате чего образуются метаболиты конъюгирующие с глутатионом. Ген *GST1A* кодирует фермент глутатионтрансферазу, который участвует в конъюгирующих реакциях. Это приводит к изменению физико-химических свойств биотрансформирующихся соединений и ограничивает дальнейшие превращения продуктов метаболизма в организме, а также способствует их выведению.

Мы провели сравнительный анализ содержания мРНК методом RT-ПЦР в нормальных и проиндуцированных тканях печени. мРНК обнаружена в достаточно высоком количестве во всех образцах нормальных тканей печени, а также в тканях печени, взятых после 5-ти дневного введения индукторов. Из экспериментальных данных видно, что ген *NMO1* и

*GST1A* конститутивно и индуцибельно экспрессируется в клетках печени. Известен механизм индукции ферментов биотрансформации ксенобиотиков в печени при воздействии на организм антиоксидантов, который состоит в транскрипционной активации генов с участием лиганд-активированным фактором транскрипции AhR и специфическими XRE (Xenobiotic Response Element) или ARE (Antioxidant Responce Element) элементами ДНК.

Ликопин относится к бифункциональным индукторам. Он является эффективным индуктором ферментов CYP1A1 и CYP1A2. Ликопин индуцирует также и ферменты второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, включая и NAD(P)H: хинон оксидоредуктазу. В нашем эксперименте ликопин увеличил экспрессию гена *NMO1* в 3 раза ( $P < 0,01$ ).

Астаксантин относится к монофункциональным индукторам. Связываясь с Ah рецептором астаксантин опосредует транскрипцию генов, кодирующие ферменты только второй фазы биотрансформации ксенобиотиков. Астаксантин оказал значительное стимулирующее воздействие на экспрессию гена *NMO1*, увеличив уровень экспрессии гена *NMO1* более чем в 20 раз ( $P < 0,001$ ).

В нашем исследовании астаксантин при выбранной дозе 25 мг/кг массы тела не изменил экспрессию гена *GSTA1*. Статистически достоверные различия между активностью гена *GSTA1* у животных, получавших астаксантин в течение 5-ти дней, и контрольными животными не были обнаружены. В печени мышей активность *GST1A* увеличилась только на 30% по сравнению с контрольными животными. Однако эти различия статистически не достоверны. При введении другого индуктора – ликопина, было обнаружено, что это соединение также не повлияло на экспрессию гена *GST1A*. Так в клетках печени мышей, получавших ликопин, уровень экспрессии гена *GST1A* не превышал контрольных значений.

Таким образом, в нашем эксперименте установлено, что химические соединения из класса каротиноидов, структуры которых отличаются от полициклической ароматической структуры классических индукторов ферментов первой и второй фазы биотрансформации ксенобиотиков вызывают индукцию экспрессии генов, продукты которых участвуют в детоксикации хинонов. Астаксантин и ликопин обладают сильными индуцирующими свойствами в отношении экспрессии гена *NMO1* и проявляют менее выраженную способность индуцировать экспрессию гена *GST1A*.

#### Литература:

1. Гуляева, Л.Ф. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе / Л.Ф. Гуляева, В.А. Вавилин, В.В. Ляхович. — Новосибирск, 2000. — 84 с.
2. Aruoma O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive component in plant foods // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol.523-524. – P.99-109.
3. Stahl W. Non-antioxidant properties of carotenoids / Stahl W., Ale-agma N., Polidori M.C. // *Biological chemistry.* 2002. Vol.383, Issue 3-4. P.553-558.
4. Ross D. Quinone reductases multitasking in the metabolic world // *Drug Metab. Rev.* – 2004. – Vol.36, №3-4 – P. 639-654.

### **CHANGE EXPRESSION OF THE GENES PARTICIPATING IN METABOLISM ANTITUMOR QUINONE PROMUTAGENS AT THE INDUCTION BY VARIOUS ANTIOXIDANTS**

Ogurtsova S.E., Malashevich J.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*

Expression of genes that participate in the process of quinone detoxication can be induced by the chemical compounds from a class of carotenoids with structures that are different from

polycyclic aromatic structure of classical inducers of enzymes of the first and second phases of biotransformation of xenobiotics. Astaxantin and lycopene are characterized by the strong inducing properties in relation to the expression of *NMO1* gene, but show less visible ability to induce the expression of *GST1* gene.

### НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПАНТЕНОЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

<sup>1</sup>Онуфриев М.В., <sup>1</sup>Степаничев М.Ю., <sup>1</sup>Лазарева Н.А., <sup>2</sup>Катковская И.Н.,  
<sup>1</sup>Тишкина А.О., <sup>2</sup>Мойсеенок А.Г., <sup>1</sup>Гуляева Н.В.

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт высшей нервной  
деятельности и нейрофизиологии РАН, Россия, 117485 Москва,  
ул. Бутлерова, д. 5А, E-mail: m\_step@pochta.ru;

<sup>2</sup> Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт  
фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, 230017, Гродно,  
бульвар Ленинского комсомола, д. 50

Пантотеновая кислота, витамин В<sub>5</sub>, представляет собой водорастворимый витамин, необходимый для существования живых организмов. Пантотеновая кислота используется для синтеза кофермента А (CoA), участвующего в метаболизме и синтезе углеводов, белков и липидов. Наиболее распространенные формы, в которых встречается пантотеновая кислота, – ее спиртовой аналог, провитамин пантенол (пантотенол) и пантотенат кальция. Пантотеновая кислота не синтезируется в тканях животных, однако продуцируется бактериями кишечника и в значительных количествах содержится в пище [1].

Продемонстрирована защита пантотеновой кислотой и пантенолом в экспериментальных ситуациях, сопровождающихся окислительным стрессом, в частности при ишемических повреждениях печени и сердца. Так, в модели экспериментальной ишемии-реперфузии на изолированном сердце был продемонстрирован кардиопротекторный эффект пантотеновой кислоты [2], а декспантенол ослаблял интенсивность перекисного окисления и повреждение семенников при экспериментальном ишемическом и реперфузионном действии [3]. До сих пор остаются не исследованными эффекты пантотеновой кислоты и ее производных при ишемии мозга/инсульте, а ведь потребность в нетоксичных нейропротекторах остается чрезвычайно высокой. В настоящей работе проведено исследование эффектов пантенола на модели фокальной ишемии мозга у крысы.

Исследование нейропротекторных свойств D-пантенола проводили на модели окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс. D-пантенол вводили внутривентрикулярно в дозе 200 мг/кг за 24 ч, 0.5 ч до и 0.5 ч, 24 ч, 48 ч после ОСМА. Для оценки неврологического дефицита использовали 20-балльную шкалу, включавшую выполнение животными следующих тестов: помещение лапы, установочный рефлекс, перекаладина, наклонная платформа, вращение, визуальное вытягивание передней лапы, подвижность, общее состояние. Сумма баллов 20 отражала нормальную функцию, а снижение суммы баллов указывало на нарушенный неврологический статус. Второй метод оценки неврологического дефицита был основан на тесте вытягивания языка (ВЯ), которое оценивали по способности крысы вылизывать арахисовое масло из стеклянного цилиндра. Тесты проводили, начиная с первого дня после ОСМА. Для оценки общего физиологического состояния животных их ежедневно взвешивали.

Через 5 дней после ОСМА животных декапитировали, быстро выделяли мозг, коронарные срезы толщиной 2.0 мм окрашивали в растворе 2,3,5-трифенилтетразолия