

72
M75



МОЛОДЕЖЬ В НАУКЕ – *2007*

Приложение
к журналу
«Весці
Нацыянальнай
акадэміі навук
Беларусі»



Часть 3

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Совет молодых ученых НАН Беларуси

МОЛОДЕЖЬ В НАУКЕ — 2007

Приложение к журналу
«Весті Нацыянальнай акадэміі
навук Беларусі»

В четырех частях

Часть 3

Серия физико-математических наук
Серия физико-технических наук
Серия химических наук



Минск
«Белорусская наука»
2008

УДК 082
ББК 94
М 75

Редакционная коллегия
серии физико-математических наук:

С. В. Абламейко (главный редактор), Н. М. Олехнович (зам. главного редактора),
В. М. Анищик, А. И. Белоус, А. А. Богуш, С. В. Гапоненко, А. М. Гончаренко, А. П. Достанко,
Н. А. Изобов, Н. С. Казак, В. И. Корзюк, Ф. П. Коршунов, В. А. Писарев, Л. М. Томильчик,
А. В. Тузиков, А. Ф. Чернявский, Л. А. Шеметков, Л. А. Янович

Редакционная коллегия
серии физико-технических наук:

С. А. Астапчик (зам. главного редактора), В. Л. Драгун (зам. главного редактора),
П. А. Витязь, М. С. Высоцкий, А. И. Гордиенко, В. А. Емельянов, С. А. Жданок, В. В. Клубович,
Л. Г. Красневский, В. И. Кувшинов, С. П. Кундас, М. М. Маханек, Н. П. Мигун, А. А. Михалевич,
Ю. М. Плескачевский, П. П. Прохоренко, О. П. Реут, В. В. Тур, Б. М. Хрусталева, В. К. Шелер,

Редакционная коллегия
серии химических наук:

Н. П. Крутько (главный редактор), Ф. А. Лахвич (зам. главного редактора),
В. Е. Агабеков, А. В. Бильдокевич, А. А. Гилеп, Ю. Г. Егизаров, О. А. Ивапкевич, В. С. Комаров,
Ф. Н. Капуцкий, А. В. Кудельский, М. И. Кузьменков, А. И. Кулак, И. А. Левицкий,
А. И. Лесникович, И. И. Лиштван, С. К. Рахманов, А. И. Ратко, В. С. Солдатов, В. А. Хрипач

Молодежь в науке – 2007: прил. к журн. «Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». В 4 ч.
М75 Ч. 3. Серия физико-математических наук; серия физико-технических наук; серия химических наук /
редкол. серии физ.-мат. наук: С. В. Абламейко (гл. ред.), Н. М. Олехнович [и др.]; редкол. серии физ.-
техн. наук: С. А. Астапчик (зам. гл. ред.), В. Л. Драгун [и др.]; редкол. серии хим. наук: Н. П. Крутько
(гл. ред.), Ф. А. Лахвич [и др.]. – Минск: Беларус. наука, 2008. – 462 с.
ISBN 978-985-08-0963-6.

В данное издание вошли работы молодых ученых по физико-математическим, физико-техническим и химическим наукам, представленные на Международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2007», проходившей в Минске 23 – 26 октября 2007 г.

УДК 082
ББК 94

ISBN 978-985-08-0963-6 (Ч. 3)
ISBN 978-985-08-0951-3

© Оформление. РУП «Издательский
дом «Белорусская наука», 2008

А. Г. СЫСА

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОЛИОКСИСТЕРОИДОВ НА МОНООКСИГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Важная роль brassinosterоидов в функционировании растительных организмов сомнений не вызывает. Эти фитогормоны обладают высокой биологической активностью и способны в низких концентрациях воздействовать на физиологические процессы в растениях, повышая их урожайность и устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды [1–4]. Открытым пока остается вопрос о возможном участии brassinosterоидов в регуляции процессов жизнедеятельности животных и человека. До настоящего времени такие исследования проводились главным образом в связи с внедрением в практику сельского хозяйства препарата на основе эпибрассинолида (Эпина) и необходимостью его всестороннего токсикологического анализа. Исследования показали низкую токсичность brassinosterоидов и даже наличие определенного защитного эффекта, в частности, на рыбах и на пчелах. Эти сведения заслуживают серьезного внимания, особенно с учетом того, что brassinosterоиды по своей структуре близки к другому классу фитостероидов – экдистероидам, находящим все более широкое применение в медицине и ветеринарии.

И хотя в ряду brassinosterоидов пока не выявлены соединения с высокой физиологической активностью в отношении человека и животных, полагают, что таковыми могут стать структурно модифицированные представители этого класса полиоксистероидов. В рамках выяснения путей возможного влияния brassinosterоидов на организм млекопитающих были изучены эффекты эпикастастерона, (22S,23S)-гомобрассинолида, (22S,23S)-эпибрассинолида и экдистерона на каталитические свойства монооксигеназной ферментной системы клеток печени, участвующей в организме млекопитающих в метаболической активации проканцерогенных веществ типа бенз(а)пирена.

Материалы и методы исследования. В работе использованы реактивы: трис-(оксиметил)-аминометан, (Реахим, РФ), бычий сывороточный альбумин, свободный от жирных кислот (Serva, Германия); NaOH и KOH (Lachema, Чехия); дитиотрейтол, никотинамид-адениндинуклеотид-фосфат восстановленный (НАДФН) (Serva, Германия); бенз(а)пирен (Б(а)П), 7-этоксирезорурфин, 7-этоксикумарин, диметилсульфоксид (Sigma, США).

Глицерин, глицин, трихлоруксусная кислота были производства РФ, марки «х. ч.».

В работе использовали эпикастастерон, (22S,23S)-гомобрассинолид, (22S,23S)-эпибрассинолид и экдистерон, синтезированные и охарактеризованные под руководством члена-корреспондента НАН Беларуси В. А. Хрипача в лаборатории химии стероидов ИБОХ НАН Беларуси. Общая структура brassinosterоидов (на примере брассинолида) приведена на рис. 1.

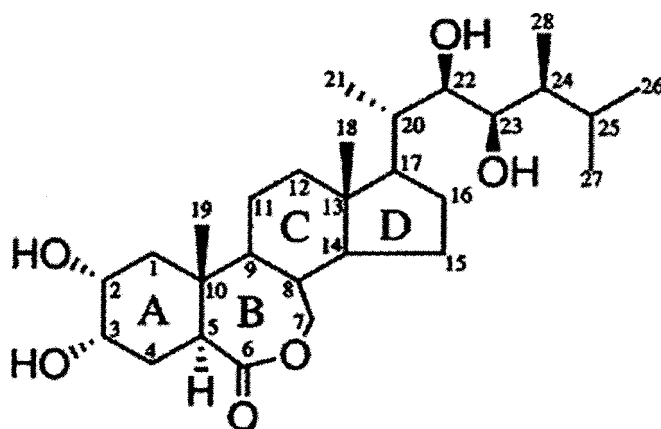


Рис. 1. Общая структура brassinosterоидов (на примере брассинолида)

В качестве биохимической модели использовали микросомы, полученные из клеток печени интактных и индуцированных метилхолантреном крыс-самцов 3-месячного возраста с массой тела 200 г.

Определение каталитической активности цитохрома P450 по отношению к 7-этоксикумарину проводили по методу [5]. Окислительное деалкилирование 7-этоксикумарина проводили при 30°C в 1 мл 0,1 М трис-НСl буфере (рН 7,2), содержащим микросомы интактных животных (конц. цит. P450 = 150 пмоль/мл). Реакцию начинали добавлением НАДФН и проводили в течение 10 мин на шейкере Water-Bath-Shaker-375 (Польша). Начальная концентрация 7-этоксикумарина составляла 140 мкМ. Останавливали реакцию добавлением 0,5 мл 0,3 М раствора трихлоруксусной кислоты. Концентрацию продукта (7-гидроксикумарина) определяли на спектрофлуориметре SFL-1211A (Solar, Беларусь) при длине волны возбуждения 375 нм и длине волны испускания 455 нм в глицин-NaOH-буферном растворе (1,6 М, рН 10,3).

Определение каталитической активности цитохрома P450 по отношению к бенз(а)пирену проводили по методу [6] с некоторыми модификациями. Так, окисление Б(а)П проводили при 37°C в 1 мл 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащим микросомы индуцированных животных (конц. цит. P450 = 55 пмоль/мл). Реакцию начинали добавлением НАДФН и проводили в течение 20 мин. Начальная концентрация Б(а)П составляла 0,7 мкМ. Останавливали реакцию добавлением 1 мл холодного (0-4°C) ацетона. После добавления ацетона вносили 3,25 мл гексана и экстрагировали смесь в течение 1 мин с использованием микрошейкера Micro-Shaker-326m (Польша). Из органической фазы отбирали 1 мл образца и экстрагировали 2 мл 1 н. NaOH. Концентрацию 3-гидрокси-Б(а)П (продукта реакции) в щелочной фазе определяли спектрофлуориметрически при длине волны возбуждения 396 нм и длине волны испускания 533 нм в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см.

Определение ферментативной активности цитохрома P450 по отношению к 7-этоксирезорурфину проводили по методу [7]. Окислительное дезэтилирование 7-этоксирезорурфина проводили при 37 °С в 1 мл 0,05 М трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащим микросомы индуцированных животных (конц. цит. P450 = 27,5 пмоль/мл). Реакцию начинали добавлением НАДФН и проводили в течение 10 мин. Начальная концентрация субстрата составляла 0,5 мкМ. Реакцию останавливали путем добавления 1 мл ацетона, охлажденного до 4°C. Концентрацию продукта (резорурфина) определяли спектрофлуориметрически при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 590 нм.

Получение комплекса полиоксистероидов с альбумином. Для получения комплекса вначале готовили 50 мкМ раствор стероида в диметилсульфоксиде. Затем аликвоту раствора стероида добавляли к 2%-ному раствору бычьего сывороточного альбумина в мольном соотношении полиоксистероид/белок 3/1.

Результаты исследований и их обсуждение. Сравнительная характеристика влияния органических веществ на биосистемы часто осложнена ограниченной водорастворимостью и, как следствие, малой, а иногда, к тому же, и существенно различной биодоступностью исследуемых соединений. Для минимизации этого эффекта в настоящей работе полиоксистероиды использовали в комплексах с альбумином. Образование комплекса характеризовали параметрами собственной флуоресценции белка: $A = (I_{320}/I_{360})_{296}$; $B = (I_{320}/I_{360})_{280}$ и $\Delta = B - A$, где I_{320} и I_{360} – интенсивность флуоресценции при длинах волн 320 и 360 нм соответственно [8]. Величины за скобками указывают на длину волны возбуждения флуоресценции. В соответствии с работами [8, 9] величина А характеризует вклад триптофановых остатков в суммарную флуоресценцию белка, а параметр Δ характеризует вклад в суммарную флуоресценцию остатков тирозина. Полученные нами значения А, В и Δ, а также положение максимумов испускания флуоресценции при длинах волн возбуждения 280 и 296 нм сведены в таблицу. Данные таблицы позволяют утверждать, что добавление к альбумину различных brassinosteroidов в мольном соотношении стероид/белок 3/1 сопровождается достоверным изменением параметров флуоресценции белка ($p < 0,05$), что можно интерпретировать как конформационные изменения, обусловленные образованием альбумин/стероидного комплекса.

Причем близкие величины А, В и Δ для комплексов альбумина со всеми соединениями свидетельствуют в пользу идентичности образующихся белок/стероидных структур ($p > 0,05$).

Характеристика формы спектров собственной флуоресценции сывороточного альбумина и его комплексов с brassinosteroidами в мольном соотношении белок/стероид 1/3

Объект	$I_{320/296}$	$I_{360/296}$	$I_{320/280}$	$I_{360/280}$	А	В	Δ	$\lambda_{\max/296}$	$\lambda_{\max/280}$
Альбумин	363	482	661	779	0,75	0,85	0,1	343	343
Альбумин + эпикастастерон	331	439	592	695	0,73	0,82	0,09	344	344
Альбумин + (22S,23S) - гомобрассинолид	373	511	653	806	0,73	0,81	0,08	344	344
Альбумин + (22S,23S) - эпибрассинолид	394	545	648	822	0,72	0,79	0,07	344	344
Альбумин + эдикстерон	371	522	652	812	0,71	0,80	0,09	344	344

Оценка влияния брассиностероидов на окислительное деалкилирование 7-этоксикумарина микросомами печени интактных животных.

Для характеристики влияния на организм человека и животных брассиностероидов и, в частности, для выявления возможной значимости в этом процессе структурных особенностей фитогормонов нами использована биохимическая модель – монооксигеназная система микросом печени крыс как интактных, так и получавших 20-метилхолантрен животных. Для оценки базальной активности монооксигеназной системы в качестве субстрата применен 7-этоксикумарин, поскольку это соединение является субстратом большинства изоэнзимов цитохрома P450, входящих в состав микросомальной фракции клеток печени. Для количественной оценки эффективности брассиностероидов применяли величину IC_{50} , представляющую собой концентрацию ингибитора, при которой регистрируется двукратное уменьшение скорости реакции. Отметим, что для корректного определения параметра IC_{50} необходимо использовать концентрации субстрата, равные или близкие к величине константы Михаэлиса (K_m). Определенное в условиях наших опытов значение K_m в случае окислительного деалкилирования 7-этоксикумарина микросомами печени интактных животных составило 140 мкМ.

Зависимости, характеризующие степень воздействия брассиностероидов на катализируемую монооксигеназной системой реакцию деалкилирования 7-этоксикумарина, показаны на рис. 2. В соответствии с рис. 2, IC_{50} для (22S,23S)-гомобрассинолида в реакции окисления 7-этоксикумарина составляет около 25 мкМ. В случае эпикастерона и (22S,23S)-эпibrассинолида IC_{50} составляют 130 мкМ и 150 мкМ соответственно. Эффект экдистерона при его концентрациях меньше 250 мкМ практически не проявляется.

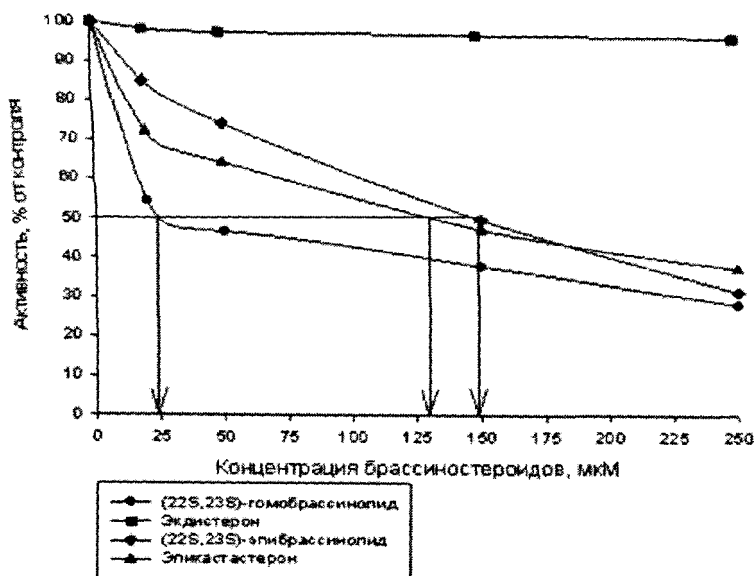


Рис. 2. Зависимость скорости окисления 7-этоксикумарина монооксигеназной системой в присутствии брассиностероидов. Начальная концентрация 7-этоксикумарина – 140 мкМ

Оценка влияния брассиностероидов на реакции окисления бенз(а)пирена и 7-этоксирезорифина микросомами печени животных, индуцированных метилхолантrenom.

Известно, что введение животным 20-метилхолантрена приводит к усиленному синтезу и тем самым к обогащению микросомальной фракции клеток печени изоэнзимами цитохрома P-450, принимающими участие в детоксикации и биоактивации проканцерогенных эндогенных и экзогенных соединений. Процессы детоксикации и биоактивации наиболее наглядно обоснованы на примере бенз(а)пирена. Так, окисление Б(а)П цитохромом P-450 с образованием фенольных и диольных производных, которые в свою очередь являются субстратами трансфераз, представляет собой один из главных путей вывода из организма проканцерогенных полициклических ароматических соединений, т. е. их детоксикации. Напротив, эпоксилирование дигидроксипроизводных Б(а)П (например, 7,8-дигидрокси-дигидробенз(а)пирена) приводит к появлению соединений, обладающих сильными канцерогенными свойствами, т. е. к канцерогенной биоактивации. Широко используемым субстратом, надежно отражающим биоактивирующую функцию цитохрома P-450, считается 7-этоксирезорифин [10]. Детоксицирующую эффективность монооксигеназной системы логично характеризовать реакцией гидроксилирования бенз(а)пирена. Обе эти реакции использованы нами в настоящей работе в качестве тестовых.

Определенные в условиях наших опытов значения K_m составили 0,5 и 0,7 мкМ для 7-этоксирезорфуина и бенз(а)пирена соответственно. Зависимости, характеризующие степень воздействия brassinosterоидов на катализируемую монооксигеназной системой реакцию деалкилирования 7-этоксирезорфуина, показаны на рис. 3. В соответствии с рис. 3 лишь два из изученных соединений обладают значительным влиянием на реакцию окисления 7-этоксирезорфуина. IC_{50} для (22S,23S)-гомобрасинолида и экдистерона составляют 25 мкМ и 65 мкМ соответственно. В случае эпикастастерона его эффект в данных концентрациях практически не проявляется. Укажем, что для достижения 55–60 %-ного ингибирования (22S,23S)-эпибрасинолидом необходимо увеличение концентрации соединения до 250 мкМ.

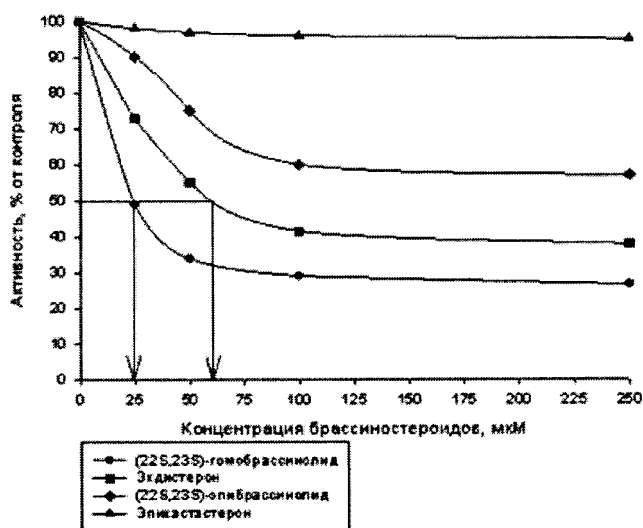


Рис. 3. Зависимость скорости окисления 7-этоксирезорфуина монооксигеназной системой в присутствии брасиностероидов. Начальная концентрация 7-этоксирезорфуина – 0,5 мкМ

В заключение отметим, что все исследованные соединения не оказывают существенного влияния на модельную реакцию детоксикации проканцерогенного вещества – Б(а)П (рис. 4). Действительно, в случае (22S,23S)-гомобрасинолида и (22S,23S)-эпибрасинолида в исследованном диапазоне концентраций стероида их эффект не проявляется вообще, а добавление в систему эпикастастерона и экдистерона приводит лишь к 30%-ному ингибированию процесса.

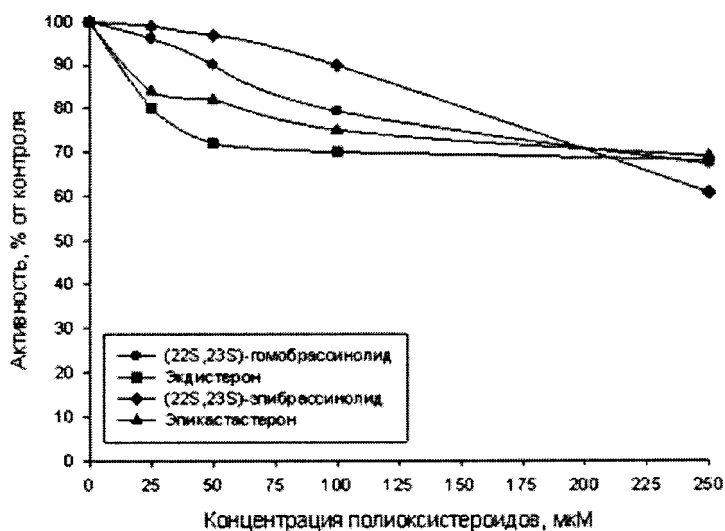


Рис. 4. Скорость накопления 3-гидроксибенз(а)пирена в присутствии брасиностероидов. Начальная концентрация бенз(а)пирена – 1 мкМ

Выводы. 1. Впервые продемонстрировано влияние brassinosterоидов на монооксигеназную ферментную систему микросом печени млекопитающих. Это влияние можно рассматривать как положительное, поскольку речь идет о ингибировании процессов, потенциально ведущих к активации проканцерогенных веществ.

2. Степень влияния brassinosterоидов на монооксигеназную систему клеток печени млекопитающих существенным образом зависит как от структуры боковой цепи, так и кольца А.

Литература

1. Shozo F., Yokota T. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003. Vol. 54. P. 137–154.
2. Grove M. D., Spencer G. F., Rohwedder W. K. et al // *Nature.* 1979. Vol. 281. P. 216–217.
3. Хрипач В. А., Лахвич Ф. А., Жабинский В. Н. Брассиностероиды. Минск: Наука и техника, 1993.
4. Khrpach V. A., Zhabinskii V. N., de Groot A. E. *Brassinosteroids: a new class of plant hormones.* San Diego, CA: Academic Press, 1999.
5. Aitio A. // *Anal. Biochem.* 1978. Vol. 85, N. 2. P. 488–491.
6. Nebert D. W., Gelboin H. V. // *J. Biol. Chem.* 1968. Vol. 243, N. 23. P. 6242–6249.
7. Burke M. D., Mayer R. T. // *Chem. Biol. Interact.* 1983. Vol. 45. P. 243–258.
8. Туроверов К. К., Щелчков Б. В. // *Биофизика.* 1970. Т. 15. С. 965–970.
9. Конев С. В. *Электронно-возбужденное состояние биополимеров.* Минск: Наука и техника, 1965. С. 186.
10. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. *Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков.* Новосибирск: Наука, 1981.

A. G. SYSA

THE INFLUENCE OF POLYOXYSTEROIDS ON THE MONOOXYGENASE ACTIVITY OF THE MAMMALS' LIVER CELLS

Summary

The influence of polyoxysteroids on the catalytic properties of monooxygenase system of the mammals' liver cells participating in the metabolic activation of the procarcinogenic chemicals like benzo(a)pyrene was shown. The physiological importance of process for functioning an organism of mammals was discussed.