

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS  
CENTRAL BOTANICAL GARDENS  
Laboratory of Plant Biochemistry and Biotechnology

# **CELL NUCLEI OF PLANTS — EXPRESSION AND RECONSTRUCTION**

After Materials of I Regional Conference,  
Minsk, 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup> of July, 2001)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД  
Лаборатория биохимии и биотехнологии растений

# **Клеточные ядра растений — Экспрессия и реконструкция**

Материалы I Региональной научной конференции  
г. Минск, 28–29 мая 2001 г.

Минск  
2001

## ГЕНОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ФЛАВОЛИГНАНОВ И КОНДЕНСИРОВАННЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ.

Червяковский Е.М., Курченко Н.В., Кукулянская Т.А.,  
Новиков Д.А., Гавриленко Н.В., Матюнина М.В.,  
Федоренко И.В., Курченко В.П., Решетников В.Н.,  
Спиридович Е.В.

220050, г. Минск, пр. Фр. Скорины, 4, Белгосуниверситет, биологический факультет, каф. биохимии. Тел: (017)277-18-34, факс: (017)277-55-35; e-mail: biochem@bio.bsu.unibel.by

---

Флаволигнаны из расторопши пятнистой и конденсированные фенолы – меланины обладают антиоксидантными свойствами и способны предотвращать повреждение ДНК, вызванные радикальными продуктами окисления бензидина. Они проявляют генопротекторные свойства в тесте Эймса на штаммах S.t. TA-98 и S.t. TA-100, предотвращая мутации типа замены пар оснований и сдвига рамки считывания генетического кода.

**Введение.** Одним из основных факторов, повреждающих ДНК и вызывающих мутационные изменения, являются свободные радикалы, образующиеся при метаболических превращениях ксенобиотиков. В процессе пероксидазного окисления бензидина (БД), являющегося сильным мутагеном, образуются электрофильные радикальные продукты окисления, вызывающие перекрестные сшивки ДНК. Вещества, способные связывать свободные радикалы БД, выступают в качестве генопротекторов. Такое антимутагенное действие характерно для многих антиоксидантов растительного происхождения. В клинической практике в качестве гепатопротектора широко используется силимарин, представляющий смесь флаволигнанов из расторопши пятнистой и другие фенольные соединения растений [1].

Целью нашего исследования явилось изучение антиоксидантных свойств флаволигнанов и конденсированных фенольных соединений – меланинов, а также их способности предотвращать повреждения ДНК и мутации, вызванные пероксидазными окислителями бензидина.

### **Материалы и методы.**

Пероксидазное окисление проводили по ранее описанному методу [2].

Спектральный анализ проводили на СФ-26 (“ЛОМО”, Россия) и “Specord”M-40 (“Carl Zeiss”, ГДР).

**Электрофорез ДНК** вели в 0,9% агарозном геле в трис-фосфатном буфере, содержащем бромистый этидий при напряжении 5В/см<sup>2</sup>. Для нанесения проб использовали буфер, содержащий бром-феноловый синий. В лунку вносили 0,5мкг ДНК [3].

**Метод гель-хроматографии** [4] использовали для разделения и очистки ДНК, участвовавшей в пероксидазном окислении БД. В качестве сорбента использовали Toyopearl HW-75 (Tojo Soda, Япония). Хроматографию вели в 25мМ трис-НСl (рН 7,5) при скорости элюции 20 мл/ч.

**Оценка взаимодействия** ПХ с меланинами велась методом кругового дихроизма [5].

**Антимутагенное действие** исследуемых веществ проводили на микробных тест-системах по методу Эймса [6].

**Результаты и их обсуждение.** Метаболическая активация известного канцерогена БД, ведущая к образованию электрофильных радикальных продуктов реакции, может осуществляться путем гидроксирования по азоту или ароматическому кольцу, а также в результате пероксидазного окисления различными гемопroteинами: цитохромом Р-450, иод-пероксидазой, простагландинсинтеазой, миелопероксидазой и др. В связи с этим нами изучены антиоксидантные и генопротекторные свойства флаволигнанов и меланинов из винограда, чая, ряда микро- и макромицетов в процессе пероксидазного окисления БД цитохромом Р-450, пероксидазой хрена (ПХ) и другими гемопroteинами. Наиболее типичные результаты представлены на примере ингибиторного анализа окисления БД пероксидазой хрена в присутствии меланина из винограда. Анализ кинетических кривых накопления продуктов пероксидазного окисления БД (рис. 1.А) показывает, что меланин из винограда ингибирует этот процесс с высокой эффективностью. Образование продуктов реакции при возрастающих концентрациях ингибитора имеет период индукции продолжительность которого нелинейна (рис. 1.В), что свидетельствует о сложном влиянии на фермент высоких концентраций меланина.

Согласно теории метода ингибиторов [7] для цепных радикальных реакций ингибитор расходуется с постоянной скоростью  $v_i/f$ , где  $f$  – стехиометрический коэффициент ингибитора, означающий число радикалов, гибнущих на одной молекуле антиоксиданта. Когда весь ингибитор расходуется, скорость процесса окисления резко возрастает. Меланин из винограда ингибирует процесс окисления БД в концентрациях 0,01 – 2,0мкМ. При низких концентра-

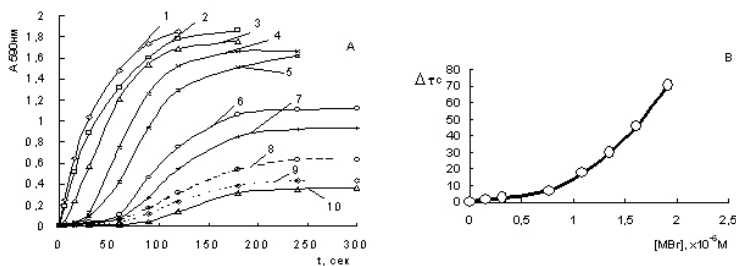


Рис. 1. Кинетические кривые образования продукта окисления бензидина пероксидом водорода при участии  $1,25\text{нМ}$  ПХ без виноградного меланина и в его присутствии (А) и зависимость периода индукции  $\Delta\tau_0$  в накоплении продукта окисления БД от концентрации меланина (В). Условия:  $0,1\text{М}$  цитратно-ацетатный буфер (рН 5,5),  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{ПХ}=1,25 \times 10^{-9}\text{М}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2=10^{-3}\text{М}$ ,  $\text{БД}=5 \times 10^{-5}\text{М}$ , [МВг] (А) – 0 (1), 0,15 (2), 0,3 (3), 0,76 (4), 1,1 (5), 1,35 (6), 1,7 (7), 2,2 (8), 2,5 (9),  $3,0 \times 10^{-6}\text{М}$  (10).

циях ингибитора ( $0,15 - 0,7\text{мкМ}$ ) коэффициент  $f > 2$ , что характерно для многих фенольных антиоксидантов. При концентрациях меланина от 1 до  $3\text{мкМ}$   $f > 14-18$ . Полученная величина подтверждает высокую эффективность полимерного антиоксиданта в процессе пероксидазного окисления БД.

Принципиально важно в какой степени меняется скорость окисления БД после расходования ингибитора, т.е. после завершения периода индукции. На рис.2.А видно, что с увеличением соотношения  $[\text{InH}]/[\text{ПХ}]$  величина  $v/v_0$  снижается. На рис.2.В та же зависимость в координатах Диксона представляет собой два линейных участка, разделенных точкой излома, приходящейся на кон-

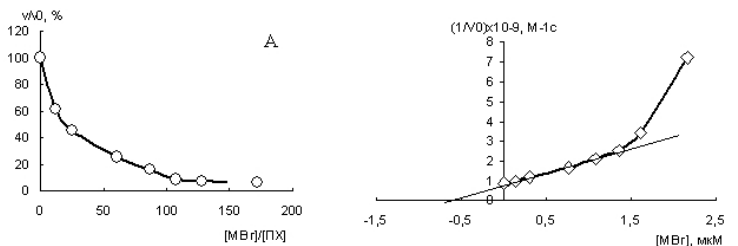


Рис. 2. Зависимости относительной скорости окисления бензидина от соотношения  $[\text{МВг}]/[\text{ПХ}]$  (А) и обратной величины начальной скорости окисления БД от концентрации ингибитора (В). Условия:  $0,1\text{М}$  цитратно-ацетатный буфер (рН 5,5),  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{ПХ}=1,25 \times 10^{-9}\text{М}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2=10^{-3}\text{М}$ ,  $\text{БД}=5 \times 10^{-5}\text{М}$ .

центрацию ингибитора  $\sim 1,5\mu\text{M}$ . Такая зависимость свидетельствует о том, что ингибитор связывается с ПХ по двум центрам, отличающимся родством к меланину. Комплексообразование меланина и ПХ подтверждается результатами гель-хроматографии (Тоуарpearl HW-65,  $1,5 \times 72\text{cm}$ ) смеси ПХ и меланина. В результате их взаимодействия комплекс имеет большую массу и илюируется значительно раньше, чем фермент и меланин. Комплексообразование меланина и ПХ подтверждается также изменением молярной эллиптичности в спектрах КД пероксидазы в УФ-области (200-260нм) и уменьшением содержания  $\beta$ -спиральных участков. Прямое взаимодействие фермента и ингибитора влечет нарушение вторичной структуры, что снижает каталитическую активность ПХ. Это подтверждается значительным снижением скорости окисления БД после окончания периода индукции, вызванного присутствием в системе окисления антиоксиданта – меланина.

По своей химической природе меланин является полиядерным фенолом, способным выполнять роль ловушки радикальных продуктов и служить полимерной матрицей для ковалентной модификации пероксидазными оксидантами БД. Меланин, выделенный из реакционной среды окисления БД, увеличился в массе на 3,7 кДа, о чем свидетельствуют результаты гель-хроматографии, и в спектре поглощения появился максимум на 295нм, характерный для БД [8]. Кроме того, произошел рост интенсивности сигнала ЭПР и увеличение содержания парамагнитных центров с  $1,49 \times 10^{19}$  спин/г для контрольного меланина, до  $2,16 \times 10^{19}$  спин/г для меланина, взаимодействовавшего с оксидантами бензидина. Такое увеличение концентрации парамагнитных центров в меланине может быть связано с его модификацией бензидином, которая по нашим данным составляет 20 молекул ароматического амина на молекулу пигмента, или с увеличением числа дополнительных неспаренных двойных связей в результате пероксидазного окисления –ОН группы меланина.

Таким образом, меланины являются высокоактивными антиоксидантами на молекуле которых гибнет около 18-20 радикальных продуктов окисления, при этом часть промежуточных продуктов ковалентно взаимодействуют с полимером, существенно меняя его структуру. Такой антиоксидант способен предотвращать образование перекрестных сшивок ДНК (рис.3), вызванных продуктами пероксидазного окисления БД (рис.3.В, дор.2).

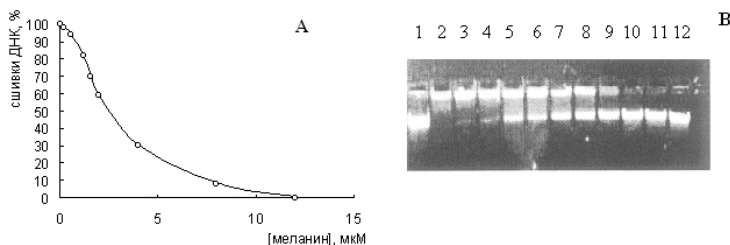


Рис.3. А - Влияние меланина из винограда на процесс образования сшивок ДНК при пероксидазном окислении бензидина; В – Накоплены агрегированной бензидином ДНК на старте в зависимости от концентрации в реакционной среде меланина. Условия: 0,1М цитратно-ацетатном буфер (рН 5,5), 30°C, 5 мин, ПХ -  $1,25 \times 10^{-9}$ М, БД -  $5 \times 10^{-5}$ М,  $\text{H}_2\text{O}_2$  -  $10^{-3}$ М, МВГ - 0(2), 0,2(3), 0,6(4), 1,2(5), 1,6(6), 2,0(7), 4,0(8), 8,0(9), 12,0(10), 16,0(11), 20,0мкМ (12).

В результате исследований было установлено, что меланины из винограда (рис.3), черного чая и меланины из макро- и микромицетов предотвращают образование перекрестносшитой ДНК. Постепенное увеличение концентрации меланина из винограда в реакционной среде от 0,2 до 20,0 мкМ приводит к резкому уменьшению количества образующихся повреждений ДНК продуктами пероксидазного окисления БД (рис. 3.А, рис. 3.В, дор.3-12).

Сравнительная оценка эффективности предотвращения повреждения ДНК различными меланинами показала, что растительные меланины из винограда и черного чая обладают более выраженными генопротекторными свойствами, чем меланины нафталинового типа из макро- и микромицетов. Такое отличие эффективных концентраций для пигментов из винограда и чая в процессе защиты молекул ДНК от повреждающего действия продуктов окисления аминобифенилов бензидинового ряда может быть связано со структурными различиями изучаемых пигментов.

Повреждения ДНК пероксидазными окислителями бензидина являются мерой его генотоксической активности, которая подтверждена нами в микробиологическом тесте Эймса на штаммах *S.t.* TA-98 и *S.t.* TA-100, в котором продукты окисления БД вызывали рост мутаций типа замены пар оснований и сдвига рамки считывания генетического кода в 6-10 раз по сравнению со спонтанным уровнем. Все исследованные нами меланины, внесенные в среду

метаболической активации БД и среду культивирования в микромолярных количествах, предотвращали мутационные процессы.

Среди фенольных антиоксидантов особое место занимают флавоноиды, многие из которых проявляют антимуtagenные свойства [9]. В клинической практике в качестве гепатопротектора нашел широкое применение силимарин, представляющий собой экстракт из расторопши пятнистой, в который входят флаволигнаны: силибинин, силикрестин и силидианин. Из силимарина нами выделены и очищены эти флаволигнаны и изучены их антиоксидантные и генопротекторные свойства. Показано, что флаволигнаны эффективно ингибируют процесс метаболической активации бензидина по пероксидазному пути окисления, предотвращая накопление активных метаболитов, способных вызывать перекрестные сшивки ДНК (рис.4). Сравнительная оценка эффективности их генопротекторного действия возрастает в ряду силимарин, силикрестин, силибинин.

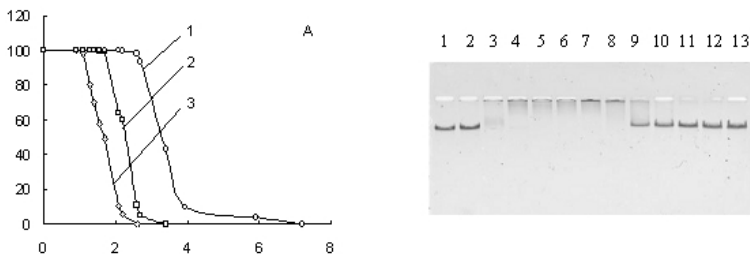


Рис. 4. А - Влияние флаволигнанов из расторопши пятнистой (силимарин (1), силикрестин (2), силибинин(3)) на процесс образования сшивок ДНК при пероксидазном окислении бензидина; В – Накоплены агрегированной бензидином ДНК (дор.3-13) на старте в зависимости от концентрации в реакционной среде силимарина. Условия: 0,1М цитратно-ацетатном буфер (рН 5,5), 30°C, 5 мин, ПХ -  $1,25 \times 10^{-9}$ М, БД -  $5 \times 10^{-5}$ М,  $H_2O_2$  -  $10^{-3}$ М, силимарин - 0(3), 0,86(4), 1,07(5), 1,34(6), 1,68(7), 2,1(8), 2,62(9), 3,28(10), 4,1(11), 5,2(12), 6,4 мкг/мл (13).

Таким образом, взаимодействие радикальных промежуточных продуктов пероксидазного окисления БД с молекулой ДНК может быть предотвращено конденсированными полифенолами (меланинами) и флаволигнанами из расторопши пятнистой, обладающими выраженными антиоксидантными свойствами.



Продукты пероксидазного окисления БД в тесте Эймса на штаммах S.t. TA-98 и S.t. TA-100 вызывали образование мутаций типа замены пар оснований и сдвига рамки считывания, которые предотвращались внесением в среду метаболической активации меланинов.

### Литература

- 1 Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т.1. – М.: Новая волна, 2000. – С.506.
- 2 Исмаил И. Роль пероксидазного окисления в метаболической активации бензидина и его канцерогенных производных: Автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.04 / Инст. Радиобиол. НАНБ. – Мн., 1992. –35с.
- 3 Уильямс Б., Уилсон К. Методы практической биохимии. - М.: Мир, 1978 - 328с.
- 4 Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. - М.: Наука, 1985 – 635с.
- 5 Власов А.П., Яхонтова Л.И., Андрианов В.Т. Микрокалориметрическое исследование тепловой денатурации ДНК из тимуса теленка в присутствии ионов магния. // Биофизика. 1991. Т.36ю №3. С. 437-440.
- 6 AmesB.N., Lee F.D., Durston W.E. – Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973 а, 70, №3, p.782-786.
- 7 Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М.: Наука, 1965. – 315с.
- 8 Канцерогенные вещества. Справочник // Материалы международного агентства по изучению рака. / Под ред. Турусова В.С. - М.: Медицина, 1987. – 273с.
- 9 Bratia N., Zhao J., Wolf D., Agarwal R. Cfncer Lette. – 1999, №1. – P.77-84.

### Summary

Flavolignans from *Silybum marianum* and condensational phenols – melanins – features antioxidant action and capable to prevent the damage of DNA by radical products of the benzidine oxidation. Genoprotection properties of these compounds reflected in the Aims' test on the strains *S.thiphimurium* by prevented point mutations.