

**Национальная академия наук Беларуси
Центральный ботанический сад**

**Интродукция, сохранение и использование
биологического разнообразия мировой флоры**

Материалы Международной конференции,
посвященной 80-летию Центрального ботанического сада
Национальной академии наук Беларуси
(19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях
Часть 2**

**Assessment, Conservation and Sustainable Use
of Plant Biological Diversity**

Proceedings of the International Conference
dedicated to 80th anniversary of the Central Botanical Garden
of the National Academy of Sciences of Belarus
(June 19–22, 2012, Minsk, Belarus)

**In two parts
Part 2**

Минск
2012

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

И73

Редакционная коллегия:

*Д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);
д-р биол. наук, академик НАН Беларуси В.Н. Решетников;
д-р биол. наук, ч.-кор. НАН Беларуси Ж.А. Рупасова;
д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси Е.А. Сидорович;
канд. биол. наук Ю.Б. Аношенко; канд. биол. наук А.В. Башилов;
канд. биол. наук А.А. Веевник; канд. биол. наук И.К. Володько;
канд. биол. наук И.М. Гаранович; канд. биол. наук Л.В. Гончарова;
канд. биол. наук А.А. Кузовкова; канд. биол. наук Л.В. Кухарева;
канд. биол. наук Н.М. Лунина; канд. биол. наук Е.В. Спиридович;
канд. биол. наук В.И. Торчик; канд. биол. наук О.В. Чижик;
канд. биол. наук А.Г. Шутова; канд. биол. наук А.П. Яковлев.*

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

И 73 **Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры;** Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. (19–22 июня 2012, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок /и др./, Минск, 2012. – 492 с.

В сборнике представлены материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

В 1-й части публикуются тезисы докладов секций «Теоретические основы и практические результаты интродукции растений» и «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства»

Во 2-й части представлены тезисы докладов секций «Экологическая физиология и биохимия интродуцированных растений», «Генетические и молекулярно-биологические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений» и «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира».

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

Генотип- и региоселективное ингибирование проканцерогенных процессов экстрактом зверобоя продырявленного и его отдельными компонентами

Киселев П.А.¹, Шварц Д.², Бовдей Н.А.¹, Гончарова Л.В.³, Спиридович Е.В.³, Шунк В.-Х.⁴, Роотс И.²

¹ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
e-mail: kiselev@iboch.bas-net.by

² Институт клинической фармакологии университета имени Гумбольдта,
г. Берлин, Германия

³ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

⁴ Центр молекулярной медицины имени М. Дельбрюка, г. Берлин, Германия

Резюме. С использованием рекомбинантных полиморфных вариантов цитохрома P-4501A1 человека (CYP1A1.1; CYP1A1.2 и CYP1A1.4) охарактеризовано влияние полного экстракта зверобоя продырявленного, а также его индивидуальных компонентов на процесс метаболической трансформации 17 β -эстрадиола в его проканцерогенные гидроксипроизводные. Показана ярко выраженная чувствительность CYP1A1.1 (дикий тип) к действию полного экстракта зверобоя, в то время как в случае CYP1A1.2 более эффективными ингибиторами были индивидуальные компоненты экстракта – гиперин, псевдогиперин и квертин. Выявлена региоселективность процесса. Сделан вывод о возможности генотип- и региоселективной регуляции окислительной активации 17 β -эстрадиола растительными веществами.

Summary. Using recombinant polymorphic variants of human cytochrome P-4501A1 (CYP 1A1.1; CYP1A1.2 and CYP 1A1.4) the influence of the total extract of *Hypericum perforatum*, as well as its individual components on the process of metabolic transformation of 17 β -estradiol to procarcinogenic hydroxyderivatives was described. A pronounced sensitivity of CYP 1A1.1 (wild type) to the total extract of *Hypericum perforatum* was indicated, while in case of CYP 1A1.2 individual components of the extract - hypericin, pseudohypericin and quercetin were more efficient inhibitors. The process was detected to be regioselective. It is concluded that plant substances can regulate oxidative activation of 17 β -estradiol genotype-and regioselectively.

Сегодня не вызывает сомнения существенная роль цитохрома P-4501A1 человека в метаболизме важного полового гормона – 17 β -эстрадиола. Процесс реализуется непосредственно в эстроген-зависимых органах и тканях, а основным продуктом является 2-гидроксиэстрадиол [1-4]. Наряду с этим образуется некоторое количество 4-, 6 α - и 15 α -гидроксипроизводных стероида [1]. Особое внимание привлекают к себе катехольные продукты реакции – 2- и 4-E2. Обусловлено это тем, что как сам процесс дальнейшего превращения катехолов в соответствующие хиноны, так и, собственно, хиноны рассматриваются в качестве факторов, способствующих иницированию и развитию химического канцерогенеза [2, 3]. Причем считается, что канцерогенный эффект может быть результатом прямой модификации ДНК хинонами и/или является следствием деструкции последней активированными формами кислорода, возникающими в ходе реализации катехол-хинонового цикла [5]. Образование аддуктов с ДНК более характерно для 3,4-хинона, образующегося при окислении 4-гидроксиэстрадиола, который, в свою очередь, является основным продуктом реакции окисления E2 цитохромом P-4501B1 [1,3]. Напротив, высокая каталитическая активность цитохрома P-4501A1 способствует накоплению 2-ОН-E2, участие которого в катехол-хиноновом цикле, приводит к повышению уровня АФК. С другой стороны, нельзя забывать об альтернативных путях превращения катехолов. Так, в присутствии катехол-О-метилтрансферазы образуется 2-метоксиэстрадиол, который благодаря своим антипролиферативным, антиангиогенным и апоптозным свойствам рассматривается в качестве перспективного противоракового средства, оказывающего к тому же положительное влияние на функционирование ренальной и сердечно-сосудистой систем [5–11]. Наконец, укажем, что 2-ОН-E2 и 4-ОН-E2 являются субстратами глутатион- и УДФ-глюкуронсульфотрансфераз, осуществляющих их конъюгирование для вывода из организма. В целом не вызывает сомнения, что уровень катехолов в организме, а, возможно, и их физиологический эффект определяется относительной каталитической активностью нескольких ферментов. В этой связи заслуживает внимания полиморфность гена цитохрома P-4501A1.

Действительно, наряду с диким типом гена *CYP1A1*1* (белок: CYP1A1.1) обнаружено более 10 его мутированных вариантов [12, 13]. Причем некоторые мутации локализованы в кодирующем регионе, что приводит к экспрессии белков с точечными заменами аминокислот. Для носителей двух из таких генов – *CYP1A1*2* (белок: CYP1A1.2; Ile462Val) и *CYP1A1*4* (белок: CYP1A1.4; Thr462Asn) эпидемиологические исследования указывают на более высокую частоту раковых заболеваний, включая рак молочной железы [14, 15], рак простаты [16–18] и рак яичников [19]. В качестве одной из причин называют изменение каталитической ак-

тивности в отношении 17 β -эстрадиола и эстрогена. Действительно, ранее на примере рекомбинантных гемопротеидов CYP1A1.1, CYP1A1.2, и CYP1A1.4 нами была продемонстрирована существенная разница в каталитической активности дикого типа фермента и его полиморфных вариантов в реакции гидроксилирования E1 и E2 [20]. Целью настоящего исследования стал поиск путей регуляции процесса окисления 17 β -эстрадиола. В качестве потенциальных эффекторов метаболической трансформации стероидного гормона использован популярный в западных странах мягкий антидепрессант – экстракт зверобоя продырявленного и его индивидуальные компоненты (гиперицин, гиперфорин, псевдогиперицин, кверцетин, рутин), показавшие в экспериментах *in vitro* выраженную антиоксидантную, антиканцерогенную и противовоспалительную активность [21–23].

Результаты исследования. Как уже упоминалось, что как дикий тип, так и полиморфные варианты цитохрома P-4501A1 человека способны эффективно катализировать реакцию гидроксилирования 17 β -эстрадиола по нескольким положениям стероидной молекулы: C-2, C-6 и C-15 [1, 20]. В таких случаях важным представляется вопрос о возможности направленной регуляции процесса, например, путем изменения соотношения образующихся продуктов реакции. Поэтому на первом этапе работы нами была оценена региоселективность воздействия общего экстракта зверобоя продырявленного и его основных компонентов на реакцию гидроксилирования 17 β -эстрадиола. Для количественной оценки эффекта использовали величины IC₅₀, отражающие количество ингибитора, необходимое для уменьшения скорости реакции в два раза. Полученные значения IC₅₀ сведены в таблицу 1.

Как видно из табл. 1, полный экстракт зверобоя и такие его индивидуальные компоненты, как кверцетин, псевдогиперицин и гипериперин обладают выраженным ингибиторным эффектом. Причем минимальное значение IC₅₀ получено для полного экстракта, которое в случае реакции окисления стероидной молекулы по 2-му положению составляет приблизительно 19,5 мкг/мл. Напротив, другие компоненты экстракта зверобоя – гиперфорин, рутин, кофейная и хлорогеновая кислоты – ингибиторных свойств не проявляют, по крайней мере, при концентрациях меньших, чем 100 мкг/мл.

Однако особенно интересно, что ингибирование реакции гидроксилирования 17 β -эстрадиола полным экстрактом, а также псевдогиперицином и гипериперицином отличается заметной региоселективностью. Так, указанные ингибиторы более чем в два раза эффективнее подавляют реакцию образования катехола, чем гидроксилирование стероида по 6 α - и 15 α -положениям. Обращает на себя внимание практически полное отсутствие ингибиторной региоселективности у кверцетина.

С другой стороны, ранее нами было показано, что кверцетин обладает генотип-зависимой селективностью в процессе канцерогенной активации бенз(а)пирена цитохромом P-4501A1 [24,25]. Поэтому предметом следующего этапа настоящей работы стала сравнительная характеристика влияния кверцетина, гипериперина, псевдогипериперина, рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот на реакцию 2-гидроксилирования 17 β -эстрадиола CYP1A1.1 и двумя его полиморфными вариантами CYP1A1.2 и CYP1A1.4. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 1. Величины IC₅₀ для ингибиторов реакции гидроксилирования 17 β -эстрадиола, катализируемой цитохромом P-4501A1.1

Ингибитор	IC ₅₀ (мкМ)*		
	2-OH-E2	15 α -OH-E2	6 α -OH-E2
Экстракт зверобоя продырявленного	19,5	49,8	46,5
Гиперицин	9,8	24,0	22,4
Псевдогиперицин	6,8	13,0	13,7
Гиперфорин	>100	>100	>100
Кверцетин	3,2	3,7	5,1
Рутин	>100	>100	>100
Кофеиновая кислота	>100	>100	>100
Хлорогеновая кислота	>100	>100	>100

Примечание: * – Для экстракта зверобоя продырявленного IC₅₀ выражено в мг/мл.

Таблица 2. Величины IC_{50} для ингибиторов реакции 2-гидроксилирования 17 β -эстрадиола, катализируемой различными полиморфными вариантами цитохрома P-4501A1

Ингибитор	IC_{50} (мкМ) ^a		
	CYP1A1.1	CYP1A1.2	CYP1A1.4
Экстракт зверобоя продырявленного	19,5	44,1	51,8
Гиперицин	9,8	4,4	7,7
Псевдогиперицин	6,8	2,8	8,8
Гиперфорин	>100	>100	>100
Кверцетин	3,2	1,8	3,2
Рутин	>100	>100	>100

Примечание: * – Для экстракта зверобоя продырявленного IC_{50} выражено в мг/мл.

В соответствии с табл. 2 можно заключить, что ингибирующий эффект гиперпицина, псевдогиперицина и кверцетина наиболее ярко выражен по отношению к CYP1A1.2. Напротив, в отличие от индивидуальных компонентов полный экстракт зверобоя продырявленного оказывает максимальный ингибирующий эффект на дикий тип цитохрома P-4501A1. Действительно, для достижения близких степеней ингибирования в случае полиморфных вариантов гемопротеида требовались в два раза более высокие концентрации экстракта зверобоя (табл. 2).

Результаты по генотип-зависимому ингибированию реакции образования 6 α -15 α -гидроксилпроизводных 17 β -эстрадиола качественно были близки таковым, найденным для реакции формирования катехола, и поэтому не показаны. Отметим лишь, что гиперпицин, псевдогиперицин и кверцетин были приблизительно в два раза более эффективны в подавлении 6 α -15 α -гидроксилирования эстрогена цитохромом P-4501A1.2, чем CYP1A1.1 и CYP1A1.4, в то время как экстракт зверобоя оказывал более выраженный ингибирующий эффект в случае CYP1A1.1. Отметим, что по направленности воздействия на CYP1A1.1, CYP1A1.2 и CYP1A1.4 наиболее близким к полному экстракту был гиперфорин, однако степень его влияния (ингибиторная эффективность) была значительно меньше ($IC_{50} \sim 100$ мкг/мл).

Обсуждение результатов. Полученные нами ранее и в настоящей работе результаты показывают, что все три полиморфных варианта цитохрома P-4501A1 человека принимают участие в окислительном метаболизме 17 β -эстрадиола. Однако они достоверно различаются по степени каталитической эффективности и региоселективности реакции. Так, каталитическая эффективность CYP1A1.2 (Ile 462 Val) для реакции образования основного метаболита-2-гидроксиэстрадиола была примерно в 6 раз выше в сравнении с диким типом фермента, что свидетельствует в пользу функциональной значимости этой аминокислотной замены [20]. В данной работе сделана попытка в условиях *in vitro* оценить возможность генотип- и регио-зависимого ингибирования метаболического процесса природными полифенольными соединениями.

Полученные данные указывают на то, что полный экстракт зверобоя продырявленного, равно как и его некоторые индивидуальные компоненты – гиперпицин, псевдогиперицин, кверцетин, – являются эффективными ингибиторами цитохром P-4501A1-зависимой метаболической активации 17 β -эстрадиола.

Вызывает особенный интерес, что некоторые из исследованных индивидуальных компонентов в первую очередь ингибируют метаболический процесс, катализируемый мутированной формой фермента (CYP1A1.2), в то время как цельный экстракт более эффективен в отношении реакций, протекающих с участием дикого типа (CYP1A1.1).

Следует сразу сказать, что нами использованы лишь основные по содержанию индивидуальные компоненты экстракта зверобоя. Поэтому нельзя исключить, что ингибирующие свойства экстракта определяются компонентом и/или компонентами с высокой ингибирующей эффективностью, но с низким его содержанием в экстрактах. Альтернативный вариант подразумевает возможность того, что свойства экстракта определяются соединением с относительно низкой ингибирующей эффективностью, но присутствующем в экстракте в высокой концентрации, например, гиперфоринном. Причем необходимо учитывать возможность синергетических эффектов, способных изменить профиль действия цельного экстракта в сравнении с таковым отдельных индивидуальных компонентов. Однако ответы на эти вопросы невозможны без проведения дополнительных экспериментов, в т.ч. в условиях *in vivo*. На

данном этапе исследования можно лишь утверждать, что применение препаратов на основе зверобоя в рекомендованных дозах способно приводить к внутриклеточному накоплению полифенольных соединений в концентрациях, лежащих в диапазоне величин IC_{50} , зарегистрированных в настоящей работе. В свою очередь, это может приводить к генотип-зависимому влиянию полифенольных соединений на метаболическую активацию 17β -эстрадиола и определять индивидуальную чувствительность к их действию.

Список литературы:

1. Lee, A.J., Cai, M.X., Thomas, P.E., Conney, A.H., and Zhu, B.T. *Endocrinology*, 2003, v. 144, p. 3382–3398.
2. Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J.G., Rogan, E., and Roy, D. *J. Natl. Cancer. Inst. Monog.*, 2000, v. 27, p. 75–93.
3. Hanna, I.H., Dawling, S., Guengerich, F.P., and Par, F.F. *Cancer. Res.*, 2000, v. 60, p. 3440–3444.
4. Bugano, D.D., Conforti-Froes, N., Yamaguchi, N.H., and Baracat, E.C. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, 2008, v. 29, p. 313–320.
5. Liehr, J.G., and Roy, D. *Free Radical Biol. Med.*, 2002, v. 8, p. 415–423.
6. Zhu, B.T. *Curr. Drug. Metab.*, v. 3, p. 321–349.
7. Zhu, B.T., and Conney, A.H. *Carcinogenesis*, 1998, v. 19, p. 1–27.
8. Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Keller, P.J., Imthurn, B., Zacharia, L.C., and Jackson, E.K. *Hypertension*, 2002, v. 39 (part 2), p. 418–424.
9. Zacharia, L.C., Gogos, J.A., Karayiorgou, M., Jackson, E.K.; Gillespie, D.G., Barchiesi, F., and Dubey, R.K. *Circulation*, 2003, v. 108, p. 2974–2978.
10. Lakhani, N.J., Sarkar, M.A., Venitz, J., and Figg. W.D. *Pharmacotherapy*, 2003, v. 23, p. 165–172.
11. Cizek, M., Iwaniec, U., Goblirsch, M., Vrabec, A., Ruan, M., Clohisey, D.R., Turner, R.R., and Oursler, M.J. *Cancer. Res.*, 2007, v. 67, p. 10106–10111.
12. <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp1A1.htm>.
13. Zhou, S.F., Liu, J.P., and Chowbay, B. *Drug. Metab. Rev.*, 2009, v. 41, p. 89–295.
14. Huang, C.S., Chern, H.D., Chang, K.J., Cheng, C.W., Hsu, S.M., and Shen, C.Y. *Cancer. Res.*, 1999, v. 59, p. 4870–4875.
15. Firozi, P.F., Bondy, M.L., Sahin, A.A., et al. *Carcinogenesis*, 2002, v. 23, p. 301–306.
16. Murata, M., Watanabe, M., Yamanaka, Y., Kubota, Y., Ito, H., Nagao, M., Katoh, T., Kamataki, T., Kawamura, J., Yatani, R., and Shiraiishi, T. *Cancer. Lett.*, 2001, v. 165, p. 171–177.
17. Suzuki, K., Matsui, H., Nakazato, H., Koike, H., Okugi, H., Hasumi, M., Ohtake, N., Nakata, S., Takei, T., Hatori, M., Ito, K., and Yamanaka, H. *Cancer. Lett.*, 2003, v. 195, p. 177–183.
18. Shaik, A.P., Jamil, K., and Das, P. *Urol. J.*, 2009, Spring: v. 6 (2), p. 78–86.
19. Aktas, D., Guney, I., Alikasifoglu, M., Yuce, K., Tuncbilek, E., and Ayhan, A. *Gynecol. Oncol.*, 2002, v. 86, p. 124–128.
20. Kisselev, P., Schunck, W.H., Roots, I., and Schwarz, D. *Cancer. Res.*, 2005, v. 65, p. 2972–2978.
21. Butterweck V. *CNS Drugs*, 2003, v. 17, p. 539–562.
22. Johne, A., Mai, I., Bauer, S. in *Phytopharmaka VII* (V. Schulz, V., Rietbrock, N., Roots, I., Loew, D., ed) Steinkopf Verlag, Darmstadt, 2001, p. 149–161.
23. Nahrstedt, A., and Butterweck, V. *Pharmacopsychiatry*, 1997, v. 30, p. 129–134.
24. Schwarz, D., Kisselev, P., Ericksson, S.S., Szklarz, G.D., Chernogolov, A., Honeck, H., Schunck, W.H., and Roots, I. *Biochem. Pharmacol.* 2004, v. 67, p. 1445–1457.
25. Schwarz, D., Kisselev, P., and Roots, I. *Eur. J. Cancer.*, 2005, v. 41, p. 151–158.

Изменчивость льна-долгунца в культуре *in vitro* как источник получения новых селекционных форм

Кубрак С.В.¹, Шаптуренко М.Н.¹, Титок В.В.², Хотылева Л.В.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
e-mail: S.Kubrak@igc.bas-net.by

² Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Резюме. Представлены данные по использованию культуры *in vitro* для получения соматоклональных вариантов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), которые могут стать исходным материалом при создании новых сортов и расширении генофонда льна. Методом ПЦР с произвольными праймерами установлено отличие соматоклональных линий от исходного сорта. На основе фенотипических изменений выделены перспективные образцы, обладающие рядом хозяйственно-полезных признаков.

Summary. We present the data about the usage techniques *in vitro* for obtaining somaclonal variants of flax plants, that may become the source for development new varieties and widening of flax genepool. Differences between original cultivar and somaclonal lines was studied by RAPD-PCR. Economical promising forms were identified on the basis of phenotypical changes of agriculturally valuable traits.

Культивирование изолированных растительных тканей относится к активно развивающимся направлениям сельскохозяйственной биотехнологии и применяется в качестве самостоятельного подхода или как дополнение к традиционным методам. Регенерация растений *in vitro* позволяет получать генетически измененные соматоклональные варианты, которые