

ках и культуральной жидкости, а также путем детекции пектинлиазы с помощью иммуоблоттинга.

Литература

1. Chatterjee A., Cui Y., Liu Y., Dumenyo K., Chatterjee A. K. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density – sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone // Appl. and Env. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. №5 – P. 1959–1967.
2. Toth I. K., Bell K. S., Holeva M. C., Birch P. R. J. Soft rot erwiniae: from genes to genomes // Mol. Plant Pathol. – 2003. – Vol. 4. №1 – P. 17–30.
3. Nguyen H. A., Kaneko J., Kamio Y. Temperature-dependent production of carotovoricin Er and pectin lyase in phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2002. – Vol. 66. №2 – P. 444–447.
4. Godfrey V., Hyman L. J., McMillan G. P., Old D. C., Perombelon M. C. M. Purification and characterization of mitomycin C-induced pectin lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* strain SCRI 1043 // J. Appl. Bacteriol. – 1994. – Vol. 76. – P. 13–21.
5. McEvoy J.L., Murata H., Chatterjee A. K. Molecular cloning and characterization of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase gene that responds to DNA-damaging agents // J. Bacteriol. – 1990. – Vol. 172. №6 – P. 3284–3289.
6. Ageichik A.V., Evtushenkov A.N., Nikolaichik Y.A. The role of type III secretion system in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* virulence // Plant Protect. Sci. – 2002. – Vol. 38. – P. 523–527.
7. Николайчик Е.А., Песнякевич А.Г. Кольцевая генетическая карта хромосомы *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 3–2 // Генетика. – 1995. – Т. 31. №8 – С. 1052–1058.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование / М.: Мир, 1984. 479 с.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / М.: Мир, 1976. 436 с.

ПРОТИВОЛЕЙКОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ФЛАВОНОИДОВ

Т. В. Романовская

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) – это злокачественное заболевание крови, для которого на сегодняшний день нет достаточно эффективных методов терапии. В связи с этим ведется активный поиск новых, более эффективных противолейкозных агентов [1; 2]. Одной из перспективных групп являются флавоноиды. Многочисленные исследования показали, что некоторые из них способны ингибировать протеин киназы и ряд других ферментов, участвующих в регуляции клеточного цикла, а также специфично ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз раковых клеток [3; 4]. Мы поставили перед собой цель изучить противолейкозные свойства кверцетина как наиболее изученного среди флавоноидов. В качестве модели ХМЛ мы брали клеточную линию K562.

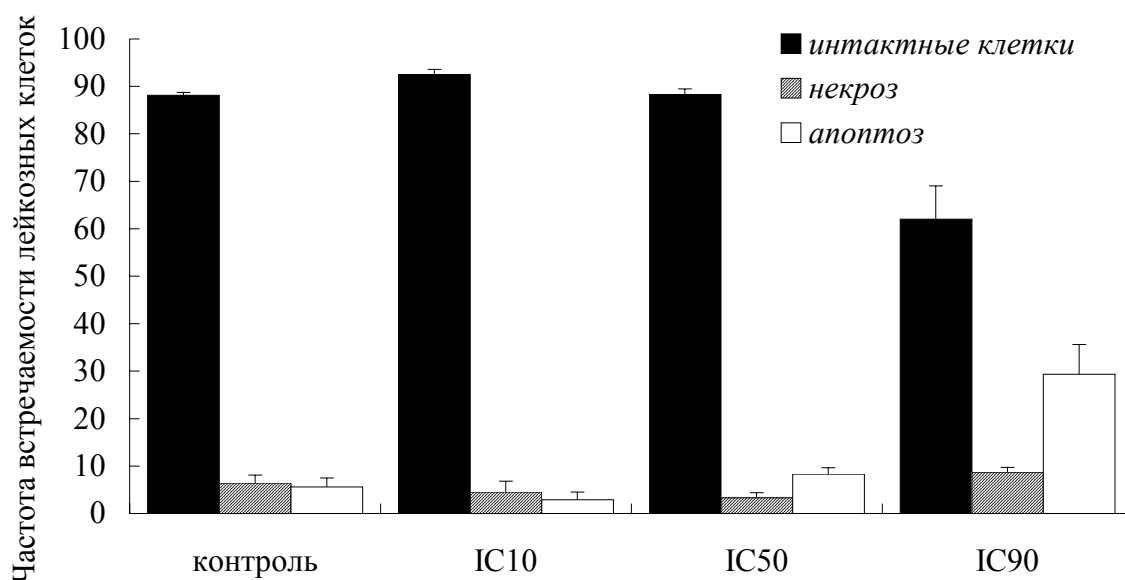


Рис. 1. Индукция апоптоза/некроза клеток линии K562 эритробластного криза ХМЛ человека флавоно-3-олом кверцетином

Результаты МТТ теста показали наличие у кверцетина выраженного дозо- и время-зависимого цитотоксического/цитостатического эффекта.. Для того чтобы выяснить, как именно реализуется этот эффект, мы использовали ряд дополнительных методов. При этом исследовалось действие трех доз кверцетина, соответствующих IC_{10} (18,9 мкМ), IC_{50} (81,1 мкМ) и IC_{90} (347,5 мкМ), рассчитанных исходя из результатов МТТ теста в соответствии с математической моделью [5]. Время инкубирования составляло 96 ч. Параллельно исследовались контрольные клетки, не подвергавшиеся обработке кверцетином.

При использовании метода окрашивания клеток трипановым синим с последующим подсчетом их в камере Горяева наблюдалось понижение концентрации живых клеток и общей жизнеспособности клеток по сравнению с контролем после инкубирования с кверцетином в средней и высокой дозах. При низкой же дозе эти показатели, напротив, повышались.

Флуоресцентная микроскопия позволила определить долю живых, апоптотических и некротических клеток, различающихся по характеру окрашивания их ядер флуоресцентными красителями. На гистограмме (рис. 1) видно, что при средней и высокой дозах кверцетина доля живых клеток понижается по сравнению с контролем, а доля апоптотических – увеличивается, однако при низкой дозе кверцетина тенденция обратная.

При гель-электрофорезе ДНК, выделенной из контрольных клеток и из клеток после инкубирования с кверцетином, лишь в образце с концентрацией кверцетина IC_{90} выявлялись фрагменты, образующиеся в резуль-

тате межнуклеосомного нарезания ДНК, что свидетельствует о том, что апоптоз здесь происходит с достаточно высокой частотой.

Таким образом, был сделан вывод, что кверцетин оказывает на клетки линии K562 как проапоптотическое действие (главным образом при высокой концентрации), так и антипролиферативное. Низкая же доза кверцетина, напротив, способствует повышению выживаемости клеток, по-видимому, за счет своих антиоксидантных свойств.

Второй задачей было выявление взаимосвязи между структурой и противолейкозными свойствами кверцетина. Для этого с помощью МТТ теста мы определили цитотоксическое/цитостатическое действие еще ряда флавоноидов, незначительно отличающихся от кверцетина по своей структуре, и разбили их на группы сравнения. Общая структура флавоноидов представляет собой два ароматических кольца А и В, между которыми находится гетероцикл С.

В первой группе кверцетин, морин и кемпферол различаются по количеству и положению ОН групп в кольце В. Сравнивая активность этих флавоноидов (рис. 2), можно сделать вывод, что большей активности кверцетина (3) по сравнению с другими двумя флавоноидами (1 и 2) способствуют отсутствие ОН группы в С2' положении в отличие от морина и присутствие ОН группы в С3' положении, в отличие от морина и кемпферола.

Вторая группа, – кверцетин, рутин и лютеолин, позволяет определить влияние ОН группы при С3 атоме кверцетина на его свойства. Как видно из графика (рис. 3), отяжеление этой группы рутиннозой, как в рутине (2), резко снижает противолейкозные свойства молекул по сравнению с кверцетином (1), а элиминирование этой группы, как в лютеолине (3), напротив, приводит к повышению их активности.

Наконец, в третьей группе, – кверцетин, дигидрокверцетин и эпикатехин, оценивалось влияние еще двух особенностей строения кольца С флавоноидов на их противолейкозные свойства (рис. 4). Было выявлено, что важное значение для проявления сравнительно высокой цитотоксической/цитостатической активности кверцетина (1) имеют наличие у него двойной связи С2-С3, в отличие от дигидрокверцетина (2) и эпикатехина (3), у которых эта связь одинарная, а также кетогруппы в положении С4, которая отсутствует у эпикатехина.

Полученные нами результаты в целом хорошо согласуются с литературными источниками [4; 6; 7; 8]. В дальнейшем представленные данные могут быть использованы для поиска и дизайна более эффективных противолейкозных соединений из группы флавоноидов.

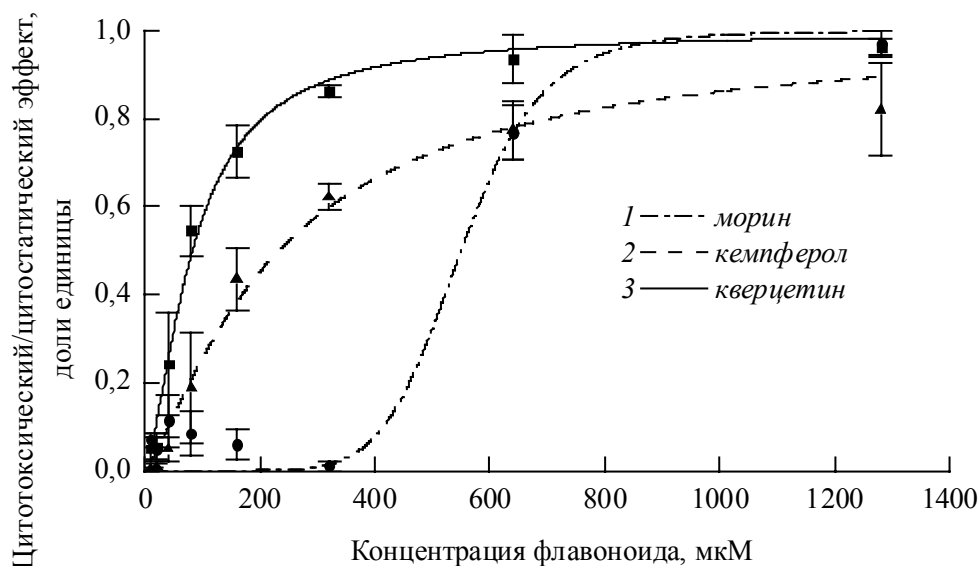


Рис. 2. Дозозависимый цитотоксический/цитостатический эффект кверцетина (3), морина (1) и кемпферола (2) на клетки линии K562

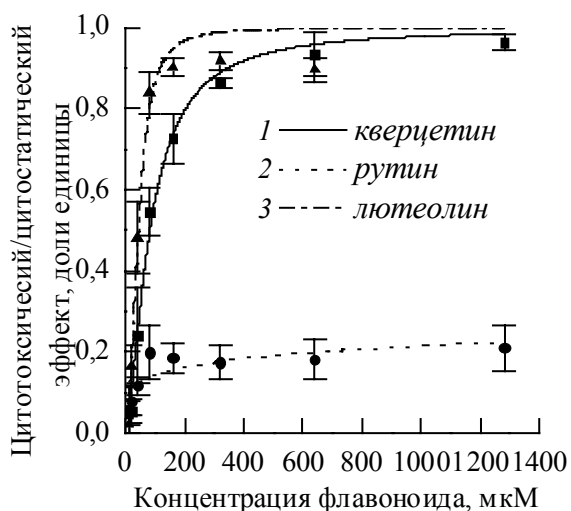


Рис. 3. Дозозависимый цитотоксический/цитостатический эффект кверцетина (1), рутина (2) и лютеолина (3) на клетки линии K562

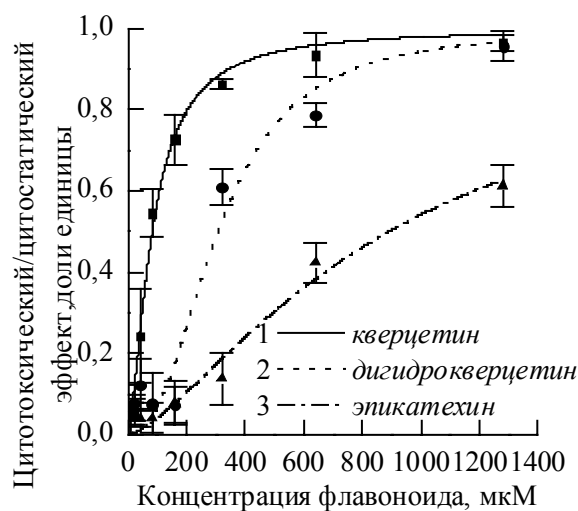


Рис. 4. Дозозависимый цитотоксический/цитостатический эффект кверцетина (1), эпикатехина (2) и дигидрокверцетина (3) на клетки линии K562

Литература

1. Абдулкадыров К. М., Бессмельцев С. С., Рукавицин О. А. Хронический миелолейкоз. Санкт-Петербург, 1998.
2. Kantarjian H., Melo J. V., Tura S. Chronic myelogenous leukemia: disease biology and current and future therapeutic strategies. // Hematology., 2000. V. 48. № 2. p. 90–109.
3. Ren W., Qiao Zh., Wang H. Flavonoids: promising anticancer agents. // Med Res Rev. 2003. V. 23. № 4. p. 519–534.

4. Middletoon E. J., Kandaswami Ch., Theoharides C. The effects of plant flavanoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. // *Pharm Rev.* 2000. V. 52. № 4. p. 673–751.
5. Khafif A., Schantz S. P., Chou T.-C. Quantitation of chemopreventive synergism between (–)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. // *Carcinogenesis.* 1998. V. 19. p. 419–424.
6. Agullo G., Gamet-Payraastre L., Manenti S. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. // *Biochem Pharmacol.* 1997. V. 53. № 11. p. 1649–1657.
7. Depeint F., Gee J. M., Williamson G., Johnson I. T. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. // *Proc Nut Soc.* 2002. V. 61. № 1. p. 1258–1267.
8. Rusak G., Gutzeit H. O., Ludwig-Muller J. Effects of structurally related flavonoids on hsp gene expression in human promyeloid leukaemia cells. // *Food Technol Biotechnol.* 2002. V. 40. № 4. p. 267–273.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЦИДОФИЦИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КОРНЕЙ ЯЧМЕНЯ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

Е. А. Скриган

Активная секреция протонов H^+ -АТФазами клеток корней (ацидофицирующая активность) – это фундаментальный процесс, важный для всех трансмембранных потоков в растении. Работа H^+ -помпы тесно связана с явлением солеустойчивости растений [1], однако ее активность в условиях стресса на разных этапах онтогенеза исследована недостаточно. На сегодняшний день отсутствуют единые подходы в выборе растений различного возраста для экспериментов по изучению ацидофицирующей активности корневой системы [2].

Настоящая работа посвящена выяснению особенностей функционирования H^+ -АТФазной помпы корневой системы ячменя в условиях хлоридно-натриевого засоления на начальных этапах онтогенеза.

В качестве объекта исследования в работе использовались 3 – 10 дневные этиолированные проростки ячменя (*Hordeum vulgare L.*) неустойчивого к засолению сорта «Бурштын».

Проростки выращивались в темноте при комнатной температуре методом полиэтиленовых рулонов на дистиллированной воде [3]. Исследование воздействия натриевого засоления на ацидофицирующую активность ризодермы разновозрастных проростков осуществлялось путем использования водного раствора NaCl (0,1 М), вызывающего у ячменя максимальное активирование H^+ -АТФазы [4].