

ТБК-акт. прод. реакции, $\times 10^{-7}M$

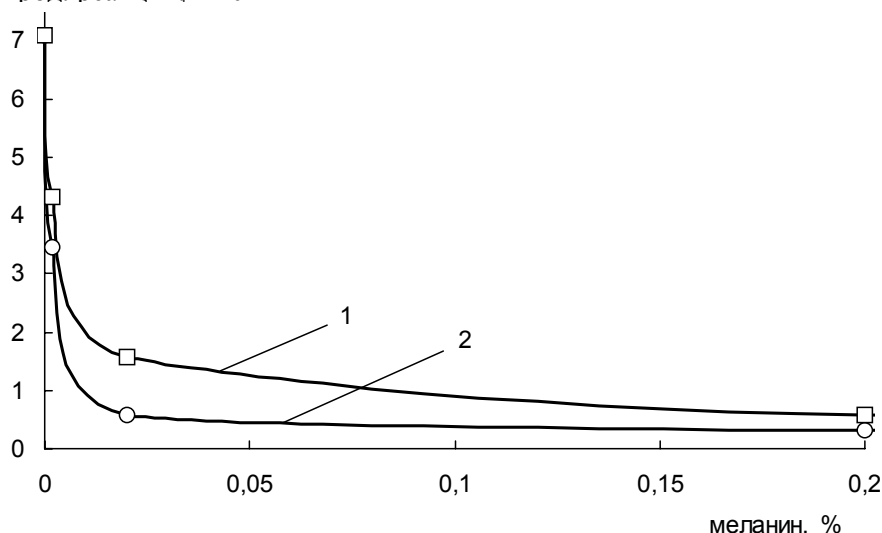


Рис. 1. Фотоэкранирующая активность меланина из винограда *Vitis vinifera* (сорт “Альфа”) (1) и меланина из черного грузинского чая *Thea sinensis* (2) при УФ-индуцированном ПОЛ. Время облучения лампой ДРК-125 – 20 мин.

Изучение фотоэкранирующей активности меланинов из винограда и чая показало, что оба исследуемых объекта интенсивно поглощают излучение во всех диапазонах УФ и видимой области спектра. Увеличение степени защитного эффекта указанных веществ коррелирует с концентрацией парамагнитных центров в меланинах. Активно поглощая УФ-излучение, данные пигменты значительно снижают количество повреждений молекул плазмидной ДНК рBR-322, вызываемых УФ-излучением и препятствуют образованию малонового диальдегида при экранировании УФ-индуцированного перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот.

Литература

1. McElroy M.B., Salawitch R.J. Scavenger effect of vitamin E and derivatives on free radicals generated by photoirradiated pheomelanin // Science.— 1989.— V.43.— P.763–770.
2. Moan J., Dahlback A. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus // Br. J. Cancer.— 1992.— V.65.— P.916–921.
3. Allen J.M. J. The interaction of melanin: effect on radiative and nonradiative transitions // Photochem. Phobiol.— 1996.— V.32.— P.33–38.
4. Каталог “Merck”. Реактивы, диагностика, химикаты. — М., 1992/1993.— С. 1438.
5. Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells / H. Kobayashi, T. Muramatsu, Y. Yamashina et al. // J. Invest. Dermatol.— 1993.— V.101, №5.— P.685–689.

ВЛИЯНИЕ МЕЛАНИНОВЫХ ПИГМЕНТОВ НА СТЕПЕНЬ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК АРОМАТИЧЕСКИМИ АМИНАМИ

Д.А. Новиков, М.Н. Новик

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
dm-novikov@mail.ru

В результате антропогенного загрязнения окружающей среды происходит рост злокачественных новообразований, около 80 % которых связывают с действием химических веществ [1]. Попадая в организм, большинство генотоксичных ксенобиотиков претерпевают

метаболические превращения, ведущие к образованию радикальных электрофильных продуктов реакции, способных вызывать различные повреждения ДНК. Эти повреждения являются мерой генотоксичности активных химических соединений. Вещества, способные связывать радикальные продукты окисленных ксенобиотиков, выступают в качестве генопротекторов. Среди природных фенольных соединений особое место занимают меланины – конденсированные полифенольные соединения, обладающие свойствами стабильных свободных радикалов и проявляющие антиоксидантные свойства [2, 3]. У растений они содержатся в кожуре ягод темных сортов винограда, в плодах бобовых и других органах [4]. Расширение возможностей использования растительных меланинов из в качестве фармакологического средства может быть связано с изучением его генопротекторных свойств, что и явилось целью нашего исследования.

Пероксидазное окисление проводили по ранее описанному методу [5]. Спектральный анализ проводили на СФ-26 (“ЛОМО”, Россия) и “Specord”М-40 (“Carl Zeiss”, ГДР). Для детекции повреждений ДНК фага λ (НПО “Фермент”, Вильнюс), вызванных пероксидазными оксидантами БД, применяли метод горизонтального электрофореза в 0,9 % агарозном геле [6]. Антимутагенное действие исследуемых веществ проводили на микробных тест-системах по методу Эймса [7]. В качестве модельного мутагена был использован бензидин (БД), являющийся известным производственным канцерогеном для человека и используемый в производстве азокрасителей, резинотехнической промышленности, производстве клеев и пластмасс.

Меланин выделяли из семенных оболочек гречихи способом, предусматривающим высвобождение меланопротеинового комплекса, что резко повышает его биологическую активность [8]. Антимутагенные свойства МВ были подтверждены и в тесте Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* TA-100, у которого под действием мутагенов возникают ревертанты в результате замены пар оснований и *Salmonella typhimurium* TA-98, у которого мутагены вызывают повреждения ДНК типа сдвига рамки считывания генетического кода [9]. Нами изучены генопротекторные свойства меланина из гречихи в процессе пероксидазного пути метаболической активации БД пероксидазой из хрена и другими гемопротеинами. Как показали результаты исследований, МВ эффективно снижает спонтанное появление ревертантов без мутагена. Пероксидазные оксиданты БД вызвали рост his^+ -ревертантов до 300 на чашку у штамма S.t. TA-100 и до 460 у S.t. TA-98 при концентрации [БД]= 10^{-5} М. Возрастающие концентрации меланина значительно снижали количество мутантных колоний, вызванных действием БД у обоих штаммов. Анализируя особенности антимутагенного действия меланина на бактерии штаммов S.t. TA-100 и S.t. TA-98 (Рис. 1. А, В) можно сказать, что МВ в большей степени предотвращает мутации у штамма S.t. TA-100, защищая тем самым ДНК от замены пар оснований и в меньшей степени от мутаций типа сдвига рамки считывания генетического кода (штамм S.t. TA-98).

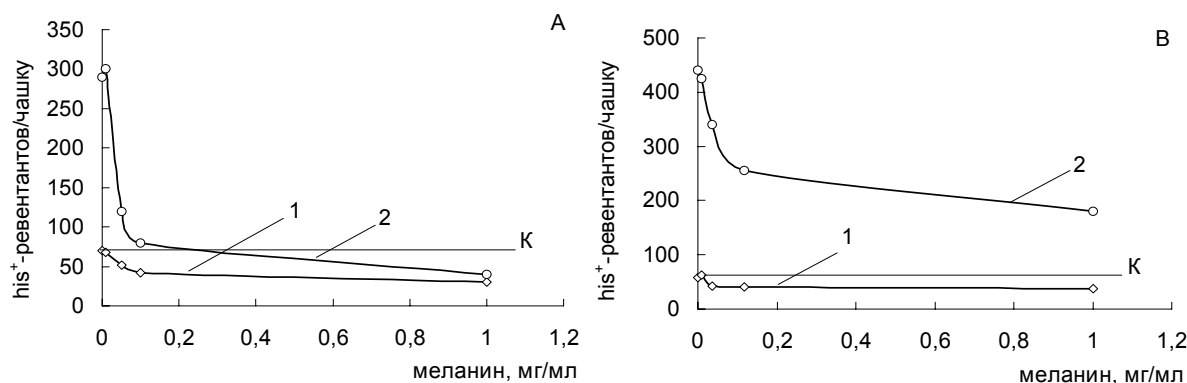


Рис. 1. Антимутагенное действие меланина (1), меланина и бензидаина [10^{-5} М] (2) на бактерии штамма *Salmonella typhimurium* TA-100 (А) и *Salmonella typhimurium* TA-98 (В). К – спонтанный уровень мутаций.

Механизм возникновения таких мутаций у бактерий S.t. TA-100 и S.t. TA-98 может быть связан с повреждением ДНК электрофильными продуктами пероксидазного окисления БД, основное количество которых приходится на диимины, представляющие собой бифункциональные реагенты, потенциально способные вызывать межнитевые сшивки ДНК и перекрестные сшивки ДНК-ДНК. В связи с этим в условиях *in vitro* проведено исследование электрофоретической подвижности ДНК фага λ присутствовавшей в реакции окисления БД (рис. 2. А, В).

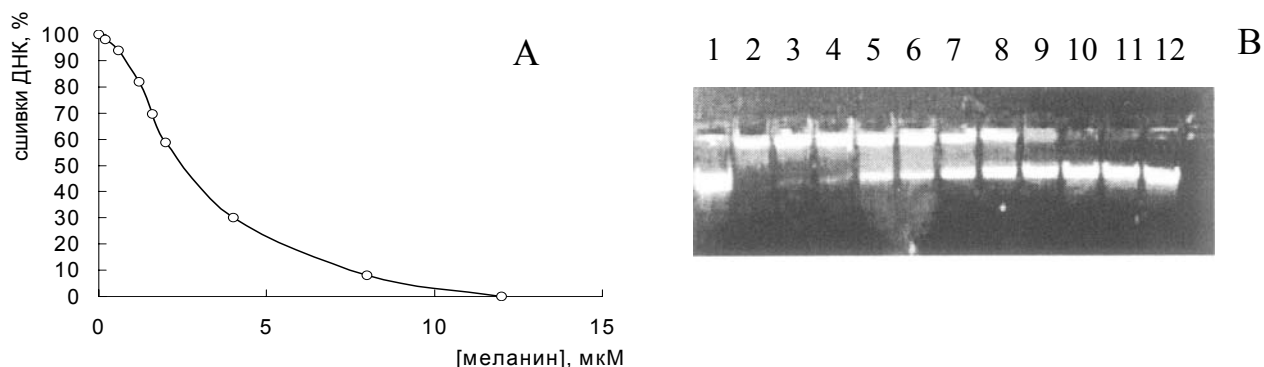


Рис. 2. А – влияние меланина на процесс образования сшивок ДНК при пероксидажном окислении бензидина; В – накопления агрегированной БД ДНК на старте в зависимости от концентрации МВ.

Условия: 0,1М цитратно-ацетатном буфер (pH 5,5), 30 °С, 5 мин, ПХ – $1,25 \times 10^{-9}$ М, БД – 5×10^{-5} М, H_2O_2 – 10^{-3} М, МВ – 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), 20,0 мкМ (12).

Установлено, что ДНК в результате действия пероксидантных окислителей БД перекрестно сшивается и накапливается в геле на старте (рис.2.В, дор.2). 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 и восстановлению ее электрофоретической подвижности. Генопротекторное действие меланина связано с его антиоксидантными свойствами и способностью эффективно ингибировать процесс метаболической активации БД. При возрастающих концентрациях ингибитора (меланина) есть период индукции. Согласно теории метода ингибиторов [2] для радикальных цепных 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 гречихи ингибирует процесс окисления БД в концентрациях 0,01–2,0 мкМ. При низких концентрациях ингибитора (0,15–0,7 мкМ) коэффициент $f \approx 2$, что характерно для многих фенольных антиоксидантов. При концентрациях меланина от 1 до 3 мкМ $f \approx 14$ –18. Полученная величина подтверждает высокую эффективность полимерного антиоксиданта в процессе пероксидазного окисления БД.

Таким образом, меланин, являясь высокоактивным антиоксидантом, предотвращает образование перекрестных сшивок ДНК-ДНК, образование мутаций типа сдвига рамки считывания и замены пар оснований у микроорганизмов в тесте Эймса.

Литература

1. Канцерогенные вещества. Справочник // Материалы международного агентства по изучению рака. / Под ред. Турусова В.С. – М.: Медицина, 1987. – 273с.
2. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М.: Наука, 1965. – 315с.
3. Щерба В.В., Бабицкая В.Г., Инонникова Н.В., Кукулянская Т.А., Курченко В.П. Антиоксидантные свойства меланиновых пигментов грибного происхождения // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т.36, №5. – С.569–574.

4. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 436с.
5. Савенкова М.И., Курченко В.П., Метелица Д.И. Оптимизация окисления ароматических аминов пероксидазой хрена, модифицированной строфанцином К // Биохимия. – 1984. – Т.49, №7. – С.1147–1152.
6. Уильямс Б., Уилсон К. Методы практической биохимии. – М.: Мир, 1978 – 328с.
7. Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1973. – V.70, №3. – P.782–786.
8. Avramidis N., Kourounakis A., Hadjipetrou L., Senchuk V. // Arzneimittelforschung. – 1998. – V.48, №7. – P.764–771.
9. Абилов С.К., Пороменко Т.Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластоогенных свойств химических соединений. // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Токсикология, 1986. – Т.14. – С.29–32.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МОНОФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИНДУКТОРА *tert*-БУТИЛГИДРОКИНОНА НА МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ХИНОНОВЫХ КСЕНОБИОТИКОВ

С.Э. Огурцова

НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь

Среди загрязнителей биосферы, ухудшающих экологическую обстановку и угрожающих биологическому разнообразию природы и здоровью населения, важнейшее место занимают химические агенты, которые рассматриваются по отношению к организму как чужеродные вещества (ксенобиотики). Ксенобиотики угрожают биологическому разнообразию природы, так как способны повреждать ДНК. Несмотря на то, что в ходе эволюции сформировались ферментные системы, направленные на обезвреживание и выведение ксенобиотиков из организма, на некоторых этапах метаболизма ксенобиотиков могут возникать более токсичные, мутагенные и канцерогенные соединения по отношению к исходным [1]. Энзиматические реакции, вовлеченные в процессы метаболической активации ксенобиотиков, поддаются изменению под действием различных химических соединений (индукторов, ингибиторов), которые способны изменять активность ферментов, вовлеченных в эти процессы [2, 3]. Целенаправленная модификация уровня ферментов способствует изменению профиля мутагенных метаболитов. Это в свою очередь находит выражение в усилении или снижении канцерогенного, токсического и мутагенного действия ксенобиотиков. Поэтому представляет интерес оценка влияния монофункционального индуктора *tert*-бутилгидрохинона на мутагенное действие некоторых хиноновых ксенобиотиков.

Работа выполнена на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6j с массой тела 20–25 г. В качестве промутагенов использовали противоопухолевые препараты митомицин С (ММС) и диазиквон (AZQ). Все исследуемые вещества относятся к хинонам. В качестве индуктора ферментов, использовали *tert*-бутилгидрохинон (*tert*-BHQ). *tert*-BHQ является антиоксидантом и самым эффективным монофункциональным индуктором ферментов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков [4]. Индуктор растворяли в кукурузном масле и вводили перорально в течение 5 дней в дозе 220 мг/кг веса, так как в эти сроки достигается максимальный уровень ферментов детоксикации ксенобиотиков второй фазы. Промутагены растворяли в изотоническом растворе. Исследуемая доза митомицина С – 2,5 мг/кг; AZQ – 1,0 мг/кг. Промутагены вводили внутрибрюшинно через сутки после последней инъекции индуктора. Исследование кластогенного эффекта промутагенов проводили в костном мозге мышей. В качестве теста на мутагенность в клетках костного мозга использовали учет аберраций хромосом на стадии метафазы. Цитогенетические препараты костного мозга готовили по общепринятой методике [5] с предварительным введением колхицина, гипотонической обработкой KCl (0,56 %) и фиксацией в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1). Для анализа полученных данных применялся пакет статистических программ Microsoft Excel (средняя арифметическая, ошибка средней арифметической, *t*-критерий Стьюдента).