

СТЕРОИДЫ РАСТЕНИЙ КАК ЭФФЕКТОРЫ МОНООКСИГЕНАЗНЫХ СИСТЕМ МЛЕКОПИТАЮЩИХ PHYTOSTEROIDS AS EFFECTORS OF MAMMALIAN MONOOXYGENASE SYSTEMS

А. Г. Сыса¹, С. А. Самсонов²

A. Sysa¹, S. Samsonov²

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

²Гданьский университет, г. Гданьск, Республика Польша
aliaksei.sysa@iseu.by

¹Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

²University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

Браassinостероиды (БС) относятся к группе растительных гормонов, сходных с таковыми животных и человека как по своей структуре, так и по выполняемым функциям. Известно, что браassinостероиды в первую очередь ингибируют ферментные системы, участвующие в метаболической активации проканцерогенных веществ, а степень их влияния существенным образом зависит от структуры фитостероидов. Целью работы было использование подходов, основанных на молекулярной динамике, для моделирования взаимодействий БС-СYP450 с целью раскрытия молекулярных механизмов этих биологически значимых эффектов. Установлено, что CYP1A1 и CYP1B1 связывают все лиганды сильнее, чем контрольный ингибитор, взаимодействие с которым значительно более гидрофобно, чем с браassinостероидами. В тоже время, для CYP3A4 с браassinостероидами значения энергии связи не отличаются от контроля.

Brassinosteroids (BS) belong to the group of plant hormones similar to animals and humans steroids. Experimental data showed that brassinosteroids primarily inhibit the enzyme systems participating in the metabolic activation of procarcinogenic substances, and the degree of their influence essentially depends on the structure of the phytosterols. The aim of the work was to employ molecular dynamics-based approaches to model BS-CYP450 interactions in order to unveil the atomistic details of this biologically relevant molecular system. CYP1A1 and CYP1B1 bind all ligands stronger than the control inhibitor, the interaction with which is significantly more hydrophobic than with brassinosteroids. At the same time, for CYP3A4 with brassinosteroids, the binding energy values are very similar to the control.

Ключевые слова: браassinостероиды, фитогормоны, цитохром P450, канцерогенез, молекулярная динамика, энергия связи.

Keywords: brassinosteroids, phytohormones, cytochrome P450, cancerogenesis, molecular dynamics, bond energy.

Браassinостероиды (БС) относятся к группе растительных гормонов, аналогичных гормонам животных и человека как по структуре, так и по функциям: регулируют экспрессию генов в растениях, влияют на ход обменных процессов, рост и дифференцировку клеток [1].

В предыдущих работах показано влияние браassinостероидов на монооксигеназные процессы, приводящие к активации проканцерогенов у человека и животных на субклеточном и клеточном уровнях [2; 3].

Предполагается, что механизмы действия БС связаны с блокадой клеточного цикла путем изменения уровня экспрессии циклинзависимых протеинкиназ, что приводит к апоптозу [4]. Но наши результаты показали возможность как прямого, так и косвенного ингибирующего воздействия браassinостероидов на ферментативные процессы изоферментов цитохрома P450 (СYP450). Установлено, что браassinостероиды в первую очередь ингибируют ферментные системы, участвующие в метаболической активации проканцерогенных веществ, и степень их влияния существенно зависит от структуры исследуемых фитостероидов [5].

Целью работы было моделирование межмолекулярных взаимодействий БС-СYP450 с использованием молекулярно-динамических подходов. Охарактеризованы динамические и энергетические свойства трех видов комплексов БС-СYP450 для подтверждения и дополнения имеющихся экспериментальных данных.

Параметры взаимодействий для оценки внутримолекулярных взаимодействий браassinостероидов определяли с помощью разработанного для методов молекулярной динамики набора GAFF (General Amber Force Field) с использованием модели заряда AM1-BCC, которая основана на стандартной процедуре расчета заряда, совместимой с другими силовыми полями в пакете MD AMBER16. Структуры CYP1A1, CYP1B1 и CYP3A4 были построены на основе структур из белкового банка данных PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

Структура изученных стероидных соединений показана на рис. Как видно из данных, представленных на рис., соединения имели одинаковую структуру всех четырех колец, но отличались структурой и конфигурацией боковой цепи. Например, природный браassinостероид 24-эпибраassinолид содержал метильную группу 24R, тог-

да как 28-гомобрассинолид содержал этильный заместитель 24S в этом положении. Характерной особенностью синтетических производных обоих соединений была SS-конфигурация атомов углерода в положениях C22 и C23 боковой цепи, содержащих OH-группы.

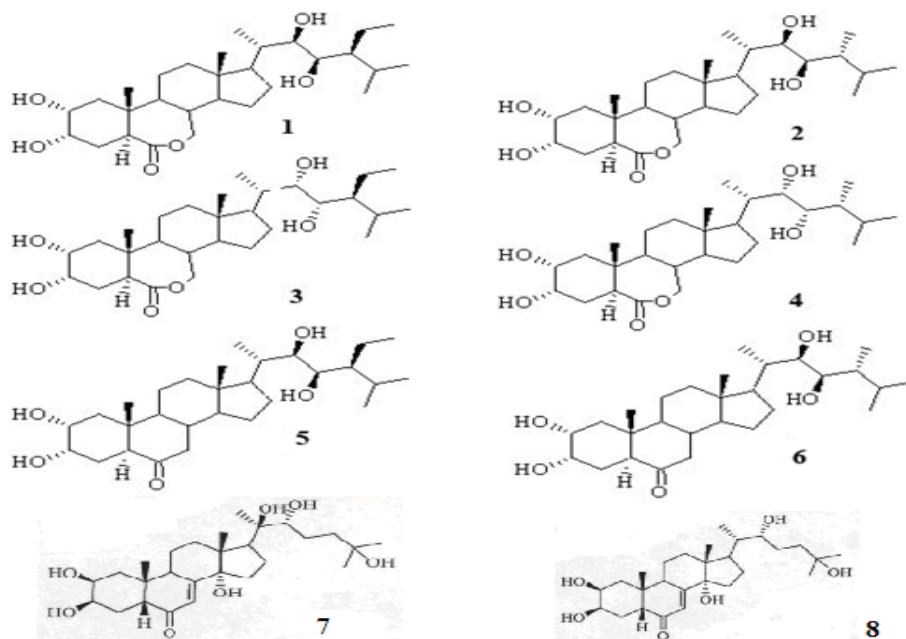


Рисунок – Структура брассиностероидов, исследованных в работе: 1 – 28-гомобрассинолид, 2 – 24-эпибрассинолид, 3 – (22S,23S)-28-гомобрассинолид, 4 – (22S,23S)-24-эпибрассинолид, 5 – 28-гомокастастерон, 6 – 24-эпикастастерон

Некоторые результаты наших предыдущих биохимических экспериментов [2; 3; 5] представлены в таблице.

Таблица – Сравнительный анализ влияния брассиностероидов на монооксигеназную активность и пролиферацию клеток (% контроля)

Брассиностероиды (концентрация 100 мкМ)	1	2	3	4*
28-гомобрассинолид	100±2	98±1	75±10	91±5
24-эпибрассинолид	90±3	80±1	98±2	87±3
28-гомокастастерон	80±1	75±5	86±3	108±5
24-эпикастастерон	55±5	75±5	80±8	107±3
(22S,23S)-28-гомобрассинолид	40±9	80±7	29±13	115±7
(22S,23S)-24-эпибрассинолид	60±1	90±8	60±9	98±1

Примечание: * Концентрация БС = 50 мкМ; 1 – Влияние брассиностероидов на скорость окисления 7-этоксикумарина микросомальной фракции печени интактных крыс; 2 – влияние брассиностероидов на скорость окисления бенз[а]пирена микросомальной фракцией печени крыс, предварительно индуцированных 20-метилхолантреном; 3 – влияние брассиностероидов на скорость окисления 7-этоксирезорифина микросомальной фракцией печени крыс, предварительно индуцированных 20-метилхолантреном; 4 – влияние брассиностероидов на скорость окисления 7-этоксирезорифина монооксигеназной системой клеточной линии MCF-7 после воздействия тетрахлордibenzo-p-диоксина (ТХДД).

В Институте биоорганической химии НАН Беларуси в цикле работ [2; 3; 5] произведена оценка возможности воздействия БС на монооксигеназные процессы, которые могут приводить к инициации канцерогенеза. В качестве модельных объектов использовали монооксигеназные ферментные системы микросом клеток печени крыс, микросомальную систему гормон-чувствительной опухолевой клеточной линии MCF-7. Для повышения в составе микросомальной фракции клеток печени крыс изоэнзимов цитохрома P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), обладающих повышенной активностью в отношении полиароматических соединений и способных превращать последние в мощные канцерогены, животным предварительно вводили 20-метилхолантрен, являющийся индуктором перечисленных выше изоэнзимов цитохрома P450.

Для более точного вычленения изоэнзимов цитохрома P450, максимально чувствительных к действию брассиностероидов использовали несколько субстратов – 7-этоксикумарин, 7-этоксирезорифин и бенз[а]пирен.

Первый из них применяется для характеристики лекарственно-метаболизирующей функции печени и, в первую очередь, отражает каталитическую активность таких изоэнзимов в организме человека, как CYP3A4, CYP2E1 и CYP2D6. По отношению ко второму высокой каталитической активностью обладают все индуцируемые 20-метилхолантреном изоформы цитохрома P450. Третий служил для оценки детоксицирующей функции монооксигеназной системы с помощью, так называемого, Ahh-теста. В этом случае регистрируется скорость пре-

вращения бенз[а]пирена в его гидроксипроизводные, которые после конъюгации выводятся из клетки. Очевидно, что ингибирование этого процесса является нежелательным для нормального функционирования организма.

Основой для получения сведений о принципиальной роли состава и конфигурации боковой цепи БС в регулировании монооксигеназной активности стали природные соединения (24-эпи- и 28-гомобрассинолид и 24-эпи- и 28-гомочагастерон) и два синтетических аналога брассиностероидов (22S,23S-дигидрокси-стереоизомеры).

В ряду 6-оксо-7-оксапроизводных изменение типа и конфигурации заместителя в положении С24 (этильная группа вместо метильной в 28-гомобрассинолиде в отличие от 24-эпибрассинолида) сказалось лишь в реакции с 7-этоксирезорурфином. Однако эффект был выражен слабо и не удалось достигнуть двукратного снижения скорости процесса даже при повышении концентрации 28-гомобрассинолида в реакционной среде до 250 мкМ. В то же время к ярко выраженному ингибиторному эффекту приводило изменение конфигурации атомов углерода С-22 и С-23, содержащих диольные группы, с RR на SS в боковой цепи брассинолидов.

В реакции с 7-этоксикумарином ингибирующий эффект 22S,23S-гидроксипроизводных был выражен слабее, что может быть отражением того, что влияние исследованных соединений сказывается лишь на монооксигеназной активности изоэнзимов цитохрома P450, индуцируемых 20-метилхолантроном, и не затрагивает или мало затрагивает процессы, катализируемые другими типами монооксигеназ, в т.ч. играющих важную роль в метаболизме лекарственных веществ.

Особо следует подчеркнуть, что использованные в работе брассиностероиды не оказывали существенного влияния и на такую важную функцию монооксигеназной системы, как гидрокселирование бенз[а]пирена, что необходимо для его вывода из организма.

В экспериментах по оценке влияния БС на реакцию окислительного dealкилирования 7-этоксирезорурфина монооксигеназной системой опухолевой клеточной линии MCF-7, использованной в виде лизата, для 24-эпибрассинолида и 28-гомобрассинолида показан ингибиторный эффект при их 50 мкМ концентрации.

Следующим этапом нашей работы стал молекулярный докинг взаимодействий изоэнзимов, ответственных за детоксикацию либо проканцерогенную биоактивацию (СYP1A1, 1B1, 3A4), и лигандов (БС). Проанализированы результаты для полученных 18 систем, отобраны репрезентативные структуры комплексов на основе кластеризации и ранжирования по баллам результатов молекулярного докинга. Для СYP1A1 и СYP1B1 для всех пар БС-СYP450 были найдены две аналогичные связывающие позы. Для СYP3A4 кроме них существует еще один способ связывания, не наблюдаемый для других исследованных изоэнзимов цитохромов. Для дальнейшего молекулярно-динамического анализа было отобрано 43 различные сложные структуры.

Молекулярная динамика (МД) подтвердила устойчивость всех комплексов, предсказанную докингом. На основе анализа траекторий, полученных в МД, рассчитана суммарная энергия взаимодействия для 43 структур, энергетические вклады ван-дер-Ваальсовых (в воздухе) и электростатических взаимодействий, а также индивидуальные вклады атомных орбиталей в связывании потенциальных ингибиторов. Для контроля те же расчеты выполнены для экспериментальных комплексов с ингибиторами в белковом банке данных PDB: СYP1A1 и СYP1B1 с альфа-нафтафлавоном и СYP3A4 с S- $\{(2S)-2-[(1-терт-бутоксизетил)амино]-3-фенилпропил\}$ -N2-циклопентил-N- $\{(пиридин-3-ил)метил\}$ -L-цистеинамид (рационально разработанный ингибитор).

Показано, что лиганд-связывающие свойства для СYP1A1 и СYP1B1 в целом сильнее, чем для СYP3A4. Это связано прежде всего с вкладом ван-дер-Ваальсовых сил. В то же время, для СYP1A1 и СYP3A4 вклад электростатических сил больше, чем для СYP1B1.

СYP1A1 и СYP1B1 связывают все лиганды сильнее, чем соответствующий контрольный ингибитор, взаимодействие с которым значительно более гидрофобно, чем с брассиностероидами. В то же время, в случае связывания СYP3A4 с брассиностероидами, значения энергии связывания были сходны с таковыми модельного ингибитора.

МД подтвердила, что брассиностероиды более эффективно связываются с ферментами, участвующими в метаболической активации проканцерогенных веществ (СYP1A1 и СYP1B1) и не влияют или мало влияют на процессы, катализируемые другими изоэнзимами монооксигеназ, в том числе играющими важную роль в метаболизме лекарственных веществ.

Полученные результаты способствуют лучшему пониманию молекулярных механизмов влияния БС на биохимические процессы у млекопитающих и могут служить основой для целенаправленного поиска и создания новых поколений противоопухолевых препаратов.

Брассиностероиды могут быть эффективными ингибиторами СYP450. Полученные данные свидетельствуют о том, что брассиностероиды могут реализовать свой противоопухолевый потенциал как за счет ингибирования экспрессии некоторых изоферментов цитохрома P450 при активации проканцерогенных веществ, так и путем прямого влияния на ферментативную реакцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ullah, A. Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy / A. Ullah [et al.] // Environ Sci Pollut Res. 2018. – Vol. 25. – P. 1–16.
2. Sysa, A. G. Effect of the Structure of the Brassinosteroid Side Chain on Monooxygenase Activity of Liver Microsomes / A. G. Sysa, P. A. Kisselev, V. N. Zhabinskii, V. A. Khripach // Applied Biochemistry and Microbiology. 2010. – Vol. 46. – № 1. – P. 23–27.

3. *Kisselev, P. A.* Flow-cytometric analysis of reactive oxygen species in cancer cells under treatment with brassinosteroids / P. A. Kisselev [et al.] // *Steroids*. 2017. – Vol. 117. – P. 11–15.
4. *Coskun, D.* Epibrassinolide alters PI3K/MAPK signaling axis via activating Foxo3a-induced mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer cells / D. Coskun [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2017. – Vol. 338. – P. 10–21.
5. *Сыса, А. Г.* Брассиностероиды как эффекторы монооксигеназных систем млекопитающих / А. Г. Сыса, П. А. Киселев. Saarbrücken : LAP LAMBERT Academic Publishing, 2015. – 104 с.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОГРАММНО-АППАРАТНОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА У СОТРУДНИКОВ ФИНАНСОВОГО СЕКТОРА

USAGE OF THE SOFTWARE-APPARATIVE TECHNIQUE TO DETERMINE THE FUNCTIONAL STATE OF THE ORGANISM IN THE FINANCIAL SECTOR EMPLOYEES

***С. И. Сычик, Е. С. Щербинская,
S. Sychik, L. Shcherbinskaya***

*Научно-практический центр гигиены, г. Минск, Республика Беларусь
prof@rspch.by
Scientific practical centre of hygiene, Minsk, Republic of Belarus*

Базисом для экстраполяции нарушений профессионального здоровья, как и здоровья в целом, лежат положения теории адаптации. Снижение адаптации организма под воздействием факторов риска профессиональной среды, нарушение гомеостаза может рассматриваться как патофизиологическая основа большинства болезней. Обеспечивая оценку адаптационных резервов организма, можно не только спрогнозировать предполагаемые изменения состояния здоровья, но и планировать осуществление персонализированной профилактики развития болезней.

The basis for the extrapolation of occupational health disorders, as well as health in general, are the provisions of the theory of adaptation. Reducing the adaptation of the organism under the influence of risk factors of the professional environment, a violation of homeostasis can be considered as the pathophysiological basis of most diseases. Providing an assessment of the adaptation reserves of the body, it is possible not only to predict the expected changes in health status, but also to plan the implementation of personalized prevention of disease development.

Ключевые слова: адаптация, функциональное состояние организма.

Keywords: adaptation, functional state of the organism.

Безопасность поведения человека определяется в первую очередь «целевым уровнем риска», то есть уровнем риска, который работники допускают, переносят предпочитают, желают иметь и выбирают [1]. Целевой уровень риска зависит от предполагаемой выгоды и недостатков, связанных с влиянием неблагоприятных факторов, подвергающий опасности жизнь и здоровье работника. В фазе утомления физиологически происходит снижение активности поведения и бодрствования. Непроизвольно снижается любой вид трудоспособности: сенсорный, интеллектуальный, мышечный, тем самым ухудшается качество и падает интенсивность умственных и физических усилий. Экономия резервов организма в первую очередь производится за счет не выполнения действий, обеспечивающих безопасность работы и качество проделанной работы, что способствует увеличению количеству ошибок и снижению степени осторожности поведения [2; 3].

С ростом стоимости рабочей силы, затрат на подготовку квалифицированных специалистов, страховые выплаты работодателем, оценка уровня здоровья человека приобретает экономический эквивалент. Если специальность характеризуется высокой степенью ответственности, то последствие решений, связанных с утомлением, может «стоять» огромных финансовых потерь и даже привести к трагическому исходу [4]. Высокая ответственность, связанная с выполнением должностных обязанностей, авральные ситуации, связанные с выполнением экстренных работ приводят к высокому уровню стресса у работников.

С точки зрения Международной организации труда стресс – это болезненная физическая и эмоциональная реакция, вызванная нарушением равновесия между осознаваемыми требованиями и имеющимися ресурсами, и способностями людей удовлетворять этим требованиям. Стресс зависит от организации труда, трудовых отношений и механизмов взаимодействия. Он возникает в том случае, если требования к работнику не соответствуют или превосходят его возможности, ресурсы или потребности, или если знания или способности работника (группы работников) не удовлетворяют ожиданиям, предъявляемым культурой предприятия.