



Регуляция активности систем ацетилирования в процессах канцерогенеза: от фенотипа к эпигенетике

В.Н. Каркищенко¹, М.С. Дуля¹, Д.В. Хвостов¹, Н.В. Петрова¹,
Г.И. Пронина^{1,2}, Н.Ю. Корягина², А.О. Ревякин¹

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Московская область

² – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбководства, Московская область

Контактная информация: д.м.н. Каркищенко Владислав Николаевич, scbmt@yandex.ru

Изучена роль процессов ацетилирования в фенотипических и эпигенетических механизмах экспрессии генов, не влияющих на исходную последовательность, при действии проканцерогенов и антибластомных средств.

На основе полученных данных *in vitro* эксперимента по ферментативной активности, экспрессии гена *NAT2^{hot}* и эпигенетического фактора действия установлено эффективное ингибирующее действие производных бисфенила (нитрозобисфенила и диацетоксибисфенила), а также цисплатина по ферменту N-ацетилтрансферазы NAT2 человека. Для выбранных ингибиторов изучена концентрационная зависимость ферментативной активности и определено значение концентрации полумаксимального ингибирования IC₅₀. Создана новая модель *in vitro* оценки ацетилирующей способности, а также определения кинетических параметров ацетилирования субстратов, активаторов и ингибиторов NAT. Модель предлагается для скрининга веществ, влияющих на процесс ацетилирования. С её помощью, а также на моделях трансгенных мышей, несущих *NAT2*-ген человека и аксолотлей, установлен характер взаимодействия в системе «ингибитор – активность фермента», «ингибитор – экспрессия гена» и предсказан уровень токсических эффектов ингибиторов NAT на ферментативном, генетическом и эпигенетическом уровнях.

Экспериментально на примере молекул-токсикантов представлена модель изучения эпигенетических факторов воздействия производных бисфенила и цисплатина в регуляции эпигенетических программ нарушения регенерации удаленных конечностей аксолотлей, выражающихся в замедлении роста и изменениях в формировании пальцев. Наблюдается замедление эритропоэза и усиление лейкопоэза. Цисплатин и производные бисфенила вызывают увеличение доли эозинофилов и содержания лизосомального катионного белка в нейтрофилах и значительное увеличение процента моноцитов, что в целом подтверждает развитие онкологических процессов любой локализации.

Ключевые слова: N-ацетилтрансфераза (NAT), трансгенные гуманизированные мыши по гену *NAT2* и *NAT1* человека, экспрессия гена *NAT2*, эпигенетика, ацетилирование, канцерогенез, ингибиторы NAT, аксолотли, регенерация, эритропоэз, лейкоцитарная формула.

Введение

Химические канцерогены ответственны за возникновение до 90% всех злокачественных опухолей человека. Канцерогенез в настоящее время большинством исследователей рассматривается как многостадийный эпигенетический процесс, в котором следует различать 3 главные стадии: инициацию, промоцию и прогрессию. Принято считать, что существуют 2 типа воздействующих агентов, различающихся по механизмам своего действия, – инициаторы и промоторы [1].

Эпигенетические модификации обеспечивают контроль существования и развития дифференцированных клеток организма. Под влиянием ксенобиотиков и токсикантов нарушается процесс нормального регулирования развития клеток, которые малигнизируются и превращаются в недифференцированные и, на крайней стадии, раковые клетки. Существующие противоопухолевые препараты направляют свое действие на подавление неправильных эпигенетических программ.

Большинство выраженных канцерогенов метаболизируются с участием ферментов I и II фазы биотрансформации и обладают как иницирующими, так и промоторными свойствами [2, 3, 22]. Многие промоторы проявляют канцерогенную активность, если их применять в высоких дозах и достаточно долго. К соединениям, канцерогенное действие которых обусловлено наличием в структуре аминогруппы, относится широкий ряд химических веществ: ароматические амины, аминоказосоединения, нитроарены. Многие противоопухолевые препараты, включая цисплатин и его аналоги, вмешиваются в процессы ацетилирования на всех уровнях регуляции (активности ферментов, экспрессии генов и эпигенетическом) и являются ингибиторами N-ацетилтрансфераз.

Цисплатин и его аналоги (рис. 1) – широко используемая в клинической практике группа противоопухолевых фармакологических средств [23].

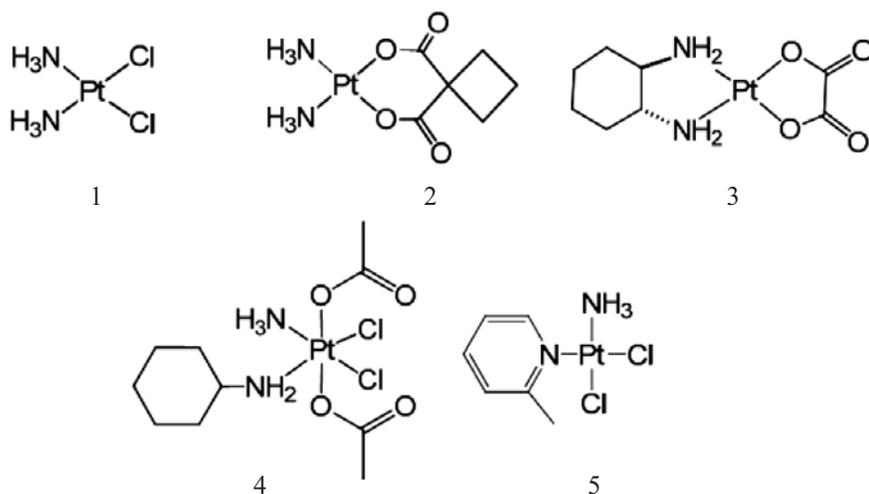


Рис. 1. Цисплатин (1) и его производные: карбоплатин (2), оксалиплатин (3), сатраплатин JM216 (4), пикоплатин (5).

Их действие основано на повреждении ДНК, индуцированных им функциональных нарушениях, в конечном итоге приводящих к апоптозу.

Успешное применение цисплатина в клинике, с одной стороны, и высокая токсичность соединений платиновой группы, с другой стороны, послужили основой для развития ряда работ, посвященных разработке платиновых комплексов и исследованию их противоопухолевых свойств.

К настоящему времени синтезированы тысячи платиновых комплексов различной структуры, но из них только пять соединений внедрены в клиническую практику. Несколько соединений проходят клинические испытания, в т.ч. первый платиновый комплекс перорального применения – JM216 (сатраплатин) [23].

Ранее в работе [19] установлено проонкогенное действие бисфенила и, особенно, его хлорированных производных. Полихлорированные бисфенилы (ПХБ) относятся к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ), мониторинг которых в воздухе, воде и

почве является обязательным вследствие их высокой токсичности для окружающей среды и здоровья человека. Доказано многогранное повреждающее действие этих веществ на ряд органов и систем вместе со способностью к длительному накоплению в жировой ткани.

Опасность производных бисфенила для здоровья человека заключается, прежде всего, в том, что они являются мощными факторами подавления иммунитета. Кроме того, поступление ПХБ в организм провоцирует развитие рака, поражений печени, почек, нервной системы, кожи (нейродермиты, экземы, сыпи). Самое опасное влияние ПХБ на человека заключается в их мутагенном действии, что негативно сказывается на здоровье последующих поколений людей.

Помимо этого, наше внимание к выбору цисплатина как молекулы-ингибитора N-ацетилтрансферазы вызвано высоким сродством и реакционной способностью металлокомплексов к трансферазам с образованием дезактивированных белковых аддуктов (рис. 2).

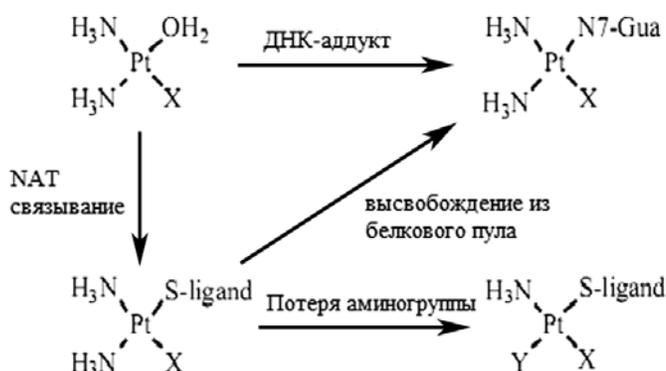


Рис. 2. Биохимические взаимодействия ингибитора цисплатина в клетке.

Таким образом, **цель** исследования состояла в изучении механизмов влияния антибластомных и проонкогенных соединений на активность систем ацетилирования в процессах канцерогенеза на ферментативном, генетическом и эпигенетическом уровнях.

Материалы и методы

Нами был выбран ряд наиболее реакционноспособных соединений в качестве молекул-кандидатов в ингибиторы активности NAT2: 1. Цисплатин (ЦП); 2. Нитрозобисфенил (НОБФ); 3. Диацетоксибисфенил (ДиАцБФ) (рис. 3).

Синтез производных бисфенила проводили в соответствии с разработанной нами ранее методологией.

Задачи *in vitro* экспериментов заключались в оценке фенотипа ацетилирующей способности (активности ферментов N-ацетилтрансфераз испытуемых животных) и оценке ингибирующего действия активных молекул-кандидатов на ткани печени трансгенных линий NAT2^{hom} и NAT1^{hom} (НЦБМТ ФМБА России) лабораторных мышей, а также в формировании основных аспектов биомоделирования процессов II фазы биотрансформации на трансгенных линиях мышей различного типа ацетилирования.

Объектом исследований служили биоматериалы печени мышей трансгенных линий NAT2^{hom} и NAT1^{hom} (НЦБМТ ФМБА России), чувствительных к факторам канцерогенеза в целом и воздействию ксенобиотиков (ацетилированию), в частности.

Биологический материал тканей лабораторных животных (печень) подвергался дальнейшей пробоподготовке, выделению белковой фракции и фракции, содержащей РНК, для последующей оценки генной экспрессии.

Из исследуемого материала выделяли тотальную РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля согласно протоколу производителя к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-сорб» («ИнтерЛабСервис», Москва). Синтез первой цепи кДНК проводили согласно указаниям инструкции «Комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК РЕВЕРТА-L» («ИнтерЛабСервис», Москва). Амплификацию с последующим определением уровня экспрессии гена NAT2 человека у трансгенных мышей проводили методом ПЦР с детекцией накопления продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR, США) с помощью детектирующего ам-

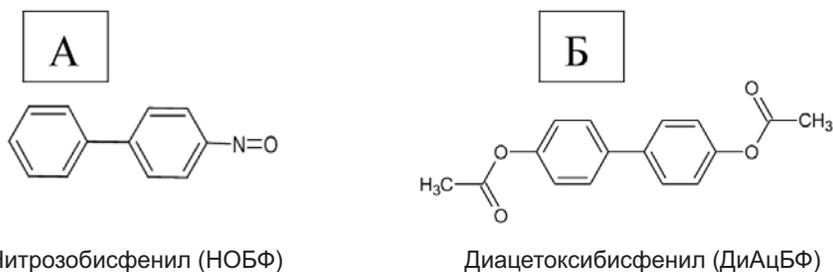


Рис. 3. Структурные формулы молекул ингибиторов – производных бисфенила: нитрозобисфенил (А) и диацетоксибисфенил (Б). Синтез произведен в НЦБМТ ФМБА России.

плификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) и специфических праймеров и зондов к гену *NAT2* человека у трансгенных мышей (далее – *NAT2hom*) («Синтол», Россия). Праймеры для последовательностей *NAT2hom* и *GAPDH* (гену «домашнего хозяйства») были подобраны с помощью программы Vector NTI. Последовательности мРНК *NAT2hom* и *GAPDH* были взяты в базе данных NCBI GenBank и синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва).

Основное лабораторное оборудование, применяемое при определении активности и экспрессии N-ацетилтрансферазы, дало возможность выполнять все необходимые этапы: введение испытуемых молекул-кандидатов лабораторным животным, забор и подготовку биоматериалов (печени) к исследованию, пробоподготовку гомогенатов всех тканей образцов в буфере для гомогенизации, определение общего содержания белка в полученных гомогенатах печени. Дополнительным является анализ ПААГ гель-электрофореза на общее профилирование по молекулярной массе белковых фракций гомогената и подтверждение содержания диапазона молекулярных масс NAT.

Основное оборудование и материалы: спектрофотометр 96-луночный Multiscan GO («Thermo Scientific»), амплификатор в реальном времени Real-Time CFX96 Touch («Bio-Rad»), высокоскоростной гомогенизатор SilentCrusher («Heidolph»), камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN® Tetra («Bio-Rad»), холодильное оборудование (-80°C).

Введение рассчитанного количества растворов ингибиторов и деионизованной воды в качестве контроля выполня-

ли для каждой испытуемой группы (линии) животных (5-10 особей в группе).

Далее определяли уровни ферментативной ацетилирующей способности N-ацетилтрансферазы и экспрессии гена *NAT2hom* у всех испытуемых животных в ответ на токсическое воздействие ингибиторов.

Дозировка ингибиторов составляла 1/5-1/10 ЛД₅₀ в диапазоне концентраций 5-50 мг/кг. В качестве контроля использовалось введение деионизованной воды.

Для определения эпигенетического эффекта ингибиторов использовали набор Histone Acetyltransferase Inhibitor Screening (Abcam, ab133099). Для выделения из ткани печени испытуемых животных обогащенной белковой фракции гистонов использовали набор Histone Extraction Kit (Abcam, ab113476).

В серии последующих экспериментов определяли остаточную ферментативную активность N-ацетилтрансферазы NAT2 и NAT1 методом прямой УФ-спектрофотометрии по Элману с использованием в качестве детектирующего агента 4-нитрофенилацетата (PNPA), выступающего в качестве донора ацетильной группы. Избирательными по NAT2 субстратами в *in vitro* определениях использовали водные растворы селективного NAT2 специфического субстрата сульфаметазина с концентрацией 5 мМ. Избирательными по NAT1 субстратам в *in vitro* определениях использовали водные растворы селективного NAT1 специфического субстрата пара-аминобензойной кислоты (ПАБК) с концентрацией 5 мМ.

Аликвоту субстрата объемом 100 мкл вносили в каждую измерительную лунку 96-луночного планшета, кроме

контрольных лунок. Контрольные измерения проводили без добавок субстрата и фермента. Источник ацетильной группы (4-нитрофенилацетат, PNPA) концентрацией 5 мМ (сток) объемом 50 мкл вносили последним после предварительной преинкубации фермента и субстрата. Планшеты закрывали пленкой и инкубировали в измерительной части спектрофотометра при 37°C 5 мин.

Измерение проводили в соответствии с методикой спектрофотометрического кинетического метода (по Эллману). После инкубации в течение 5 мин при 37°C проводили серию считываний с интервалом в 30 с на протяжении 60 мин. Результаты реакции учитывали, измеряя светопоглощение при 405 и 412 нм. Дальнейшую обработку данных выполняли в пакете Microsoft Excel.

Оценку активности проводили исходя из полученных значений оптической плотности за вычетом бланковых значений (без кофермента 4-нитрофенилацетата PNPA, субстрата и гомогената в соответствующих лунках при дизайне 96-луночного планшета).

Для определения удельной ферментативной активности величину, выраженную в мкМ/мин, соотносили с долей белка (мг) в каждом из изучаемых образцов (растворах белковых гомогенатов).

Объектами исследования *in vivo* эксперимента являлись аксолотли, т.к. у них относительно быстро происходит регенерация утраченных конечностей. Аксолотли массой 15-16 г длиной 12,0-12,5 см содержались в 160-литровых аквариумах с водоочисткой и принудительной аэрацией. Кормление осуществлялось личинками хирономид по поедаемости.

У экспериментальных объектов удалялись передние конечности до плечевого сустава (рис. 4).

Аксолотлям опытных групп вызывали медикаментозное нарушение регенерации введением растворов молекул-ингибиторов в концентрации 0,5 мг/мл.

У экспериментальных объектов после удаления передних конечностей до плечевого сустава процесс регенерации оценивали по скорости роста культы ампутированной конечности по стадиям (рис. 4).

У экспериментальных гидробионтов делали мазки крови (по 2 шт. от каждого): один для лейкограммы, второй для цитохимической реакции определения катионного белка [8].

Анализ показателей эритропоза и дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоформула) в окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови осуществлялись микроскопически на



Здоровая передняя конечность



Культя конечности после ампутации

Рис. 4. Удаление конечности аксолотля в эксперименте.

цифровом микроскопе Optika DM 15. Уровень гемопоэза оценивался по доле незрелых форм эритроцитов.

Фагоцитарная активность нейтрофилов оценивалась цитохимическим методом в реакции с бромфеноловым синим [10], адаптированным для гидробионтов [7, 8]. Определялся средний цитохимический коэффициент (СЦК) содержания неферментного катионного белка в нейтрофилах крови.

При определении неферментного лизосомального катионного белка в нейтрофилах исследуемые клетки делили на четыре группы (0–3 балла) по степени их фагоцитарной активности: 0 – гранулы катионного белка отсутствуют, 1 – единичные гранулы, 2 – гранулы занимают примерно 1/3 цитоплазмы, 3 – гранулы занимают 1/2 цитоплазмы и более.

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) [17] рассчитывали по формуле:

$$\text{СЦК} = (0 \times \text{N}_0 + 1 \times \text{N}_1 + 2 \times \text{N}_2 + 3 \times \text{N}_3) / 100,$$
 где $\text{N}_0, \text{N}_1, \text{N}_2, \text{N}_3$ – число нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

Результаты и их обсуждение

Реакции N-ацетилирования посредством ферментов N-ацетилтрансфераз являются одной из ключевых стадий детоксикации, тогда как O-ацетилирование из N-гидроксилированных ариламинов или внутримолекулярного N,O-переноса ацильной группы N-арилгидроксилированных кислот приводит к биоактивации. Получающиеся ацетилированные сложные эфиры нестабильны и спонтанно деградируют в форму арилнитроний ионов, которые являются высокоэлектрофильными соединениями и способны сформировать ковалентные аддукты с ДНК и инициировать канцерогенез (рис. 5).

Регуляция активности ферментов осуществляется путём их взаимодействия с различными биологическими компонентами или чужеродными соединениями, которые выступают регуляторами ферментов. Они могут либо ускорять (активировать), либо замедлять (ингибировать) ферментативную реакцию ацетилирования [6].

В дополнение к O-ацетилированию метаболиты N-гидроксиариламинов мо-

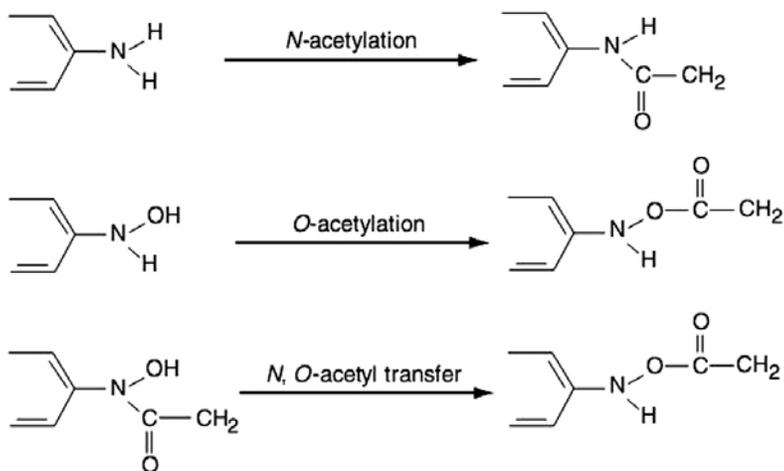


Рис. 5. Направления реакций, катализируемые N-ацетилтрансферазой (NAT).

гут также подвергнуться окислению в форму нитрозоаренов, которые способны вступать в реакции с нуклеофильными тиольными группами в белках. Известно, что реактивные ариламинметаболиты могут действовать как необратимые ингибиторы NAT1 [14].

Ранние исследования продемонстрировали, что под воздействием субстратов N-ариламингидрокси-производных (на примере N-гидрокси-4-аминобисфенила, а также ряде других структурно подобных N-арилгидроксимов) ферментативная система дезактивируется и функционирует в связанном с необратимыми субстратами состоянии, т.е. практически ингибирована.

Деление на инициаторы и промоторы канцерогенеза в определенной степени соответствует делению канцерогенов на генотоксические и негенотоксические [16].

Соединения генотоксического класса взаимодействуют с компонентами генома клетки, вызывая мутации ДНК. Генотоксические вещества могут быть разделены на две группы: прямодействующие канцерогены и соединения, не канцерогенные в исходной форме, но активирующиеся в клетке под действием соответствующих ферментов (непрямые канцерогены).

Канцерогены прямого действия при растворении (в первую очередь, в воде) распадаются с образованием высокоактивных производных, содержащих избыточный положительный заряд. Электрофильная группа взаимодействует с отрицательно заряженными (нуклеофильными) группами молекулы ДНК, образуя стабильную ковалентную связь. При репликации нуклеотид, связанный с остатком канцерогена, может быть не-

правильно считан ДНК-полимеразой, что приводит к мутации.

Канцерогены непрямого действия являются малореакционноспособными соединениями. В процессе метаболизма они подвергаются ферментативной активации с образованием высокоактивных электрофильных метаболитов, способных взаимодействовать с нуклеофильными группами ДНК.

Канцерогены непрямого действия метаболизируются в клетке специальными ферментными системами. Большинство проканцерогенов гидрофобны, поэтому способ их выведения из клетки сводится, в основном, к повышению водорастворимости. При этом первым событием в цепи метаболических превращений является окисление исходной молекулы. Эта реакция осуществляется, в основном, изоформами цитохрома P450. Продукты окисления подвергаются дальнейшему превращению с образованием соединений, которые еще легче выводятся из клетки и организма. Этот этап осуществляется эпоксидгидролазами, глутатион-S-трансферазами, N,O-ацетилтрансферазами, глюкуронилтрансферазами и др. ферментами II фазы биотрансформации [15].

Наряду с основным процессом детоксикации некоторые соединения в ходе этих реакций активируются, превращаясь в непосредственные канцерогены – высокореактивные производные, ковалентно связывающиеся с клеточными белками и нуклеиновыми кислотами.

Как правило, электрофильные метаболиты образуются на первом этапе окисления проканцерогена микросомными монооксигеназами, которые локализованы, главным образом, в эндоплазматическом ретикулуме и имеют в

качестве терминального звена цитохром P450 [22].

Следует заметить, что канцерогенное действие одного и того же соединения могут обеспечивать несколько механизмов.

Фенотип ацетилирования биоматериалов тканей неодинаков и демонстрирует различную остаточную активность после воздействия изучаемыми молекулами-ингибиторами.

Данные кинетического эксперимента автоматически пересчитывали в активность А (мкмоль/мин/мг) с учетом доли общего белка для каждой пробы.

В группе исследуемых образцов, отвечающих в *in vitro* эксперименте на введение ряда препаратов (ЦП, НОБФ, ДиАцБФ) трансгенным мышам (NAT2hom и NAT1hom) установлено ингибирующее действие на характер ацетилирования (активность). Высокий интактный уровень активности ацетилирования у трансгенных мышей NAT2hom и NAT1hom, отличающий их от животных инбредных линий, коррелирует с максимально выраженным

эффектом ингибирования активности NAT2 под воздействием ингибиторов-производных бисфенила. В ходе исследования установлено максимальное ингибирующее действие (82,3%) для диацетоксибисфенила (0,1 мМ) (рис. 6).

Нами предложен термин «сверхбыстрого» типа ацетилирования для линии животных NAT2hom с повышенной устойчивостью к токсикантам (в рамках выбранных ингибиторов) и резко выраженным характером фенотипа ацетилирования (*in vitro*), превышающим активность ацетилирования у сравниваемых групп животных в 4 и более раз.

Для оценки ингибирующего действия цисплатина в качестве показателя эффективности лиганда при ингибирующем биохимическом или биологическом взаимодействии нами выбрана концентрация полумаксимального ингибирования IC_{50} . IC_{50} является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования биологического процесса на 50%. Этот показатель используется

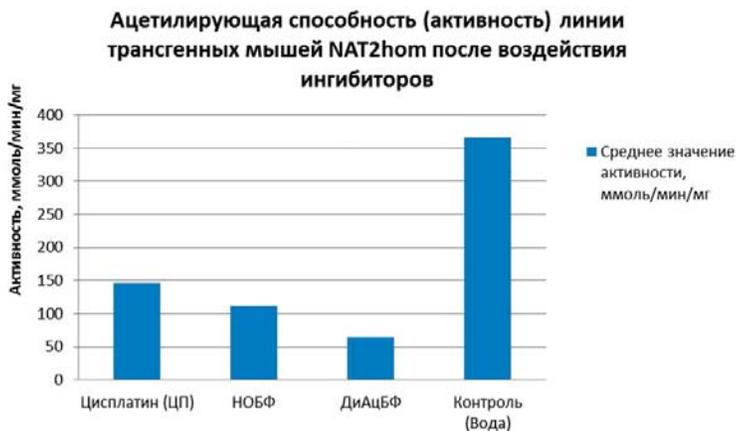


Рис. 6. Сравнительный анализ активности ацетилирования линии мышей NAT2hom («сверхбыстрого» типа ацетилирования) под воздействием ингибиторов (цисплатина, 5 мг/кг; нитрозобисфенила, 0,1 мМ; диацетоксибисфенила, 0,1 мМ) по сравнению с интактным уровнем активности контрольных животных (вода) для гомогената печени.

нами в качестве индикатора активности вещества-кандидата в фармакологических исследованиях. IC_{50} является показателем концентрации лекарственного вещества, необходимой для 50% ингибирования тестовой реакции *in vitro*. Показатель IC_{50} не является непосредственным индикатором аффинности, но является связанной с ней величиной.

В определениях ингибирующей способности цисплатина установлено, что с ростом концентрации цисплатина в индивидуальном введении в постановках на активность NAT2 наблюдается равномерный спад удельной активности во всей области изучаемых концентраций (0,10-0,50 мМ).

Регрессионный анализ экспериментальных данных позволяет использовать логарифмическую зависимость в динамике возрастания ингибирующей способности (рис. 7). Значение IC_{50} , установленное для индивидуального цисплатина, специфично на NAT2 и составило 0,25 мМ (0,075 мг/лунку).

В ходе эксперимента у линии мышей NAT2^{hom} выявлено, что молекула-кандидат ДиАцБФ (50 мг/кг) индуцирует активную экспрессию гена *NAT2^{hom}*, которая коррелирует со спадом ферментативной активности NAT2, а линия выбранных животных обладает выраженным фенотипом «сверхбыстрого» активного ацетилирования (рис. 6, 8).



Рис. 7. Динамика спада активности NAT2 (линия NAT2^{hom}, печень) с ростом концентрации цисплатина в индивидуальном введении в тестовой модели *in vitro*.

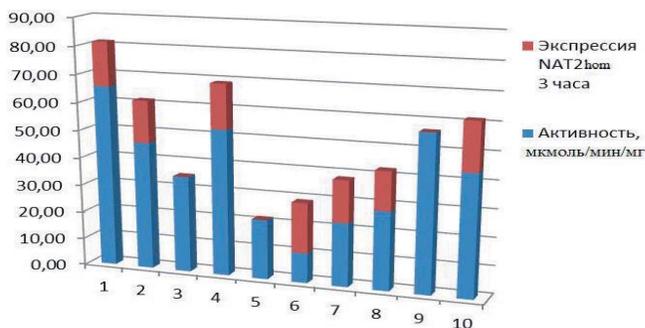


Рис. 8. Сопоставление уровня остаточной ацетилирующей способности «сверхбыстрого» фенотипа ацетилирования линии NAT2^{hom} с нормированной экспрессией гена *NAT2^{hom}*, индивидуально для животных, через 3 ч после введения ДиАцБФ (50 мг/кг).

Установлено, что фенотип ацетилирования биоматериалов печени испытываемых животных различен и демонстрирует различную остаточную активность после воздействия изучаемых молекул-ингибиторов.

При определении эпигенетического механизма действия выбранных молекул-токсикантов нами установлено ингибирующее влияние в широком диапазоне концентраций ингибиторов.

Типичный вид электрофореграммы для гистоновой белковой фракции после пробоподготовки приведен на рис. 9. На электрофореграмме отражена обогащенная гистоновая фракция с диапазоном молекулярной массы 12-14 кДа.

На примере диацетоксибисфенила на рис. 6 в диапазоне концентраций 10-120 мкМ отчетливо выражено ингибирующее действие производных бисфенила (рис. 10). Общее ингибирующее действие на гистонацетилтрансферазы трансгенной линии мышей NAT2^{hom} достигает 82% при концентрации ингибитора 110 мкМ.

Изучение аспектов регенерации является одной из фундаментальных задач биологии и медицины в части выявления и определения их эпигенетических механизмов [4].

Под регенерацией (в патологии) понимают восстановление целостности тканей, нарушенной каким-либо болезненным

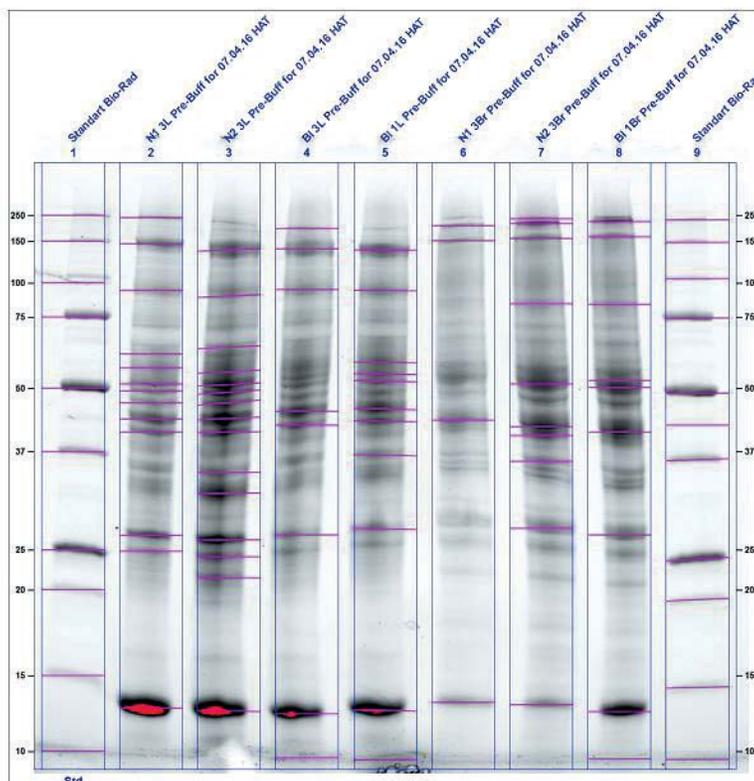


Рис. 9. Электрофореграмма белковых гомогенатов печени после выделения гистоновой фракции для определения эпигенетического фактора ацетилирования (линия мышей NAT2^{hom}).

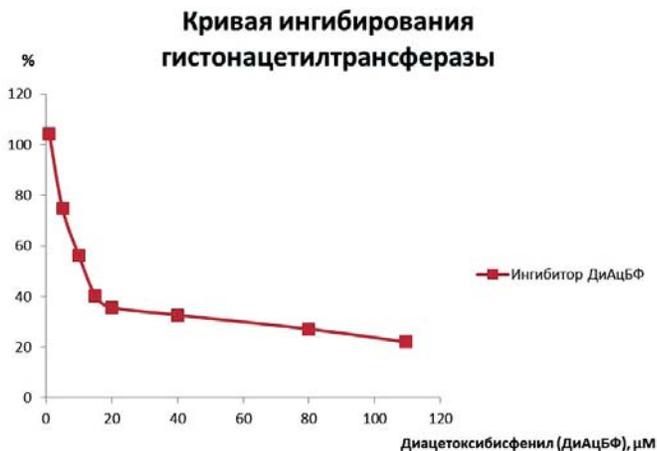


Рис. 10. Ингибирующее действие производных бисфенила на эпигенетические механизмы ацетилирования у мышей линии NAT2hom (печень) в *in vitro* эксперименте.

процессом или внешним травмирующим воздействием. Восстановление происходит за счет размножения соседних клеток, заполнения молодыми клетками дефекта и последующего превращения их в зрелую ткань. Такая форма носит название репаративной (возмещающей) регенерации. При этом возможны два варианта регенерации:

1) убыль возмещается тканью того же вида, что и погибшая (полная регенерация);

2) убыль замещается молодой соединительной (грануляционной) тканью, превращающейся в рубцовую (неполная регенерация), что является не регенерацией в собственном смысле, а заживлением тканевого дефекта [13, 20].

Ранее основные стадии регенерации на примере конечности личинки мексиканской амбистомы изучены в работах [26, 4, 5]. Первой стадией является заживление раны. Наружный слой составляют клетки эпидермиса – поверхностного слоя кожи. И определенная часть клеток начинает перемещаться с культи

на поверхность раны, постепенно закрывая ее. После нескольких делений на поверхности возникает образование, которое состоит из многих слоев и именуется апикальной шапочкой. Вторая стадия – «демонтажное». Постепенно рассасываются ткани, непосредственно прилежащие к поверхности раны. Конец культи становится отечным и выпячивается наружу. Третья стадия: под апикальной шапочкой начинают накапливаться клетки, утратившие свою специализацию. На поверхности культи образуется холмик. Четвертая стадия – «рост». Лапа начинает интенсивно расти. Образуются пальцы. К концу стадии формируется уменьшенная копия нормальной лапы.

Регенерации предшествует освобождение данного участка от погибших клеток путем ферментативного их расплавления и всасывания в лимфу, кровь или путем фагоцитоза. В воспалении и регенерации поврежденных тканей ведущую роль играют макрофаги. Они, секретировав различные цитокины, регулируют скорость размножения и харак-

тер дифференцировки клеток. Установлено, что при вялотекущем заживлении ран и фиброзе количество и активность макрофагов значительно снижаются и повышается экспрессия трансформирующего фактора роста TGF- β 1, что способствует быстрому развитию фибропластических процессов [7-11].

Способностью к регенерации обладают далеко не все ткани и не в одинаковой степени. Иногда возникающая при регенерации ткань по строению отличается от исходной (атипическая регенерация), или объем ее превышает объем погибшей ткани (гиперрегенерация). Такое течение регенерационного процесса может привести к возникновению опухолевого роста [12, 13, 17, 18, 20, 21, 24, 25].

Ранее в работе [18] показано, что регенерация конечностей у позвоночных регулируется теми же ключевыми регуляторными белками, которые управля-

ют развитием конечностей у эмбриона человека. Эти белки образуют два сигнально-регуляторных каскада, или пути (pathways), которые называются Wnt/ β -catenin и BMP – по названию ключевого участника каскада – белка BMP (bone morphogenetic protein) [18, 20].

Авторами был сконструирован вирус, в геном которого встроены ген белка Axin1. Этот белок блокирует работу Wnt-каскада. Введение вируса аксолотлю снизило способность к регенерации. У аксолотля в норме отрезанные конечности восстанавливаются полностью, однако у зараженных искусственным вирусом аксолотлей вместо лапы вырастала лишь заостренная культя без пальцев [26, 25, 11].

Наши наблюдения в экспериментах *in vivo* на аксолотлях показали, что регенерация конечностей после ампутации в опытной и контрольной группах происходила неодинаково. Динамика роста конечностей представлена в табл. 1.

Таблица 1

Динамика роста отсеченной конечности (длина, мм)

Группы	Сроки (этапы) эксперимента (наблюдений)											
	начало		Через 2 недели		Через 3 недели		Через 4 недели		Через 6 недель		Через 7 недель	
	конечность	культия	культия	апикальная часть								
контроль	23	10	13	1	12	2	13	3	16	5	16	5
Цисплатин												
1 доза	20	10	11	1	12	2	14	4	15	4	16	5
2 доза	26	10	11	1	11	2	11	3	15	4	14	4
3 доза	22	10	12	2	10	1	11	2	12	3	12	4
ДиАцБФ												
1 доза	20	10	12	1	13	3	13	3	12	4	14	4
2 доза	21	10	10	1	11	2	12	2	15	4	16	5
3 доза	21	8	8	1	9	1	12	3	15	5	15	4

Различия репаративной регенерации становятся заметными уже в первые три недели после ампутации (1-2 стадии); степень изменения зависела от дозы препаратов. У опытных аксолотлей, в отличие от контроля (рис. 11А), практически не разделены базовая часть конечности и зона роста; у особей с введенным ЦП слабо гиперемирована апикальная часть (рис. 11Б); с ДиАцБФ – она прозрачная (рис. 11В).

Через 7 дней после ампутации у контрольных особей происходит отрастание нормальной конечности (рис. 11Г). В обоих вариантах опыта вместо четырех формируется только три пальца (рис. 11Д, Е).

У опытных аксолотлей замедляется эритропоэз и усиливается лейкопоэз (табл. 2). В группе животных, кото-

рым вводился ЦП, велика доля эозинофилов в лейкограмме. Происходит компенсация действия препарата, который, вероятно, вызвал активацию апоптоза. В группе с ДиАцБФ значительно увеличен процент моноцитов, что, очевидно, связано с усилением фагоцитарной активности макрофагов в процессе регенерации. Однако цитотоксичность макрофагов (нейтрофилов), судя по накоплению лизосомального катионного белка, изменилась незначительно по сравнению с контролем. Исключение составляет группа животных, у которых показатель уменьшился (вводилась небольшая доза препарата). В группах с ЦП, напротив, усиливается микробицидная система нейтрофила (по СЦК катионного белка в лизосомах).



Рис. 11. Регенерация конечности аксолотлей в процессе эксперимента.

Таблица 2

Гематологические и цитохимические показатели экспериментальных аксолотлей через 7 недель после ампутации

Показатель	Контроль	ЦП			ДиАцБФ		
		1-я доза	2-я доза	3-я доза	1-я доза	2-я доза	3-я доза
Эритропоз, %							
Гемоцитобласты, эритробласты	7	2	7	8	5	7	9
Нормобласты	3	4	1	4	7		3
Базофильные эритроциты	38	15	10	18	15	12	13
Зрелые эритроциты	52	79	82	70	73	81	75
Лейкоцитарная формула, %							
Миелобласты	8	4	10	12	8	18	5
Промиелоциты	3	3	4	2	-	5	-
Миелоциты	-	-	2	-	-	-	-
Метамиелоциты	-	-	-	-	-	-	-
Палочкоядерные нейтрофилы	-	-	-	-	-	-	1
Сегментоядерные	-	-	4	5	-	-	4
Эозинофилы	10	35	32	24	6	1	2
Базофилы	1	1	2	1	-	-	-
Моноциты	2	1	-	-	6	8	5
Лимфоциты	76	56	46	56	80	68	83
Фагоцитарная активность							
СЦК, ед.	1,93	2,41	2,12	2,40	1,49	1,92	2,01

По нашим наблюдениям, изменения происходят также в морфологии клеток крови (рис. 12). В группе с введенным ЦП наблюдается фрагментация цитоплазмы и цитолиз эозинофилов.

Под действием ДиАцБФ появляются полиморфноядерные нейтрофилы в крови аксолотлей, незрелые клетки (гемоцитобласты) подвергаются разрушениям разного рода. При этом за-

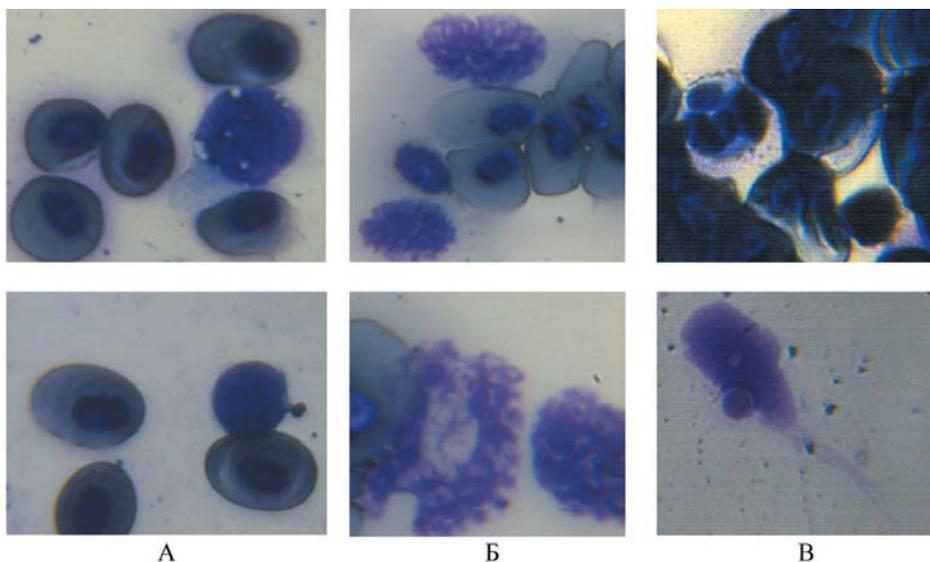


Рис. 12. Картина крови аксолотлей через 7 недель после ампутации: А – нормальные клетки крови в контроле; Б – фрагментация цитоплазмы эозинофилов, цитолиз; В – появление полиморфноядерных нейтрофилов, выпадение ядра гемоцитобласта.

медляется эритропоэз и усиливается лейкопоэз.

ЦП в эксперименте вызвал активацию микробицидной системы (судя по увеличению процента эозинофилов и потенциала фагоцитарной активности – содержанию высокоцитотоксичного катионного белка в лизосомах нейтрофилов). В группе с ДиАцБФм значительно усилилась фагоцитарная активность макрофагов.

Таким образом, активация цисплатином и производными бисфенила катионных белков и механизмов с участием реактивных метаболитов нарушает трансмембранные процессы организма, что за счет свободнорадикальных реакций в итоге приводит к лизису мембран. Этому же способствует и активация препаратами макрофагальной активности.

Выводы

1. Впервые нами установлен особый характер интенсивной ацетилирующей способности трансгенных линий мышей (NAT2^{hom} и NAT1^{hom}), выраженной в высоком уровне активности ферментов ацетилирования, и замечена корреляция устойчивости лабораторных трансгенных животных после воздействия токсичными соединениями (ЦП, НОБФ, ДиАцБФ) с фенотипом ацетилирования. Нами предложен термин «сверхбыстрого» фенотипа ацетилирования для сочетания эффекта устойчивости лабораторных животных к токсикантам с повышенным уровнем экспрессии генов NAT и резко выраженной интенсивностью ацетилирования – ацетилирующей способностью.

2. Также установлен ингибирующий характер всех молекул-кандидатов (цисплатин и производные бисфенила)

и выявлена взаимосвязь между ферментативной активностью с уровнем ацетилирования гистонов (гистонацетиленотрансфераза, NAT) и экспрессией генов семейства N-ацетилтрансфераз человека (NAT1, NAT2).

3. Эффект дозозависимости фенотипа ацетилирования от токсичного воздействия соединениями – ингибиторами NAT позволяет применять данные методические подходы в поиске селективных молекул-кандидатов в ингибиторы NAT человека и имеет возможность использования для создания перспективных фармакологических средств.

4. Наблюдаемые эффекты имеют все предпосылки и взаимосвязи с механизмами регуляции активности ферментов семейства NAT и основания к эпигенетическому фактору воздействия выбранной группы токсикантов.

5. На модели регенеративной функции аксолотлей под действием изучаемых препаратов (цисплатин и производные бисфенила) происходят нарушения регенерации удаленных конечностей аксолотлей, выражающиеся в замедлении роста и изменениях в формировании пальцев.

6. Полученные с помощью полиметодических подходов данные иллюстрируют, что ингибиторы NAT, включая собственно и противоопухолевые средства, такие как цисплатин, обладают проканцерогенным действием.

7. Созданы модели с выраженным механизмом развития проопухолевого процесса, на основе которых возможно испытание, исследование и конструирование противоопухолевых средств и средств регенеративно-репаративного действия.

Список литературы

1. **Белицкий Г.А.** Прогноз канцерогенности фармакологических средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах // Ведомости фармкомитета. 1999. № 1. С. 18-31.
2. **Каркищенко В.Н., Мартынов В.В.** Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // Биомедицина. 2006. № 4. С. 85-87.
3. **Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П.** Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека // Биомедицина. 2016. № 1. С. 4-16.
4. **Карлсон Б.М.** Регенерация. - М.: Наука. 1986. 191 с.
5. **Короткова Г.П.** Регенерация животных. - СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета. 1997. 480 с.
6. **Кэрри Н.** Эпигенетика: как современная биология переписывает наши представления о генетике, заболеваниях и наследственности. - Р-н-Д. 2012. 349 с.
7. **Пронина Г.И.** Использование цитохимических методов для определения фагоцитарной активности клеток крови или гемолимфы разных видов гидробионтов для оценки состояния их здоровья // Известия ОГАУ. 2008. №4(20). С. 160-163.
8. **Пронина Г.И., Ревякин А.О., Корягина Н.Ю., Капанадзе Г.Д., Степанова О.И., Курищенко Ж.О.** Регенерация патологически измененной печени карпа после межвидовой трансплантации стволовых клеток // Биомедицина. 2015. № 1. С. 85-89.
9. **Шехтер А.Б., Серов В.В.** Воспаление, адаптивная регенерация и дисрегенерация (анализ межклеточных взаимодействий) // Архив патологии. 1991. Т. 53. № 7. С. 7-15.
10. **Шубич М.Г.** Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. 1974. № 10. С. 1321-1322.
11. **Bischoff M., Schnabel R.** A posterior centre establishes and maintains polarity of the *Caenorhabditis elegans* embryo by a Wnt-dependent relay mechanism // PLOS Biology. 2006. No. 4(12). P. 396.
12. **Curti A., Fogli M., Ratta M., Biasco G., Tura S., Lemoli R.M.** Dendritic cell differentiation from hematopoietic CD34+ progenitor cells // J. Biol. regul. homeost. agents. 2001. Vol. 15. No. 7. P. 49-52.
13. **Gardiner D.M., Blumberg B., Komine Y., Bryant S.V.** Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs // Development. 1995. No. 121(6). P. 1731-41.
14. **Hanna P.E.** N-acetyltransferases, O-acetyltransferases, and N,O-acetyltransferases: enzymology and bioactivation // Adv. Pharmacol. 1994. No. 27. P. 401-430.
15. **Hein D.W.** Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis // Biochim. Biophys. Ada. 1998. No. 948. P. 37-66.
16. **Hein D.W.** Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis // Mutation Research. 2002. No. 506-507. P. 65-77.
17. **Kaplow L.S.** A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow // Blood. 1955. Vol. 10. P. 1023-1029.
18. **Kawakami Y., Esteban C.R., Matsui T., Rodríguez-León J., Kato S., Izpisua Belmonte J.C.** Wnt/ β -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration // Genes&Development. 2006. Vol. 20. P. 3232-3237.
19. **Li Z. (J.), Gwinn M.** Toxicological review of biphenyl. In: Support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS). - 2011.
20. **Nye H.L., Cameron J.A., Chernoff E.A., Stocum D.L.** Regeneration of the urodele limb: a review // Dev. Dyn. 2003. No. 226(2). P. 280-94.

21. **Pronina G.I., Revyakin A.O.** Changes of the morphophysiological parameters of carp *Cyprinus carpio* at food limitation in aquaculture conditions // J. of Ichthyology. 2015. Vol. 55. No. 2. P. 297-301.
22. **Ragunathan N., Dairou J., Pluvinage B., Martins M., Petit E., Janel N., Dupret J.M., Rodrigues-Lima F.** Identification of the xenobiotic-metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase I as a new target of cisplatin in breast cancer cells: molecular and cellular mechanisms of inhibition // Mol. Pharmacol. 2008. No. 73. P. 1761-1768.
23. **Reedijk J., Teuben J.M.** In cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug / Lippert B., ed. Wiley V.C.H. - Weinheim. Germany. 1999. P. 339-362.
24. **Sutherland J., Denyer M., Britland S.** Motogenic substrata and chemokinetic growth factors for human skin cells // J. Anat. 2005. Vol. 207. No. 1. P. 67-78.
25. **Tanaka E.M.** Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration // Curr. Opin. Genet. Dev. 2003. No. 13(5). P. 497-501.
26. **Tank P.W., Carlson B.M., Connelly T.G.** A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum* // II J. Morph. 1976. Vol. 150. P. 117-128.

Regulation of acetylation systems in carcinogenesis processes: from phenotype to epigenetics

V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, D.V. Khvostov, N.V. Petrova, G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin

The study examined the role of acetylation in phenotypic and epigenetic mechanisms of gene expression that do not affect the original sequence by the action of procancerogenic and antineoplastic drugs.

Based on the data obtained *in vitro* experiment on enzymatic activity, gene expression and epigenetic *NAT2hom* factor of action with an effective inhibitory effect bisphenol substances (nitrosobenzene and diacetoxybiphenyl) and cisplatin for the enzyme N-acetyltransferase NAT2 human. For selected inhibitors studied concentration dependence of the enzymatic activity and determined the concentration value premaxillae inhibition IC_{50} . Create a new model of *in vitro* evaluation acetylation ability as well as determination of the kinetic parameters of the acetylation of substrates, activators and inhibitors, NAT. The model proposed for the screening of substances that affect the process of acetylation. With its help, as well as on models of transgenic mice carrying the *NAT2* gene of the person and the axolotl the nature of the interaction in the “inhibitor – enzyme activity”, “inhibitor of expression of a gene” and the predicted level of toxic effects of NAT inhibitors on enzymatic, genetic and epigenetic levels.

Experimentally on the example of the impact of the molecules of the toxicants presents a model study of epigenetic factors derived bisphenol and cisplatin in the regulation of epigenetic programs violations regeneration remote extremities of the axolotl, which is expressed in slower growth and changes in the formation of the fingers. There was deceleration of erythropoiesis and increased blood. Cisplatin and derivatives bisphenol cause an increase in the proportion of eosinophils and content of lysosomal cationic protein in neutrophils and a significant increase in the percentage of monocytes, which as a whole confirms the development of oncological processes of any localization.

Key words: N-acetyltransferase (NAT), transgenic humanized mice by human gene *NAT2* and *NAT1*, *NAT2* gene expression, epigenetics, acetylation, carcinogenesis, inhibitors of NAT, axolotl, regeneration, erythropoiesis, leukocyte formula.