

## ХИМИЯ

УДК 577.152.1:547.681

А. Г. СЫСА<sup>1</sup>, О. В. ПАНИБРАТ<sup>1</sup>, А. С. БАБЕНКО<sup>2</sup>, П. С. ШАБУНЯ<sup>1</sup>,  
С. А. ФАТЫХОВА<sup>1</sup>, П. А. КИСЕЛЕВ<sup>1</sup>

**КОМПЛЕКСНЫЙ ХАРАКТЕР ВЛИЯНИЯ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ  
УГЛЕВОДОРОДОВ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ КАК ВАЖНЫЙ ФАКТОР,  
ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ОСОБЕННОСТИ ИХ КАНЦЕРОГЕННОЙ АКТИВАЦИИ**

(Представлено членом-корреспондентом С. А. Усановым)

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

<sup>2</sup>РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Александра  
Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск

Поступило 18.11.2013

**Введение.** Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относятся к наиболее опасным экотоксикантам. В частности, им присущи канцерогенные свойства. Однако для проявления своего биологического эффекта ПАУ нуждаются в метаболической активации [1–4]. Активация реализуется тремя основными путями [5]. Два из них обусловлены пероксидазной и монооксигеназной активностью изоэнзимов цитохрома Р-450 (СУР). В третьем случае основная роль принадлежит семейству альдо-кето редуктаз. Вместе с тем мало что известно о конкретном вкладе каждого из путей в инициирование и развитие канцерогенных процессов в отдельных органах и тканях. Более того, так как полициклические ароматические углеводороды поступают в организм в виде широкого набора соединений, часть из которых не только подвергается метаболической трансформации, но и вызывает усиление экспрессии генов тех СУР, которые их окисляют (эффект субстратной индукции), актуальным является вопрос о роли комплексного воздействия ПАУ в реализации того или иного молекулярного механизма химически обусловленного канцерогенеза [3; 6; 7]. Действительно, выявлена органо- и видоспецифичность различных изоформ фермента, что в свою очередь во многом определяет органо- и видоспецифичность действия как канцерогенов, так и токсических соединений, подвергающихся метаболической активации [3; 7].

Цель работы – оценка роли веществ, сопутствующих проканцерогенному субстрату, в процессе активации последнего. В качестве субстрата выбран 7,8-дигидрокси-7,8-дигидробензо(а)-пирен (Б(а)П-7,8-диол), эпоксидирование которого приводит к «полному» канцерогену — г-7,т-8-дигидрокси-г-9,10-эпокси-7,8,9,10-тетрагидро-бензо(а)пирену (ДЭ2) [8]. Примером сопутствующего вещества стал 20-метилхолантрен (20-МХ), который наряду с производными бензо(а)пирена (Б(а)П), является компонентом табачного дыма.

Работа проводилась на модели опухолевой клеточной линии А549 (клеточная линия карциномы легких человека), что обусловлено двумя обстоятельствами: во-первых, значительная часть загрязнителей окружающей среды поступает в организм через легкие и претерпевает окислительную трансформацию непосредственно в этом органе; во-вторых, по морфологии и функциональным свойствам, в т. ч. синтезу сурфактантов, окислительному метаболизму, транспортным свойствам, клеточная линия А549, близка к легочным эпителиальным клеткам II типа [9].

**Материалы и методы исследования.** В работе монослойную клеточную культуру А549 культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США) содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (КРС) (HyClone, США), 4 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина

и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Клеточная культура поддерживалась на стадии логарифмического роста путем рутинной пересадки трижды в неделю. Контроль адгезии клеток на подложке, роста и возможной контаминации производили визуально с помощью инвентированного микроскопа АУ-12 (ЛЮМО, Россия).

Для индукции использовали раствор 20-МХ в диметилсульфоксиде (концентрация маточного раствора 20-МХ 3,0 мМ). При 70–80 %-ной конfluентности образца питательную среду во флаконе меняли на свежую, не содержащую сыворотки КРС, затем во флакон добавляли сыворотку КРС с предварительно растворенным в ней 20-МХ (конечная концентрация индуктора составляла 30,0 мкМ, объем растворителя не превышал 0,1 %). Экспонирование длилось 24 ч.

Общую фракцию РНК выделяли с использованием набора реагентов «РНК-ВТК» (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК после выделения измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo, США). Во всех образцах соотношение 260/280 находилось в диапазоне 1,9–2,1, соотношение 260/230 в диапазоне 1,7–2,8, соотношение 260/320 во всех случаях превышало 4. Целостность полученной РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле без использования денатурирующих условий.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реагентов «РЕВЕРТА» (Амплиценс, Россия) согласно протоколу производителя. Специфические олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно меченые TaqMan зонды для амплификации *CYP11B1*, *CYP11A1*, *CYP11A2* и *GAPDH* были сконструированы с помощью программного обеспечения ABI Primer Express (version 3.0), а затем синтезированы и методом ВЭЖХ очищены ОДО «Праймтех» (Беларусь). В качестве положительного контроля ПЦР использовали плазмидную ДНК, содержащую последовательность кДНК исследуемых генов в векторе рХсм21. Калибраторы получали разведением плазмидной ДНК со вставкой. Конструкции были созданы на базе Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали амплификатор Applied Biosystems 7500 (США). Реакция протекала в инкубационной среде объемом 25 мкл, содержащей примерно 50 нг кДНК-матрицы, 0,5 мкМ каждого олигонуклеотидного праймера для амплификации, 0,5 мкМ флуоресцентно меченного зонда, 0,2 мМ каждого dNTP, 50 мМ KCl, 25 мМ Трис-HCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1,25 МЕ Taq ДНК-полимеразы (Институт биоорганической химии НАН Беларуси). ПЦР состояла из первичной денатурации ДНК при +95 °С в течение 5 мин и 45 циклов амплификации, проводимых при следующих условиях: денатурация при +95 °С в течение 10 с, отжиг праймеров и синтез ДНК при +60 °С в течение 60 с. Измерение флуоресценции образца проводилось в конце каждого цикла амплификации. Полученные количественные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Applied Biosystems, поставляемого с прибором. Специфичность амплификации целевых участков генов подтверждали с помощью секвенирования с использованием прямого и обратного праймеров. Секвенирование проводили с помощью прибора ABI 3130 (Applied Biosystems, США). Для определения эффективности реакций для каждой мишени использовали метод стандартных кривых [10].

Ферментативную реакцию окисления Б(а)П-7,8-диола проводили в культуральном флаконе (2,0 млн клеток) в 2 мл питательной смеси, содержащей субстрат, начальная концентрация которого составляла 10,0 мкМ (объем растворителя – ДМСО не превышал 0,1 %). Реакцию начинали добавлением 1,0 мМ НАДФН и проводили в течение 2 ч. Далее питательную смесь отбирали, вносили 5 мл этилацетата и экстрагировали смесь в течение 1 мин с использованием встряхивателя Micro-Shaker-326m (Польша). Органическую фазу отбирали. Экстракцию проводили трижды, затем этилацетат удаляли. Продукты экстракции растворяли в 500 мкл метанола.

Хроматографический анализ проводился на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с флуоресцентным детектором FLD G1321A. Была использована колонка Zorbax Eclipse plus C18 длиной 100 мм, диаметром 3,0 мм, размер зерна – 1,8 мкм. Разделение компонентов проб проводили при следующих условиях: температура колонки +40 °С; скорость потока 0,4 мл/мин; объем инъекции 2 мкл; детектирование при длинах волн возбуждения 344 нм и испускания 398 нм; подвижная фаза А – деионизованная вода; подвижная фаза В – метанол. Был использован градиентный режим элюирования с изменением состава подвижной фазы от 40 до 47,3 % фазы В за 14 мин,

затем до 60 % фазы В за 1 мин и изократической элюцией при 60 % фазы В следующие 15 мин. Общее время анализа составляло 30 мин.

Определение концентрации продуктов реакции осуществляли на базе калибровки, построенной по стандартным образцам тетрагидроксипроизводных бензо(а)пирена (Б(а)П-тетрол). Содержание г-7,т-8-дигидрокси-с-9,10-эпокси-7,8,9,10-тетрагидро-бенз(а)пирена (ДЭ1) рассчитывали как сумму концентраций г-7,т-8-с-9,с-10-тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробенз(а)пирена и г-7,т-8-с-9, т-10-тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробенз(а)пирена. Для г-7,т-8-дигидрокси-т-9,10-эпокси-7,8,9,10-тетрагидро-бенз(а)пирена характеристичными тетролами были г-7,т-8,т-9,с-10-тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробенз(а)пирен и г-7,т-8,т-9,т-10-тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробенз(а)пирен.

**Результаты и их обсуждение.** Основные загрязнители окружающей среды, в том числе полициклические ароматические углеводороды, типичным представителем которых является бенз(а)пирен, окисляются изоформами CYP1A1 и CYP1B1. Эти ферменты индуцибельны, и их уровень увеличивается при введении субстратов окисления, таких как ПАУ, хлорированные диоксины и др. К классическим индукторам монооксигеназ относится 20-MX, который вводился в клеточную культуру в настоящей работе. Его присутствие не мешает проведению анализа 7,8-дигидрокси-7,8-дигидробензо(а)пирена и продуктов его дальнейшего окисления в раковой клеточной линии A549, с одной стороны, и хорошо моделирует индукцию, вызываемую ПАУ, с другой. На первом этапе работы было проанализировано 40 образцов кДНК, полученных из раковой клеточной линии A549. С каждым образцом была проведена постановка ПЦР в режиме реального времени в дублях. В качестве генов-мишеней использовали CYP1B1, CYP1A1 и CYP1A2. Нормализация данных проведена по целевому гену – CYP1A2, а ее результаты представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Результаты оценки уровня экспрессии целевых генов

Ген	Интактные клетки	Индукция 20-MX
<i>GAPDH</i>	1,0	1,83
<i>CYP1B1</i>	1,0	1,05
<i>CYP1A1</i>	1,0	1,52

Как видно из данных табл. 1, 20-MX приводит к некоторому повышению уровня экспрессии в клетках генов изоэнзимов цитохрома P450, играющих важную роль в биоактивации ПАУ. Полученные нами данные хорошо согласуются с результатами работ [8; 11; 12], где также в клеточной линии A549 зарегистрировано небольшое, но все же достоверное увеличение уровня экспрессии генов CYP1A1 и CYP1B1.

Следующим этапом нашей работы стала оценка монооксигеназной составляющей в трансформации ключевого соединения в процессе канцерогенной активации бензо(а)пирена – Б[а]П-7,8-диола в стандартно культивируемой опухолевой клеточной культуре и при ее экспонировании действием 20-MX. Для этого определено количество израсходованного субстрата и содержание обоих продуктов его монооксигеназного окисления – ДЭ2 и ДЭ1. Полученные данные представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Оценка количества израсходованного Б[а]П-7,8-диола и продуктов его монооксигеназного окисления, нмоль

Наименование	Стандартные условия культивирования	Экспонирование 20-MX
Б[а]П-7,8-диол	8,62	11,93
ДЭ1	0,18	0,32
ДЭ2	0,83	2,58

Как видно из табл. 2, использование индуктора приводит к увеличению каталитической активности исследуемой системы. Причем действие индуктора, в первую очередь, проявляется в отношении каталитической активности CYP в клетках A549. Так, практически трехкратное увеличение содержания ДЭ1 и ДЭ2 наблюдается на фоне лишь полуторакратного повышения уровня экспрессии гена CYP1A1.

Вклад монооксигеназного процесса в биотрансформацию Б(а)П-7,8-диола в условиях нашего эксперимента в стандартно культивируемой клеточной культуре A549 составляет лишь 13 %, что в принципе согласуется с относительно низким уровнем конститутивной экспрессии CYP1A1 и CYP1B1 и высокой активностью изоэнзимов AKR1C1–AKR1C3 семейства альдо-кето редуктаз [5]. Картина существенно меняется при экспонировании клеток действием 20-МХ. Из данных табл. 2 видно, что в этом случае монооксигеназная составляющая в канцерогенной активации 7,8-Б[а]П-диола достигает уже 25 %. Обращает на себя внимание, что эпоксирирование Б[а]П-7,8-диола приводит к преимущественному образованию ДЭ2, содержание которого практически в 5 раз превышает таковое ДЭ1 в отсутствие 20-МХ и более чем в 8 раз в его присутствии. Напомним, что именно диолэпоксид-2 относят к так называемым полным канцерогенам, способным участвовать как в стадии инициации, так и промоции опухолевого процесса, а 20-МХ является полициклическим ароматическим соединением и наряду с бензо(а)пиреном входит в состав табачного дыма [8].

Считается, что в органах и тканях с высоким уровнем конститутивной экспрессии семейства альдо-кето редуктаз именно последним может принадлежать основная роль в метаболической активации полициклических ароматических углеводородов [5]. Полученные нами данные указывают на необходимость учета комплексного характера влияния полициклических ароматических углеводородов на метаболические процессы, поскольку попадание в организм не одного, а целого пула таких соединений может существенным образом влиять как на уровень, так и, возможно, на направление канцерогенной активации отдельных представителей ПАУ.

### Литература

1. DeMontellano O., Paul R. // *Future Med. Chem.* 2013. Vol. 5(2). P. 213–228.
2. Пономаренко Т. М., Сычёв Д. А., Чикало А. О. и др. // *Фармакокинетика и Фармакодинамика.* 2012. № 1. С. 25–28.
3. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. *Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков.* М., 1981. – 239 с.
4. Кобляков В. А. *Цитохромы семейства Р-450 и их роль в активации проканцерогенов.* М., 1990. – 190 с.
5. Zhang Li, Jin Yi, Huang M., Penning T. M. // *Pharmacol.* 2012. Vol. 3. P. 1–12.
6. DeMontellano O., Paul R. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry.* 3d ed. New York, 2005.
7. Handschin C., Meyer U. // *Pharmacol. Rev.* 2003. Vol. 55. P. 649–673.
8. Conney A. H. // *Cancer Res.* 1982. Vol. 42. P. 4875–4917.
9. Foster K. A. // *Exp. Cell. Res.* 1998. Vol. 243. P. 359–366.
10. Livak K. J., Schmittgen T. D. // *Methods.* 2001. Vol. 25, N 4. P. 402–408.
11. Hitoshi K., Katoh M., Suzuki T. et al. // *Drug. Metab. Dispos.* 2012. Vol. 40, N 3. P. 579–587.
12. Tsuchiya Y., Nakajima M., Itoh S. et al. // *Toxicol. Sci.* 2003. Vol. 72. P. 253–259.

A. G. SYSA, O. V. PANIBRAT, A. S. BABENKO, P. S. SHABUNYA, S. A. FATYKHOVA, P. A. KISELEV

aliaksei.sysa@gmail.com

### COMPLEX NATURE OF THE INFLUENCE OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS ON THE METABOLIC PROCESSES AS AN IMPORTANT DETERMINANT OF THEIR CARCINOGENIC ACTIVATION

### Summary

In the article, the contribution of the monooxygenase component to the carcinogenic activation of a key procarcinogenic derivative of benzo(a)pyrene – 7,8-benzo(a)pyrenediol in lung adenocarcinoma cell line A549 was evaluated. It is shown that the contribution of the monooxygenase process under the experimental conditions in A549 cells is only 13%, which corresponds to a relatively low level of the constitutive expression of CYP1A1 and CYP1B1. The situation changes significantly when cells are exposed to 20-methylcholanthrene. In this case, the monooxygenase component in the carcinogenic activation of 7,8-benzo(a)pyrenediol has reached 25%. Moreover, 90% is accounted for a “complete” carcinogen – diolepoxide-2. As 20-methylcholanthrene is a polycyclic aromatic compound and exists with a benzo(a)pyrene in the tobacco smoke, this suggests that the entry into the body a whole pool of polycyclic aromatic hydrocarbons may significantly affect not only the level but also the direction of the carcinogenic PAH activation of individual compounds.