

**ВЛИЯНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ
НА ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ БЕНЗО[а]ПИРЕНА В МИКРОСОМАХ ПЕЧЕНИ КРЫС****Л.М. Поляков, Р.А. Князев, Н.В. Трифонова, М.В. Котова, Е.И. Соловьёва, А.В. Рябченко***НИИ биохимии ФГБНУ ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Представлены характеристики каталитической активности гидроксилирования бензо[а]пирена (Б[а]П) в микросомах печени крыс при использовании липопротеинов очень низкой (ЛПОНП), низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности в качестве транспортных форм Б[а]П. Целью исследования являлось изучение влияния ЛП-компонента комплексов ЛП-Б[а]П на скорость гидроксилирования Б[а]П в микросомах печени крыс. Исследования выполнены на микросомальной фракции печени крыс с использованием Б[а]П в качестве субстрата. Отдельные фракции ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП плазмы крови выделяли при помощи ультрацентрифугирования, интенсивность гидроксилирования определяли спектрофлуориметрически по активности арилгидрокарбонгидроксилазы. Анализ скорости гидроксилирования Б[а]П в свободной форме и в форме комплексов Б[а]П с различными фракциями ЛП показал, что арилгидрокарбонгидроксилазная активность снижается в комплексной форме Б[а]П с ЛП: для транспортной формы с ЛПВП – на 22 %, с ЛПОНП – на 30 %, с ЛПНП – на 52 %. Следует отметить, что во всех формах K_m для субстрата оставалась практически неизменной. Полученные величины V_{max} и K_m свидетельствуют, что ЛП-компонент в комплексах с Б[а]П может являться неконкурентным ингибитором гидроксилирования Б[а]П в микросомах печени крыс.

Ключевые слова: бензо[а]пирен, микросомы печени крыс, липопротеины плазмы крови.

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются распространенными антропогенными загрязнителями окружающей среды. Известно, что большинство ПАУ обладает мутагенными, канцерогенными и тератогенными свойствами. К ПАУ относится и полициклический ароматический углеводород бензо[а]пирен (Б[а]П), который образуется при неполном сгорании древесины, каменного угля, автомобильного топлива, пластика [1, 2], а также в процессе термической обработки пищи, включая жарку, копчение и т.д. [3]. Существует представление, что Б[а]П из плазмы крови легко проникает в клетки организма путем пассивной диффузии [4, 5]. Однако содержание в плазме

крови свободного Б[а]П не превышает 5 %, основная же часть связана с фракциями липопротеинов (ЛП) плазмы крови [6]. По нашим данным, более 80 % радиоактивности гидрофобных соединений (бензантрацен, Б[а]П) транспортируется ЛП плазмы крови [7]. Это может свидетельствовать о том, что в отличие от пассивной диффузии связанный с ЛП Б[а]П попадает в клетки посредством рецепторно-обусловленного эндоцитоза [8, 9].

Для проявления токсических и мутагенных свойств Б[а]П должен пройти внутриклеточную стадию метаболической активации с участием ферментной системы цитохромов Р-450 микросомального окисления, главным образом фер-

Поляков Лев Михайлович – д-р мед. наук, проф., руководитель лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: plm@niibch.ru

Князев Роман Александрович – канд. биол. наук, в.н.с., лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru

Трифопова Наталья Викторовна – м.н.с. лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: nataliya-tverdohleb@yandex.ru

Котова Мария Владимировна – м.н.с. лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: zerokiri@mail.ru

Соловьёва Елена Игоревна – м.н.с. лаборатории медицинской биотехнологий

Рябченко Александр Владимирович – канд. биол. наук, в.н.с. лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: borrelia@mail.ru

ментов семейства CYP1 (CYP1A2, CYP1A1 и CYP1B1), в результате которого из малотоксичного B[a]П образуются химически активные реакционные дигидродиолэпоксиды [10, 11]. Образующиеся метаболиты B[a]П ковалентно взаимодействуют с белками и нуклеиновыми кислотами клетки, а уровень так называемых ДНК-аддуктов напрямую связан с риском развития злокачественных опухолей [10, 12]. Все вышеперечисленное привело нас к вопросу: может ли ЛП-компонент влиять на внутриклеточную стадию метаболической активации B[a]П с участием ферментов системы цитохромов P-450 микросомального окисления? В настоящей работе представлены различия в характеристиках каталитической активности гидроксирования B[a]П в микросомах печени крыс при использовании ЛП плазмы крови (ЛП очень низкой (ЛПОНП), низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности) в качестве транспортных форм B[a]П.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали B[a]П в виде порошка фирмы Sigma-Aldrich. Маточный раствор B[a]П готовили в ацетонитриле (250 мг/л). Рабочие растворы B[a]П получали путем последовательных разведений в концентрации от 1000 до 100 мкг/л. Фракции ЛП из плазмы крови человека выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования в растворах KBr в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na₂ на центрифуге OptimaL-90K (Beckman-Coulter, Австрия) с использованием ротора 70.1Ti [13]. Получали три основные фракции ЛП: ЛПОНП ($0,94 < d < 1,006$ г/мл), ЛПНП ($1,006 < d < 1,063$ г/мл), ЛПВП ($1,063 < d < 1,21$ г/мл) и фракцию инфранатанта с плотностью более 1,21 г/мл.

Микросомальную фракцию получали методом дифференциального центрифугирования из гомогенатов печени крыс в буферном растворе, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 7,4, 125 мМ KCl, при температуре 4 °C [14]. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, супернатант собирали, центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин для осаждения ядер и митохондрий. Полученные супернатанты центрифугировали при 100000 g в течение 60 мин при 4 °C, микросомальный осадок дважды промывали 5 мл буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl, pH 7,4, 125 мМ KCl, при температуре 4 °C и ресуспендировали в 5 мл того же буфера.

Активность арилгидрокарбонгидроксилазы при использовании B[a]П в качестве субстрата в микросомах печени крыс измеряли по методу,

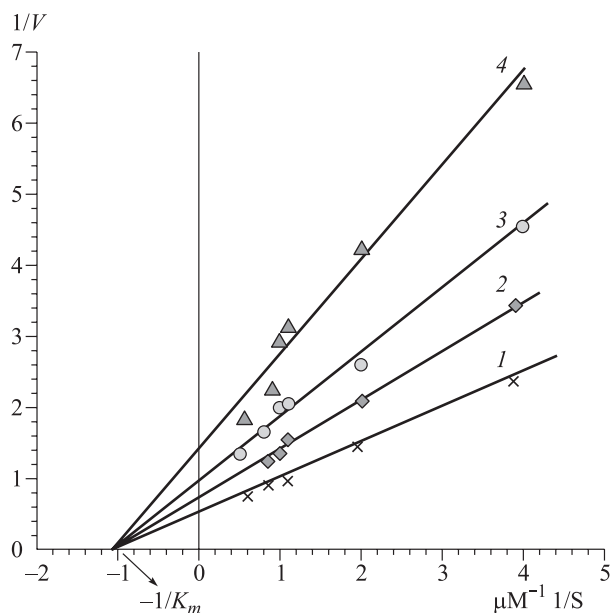
описанному J.B. Schenkman и I. Jansson [14]. Инкубационная смесь содержала (в общем объеме 3 мл) 50 мМ Трис-HCl-буфер (pH 7,5), 3 мМ MgCl₂, микросомный белок в концентрации 20 мкг/мл и B[a]П в концентрации от 1,0 до 5,0 мМ. Смесь предынкубировали в течение 1 мин при 37 °C, затем запускали реакцию быстрым добавлением 0,5 мМ НАДФН, через 1 мин (при постоянном помешивании) реакцию останавливали быстрым добавлением смеси, содержащей 10 % Тритона X-100, 1 % ЭДТА и 1 н NaOH. Данная смесь солюбилизирует микросомный материал и дает возможность регистрировать образовавшийся 3-ОН-B[a]П, имеющих в щелочной среде характерный спектр флуоресценции ($\lambda_{ex} = 396$ нм, $\lambda_{em} = 522$ нм).

Максимальную скорость гидроксирования (V_{max}) и константу Михаэлиса (K_m) в препаратах микросом при добавлении в качестве субстрата одного «свободного» B[a]П или B[a]П в составе комплексов с ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП определяли с использованием графических данных в координатах Лайнуивера–Бэрка, когда арилгидрокарбонгидроксилазная активность (пмоль 3-ОН-B[a]П в 1 мин на 1 мл), выраженная в обратных величинах на оси ординат, откладывается против обратной концентрации B[a]П на оси абсцисс. В качестве стандарта использовали 3-ОН-B[a]П (Fluka AG, Швейцария). Измерения проводили на флуоресцентном спектрофлуориметре RF-5301PC (Shimadzu, Япония).

Работа выполнена с соблюдением стандартов гуманной работы с животными в соответствии с положениями Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей, и одобрена Этической комиссией НИИ биохимии ФГБНУ ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке представлены характеристики каталитической активности гидроксирования B[a]П цитохромами P-450 при добавлении его к микросомальной фракции печени крыс в свободной форме и в составе комплексов с ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП. Из представленных на рисунке данных рассчитаны величины скорости (V_{max}) гидроксирования B[a]П в комплексах с фракциями ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП по сравнению с гидроксированием B[a]П в свободном состоянии, которые составили $190 \pm 8,7$, $125 \pm 7,4$, $230 \pm 8,9$ и $260 \pm 10,1$ пМ/мг микросомального белка в мин соответственно.



Определение K_m и V_{max} для процесса гидроксилирования Б[а]П в свободном состоянии (1) и в комплексах с ЛПВП (2), ЛПОНП (3) и ЛПНП (4); S — концентрация добавленного БП (мкМ⁻¹), V — скорость образования 3-ОН-БП (пМ/мг микросомального белка в мин)

Полученные результаты свидетельствуют, что скорость гидроксилирования Б[а]П в составе комплексов со всеми тремя фракциями ЛП была значительно меньше скорости гидроксилирования «свободного» Б[а]П. Однако если для комплексов Б[а]П с фракцией ЛПВП снижение было не столь резко выраженным (на 22 %), то для комплексов Б[а]П с фракцией ЛПОНП оно составило 30 %. Обращает на себя внимание то, что наибольшее уменьшение скорости гидроксилирования Б[а]П обнаружено для его комплексов с фракцией ЛПНП (52 %). Полученные для субстрата K_m и величины V_{max} свидетельствуют о том, что ЛП-компонент комплексов с Б[а]П может являться неконкурентным ингибитором гидроксилирования Б[а]П.

В литературе представлены данные, свидетельствующие об особенностях взаимодействия ЛП с Б[а]П и с его гидроксилированными производными, в частности 3-ОН-Б[а]П и Б[а]П-7,8-дигидродиолом, значительно различающимися по степени липофильности [6]. Оказалось, что связывание Б[а]П с ЛП положительно коррелирует с общим липидным объемом, но с увеличением степени гидроксилирования производных Б[а]П связывание их в расчете на общий объем липидного компонента ЛП уменьшается. При этом

наиболее обогащенные белком ЛПВП поглощали 3-ОН-Б[а]П в значительно большей степени, чем негидроксилированный Б[а]П. Это означает, что помимо растворимости в липидах существуют факторы, влияющие на связывание Б[а]П и его липофильных метаболитов с ЛП плазмы крови. Одним из таких факторов может быть белковый компонент ЛП, в частности, аполипопротеин В, роль которого в связывании и транспорте Б[а]П была продемонстрирована нами ранее [15].

В этой связи следует сказать и об участии печеночных ЛП, хотя и несколько отличающихся от ЛП плазмы, во внутриклеточном транспорте Б[а]П [16]. Инкубация *in vitro* комплексов ³H-Б[а]П-ЛП с выделенным рецептором ароматических углеводородов AhR и белком 4S продемонстрировала перенос лиганда на AhR. В целом эти результаты подтверждают роль ЛП-структур во внутриклеточном транспорте и метаболических превращениях гидрофобных ксенобиотиков типа Б[а]П. Кроме того, появились данные, свидетельствующие о непосредственном влиянии самого Б[а]П на липидный обмен через воздействие на метаболизм ЛП, в частности, путем ингибирования экспрессии мРНК рецепторов ЛПНП, липолиз-стимулирующего рецептора и АТФ-связанного рецептора ABCA1 в печени [17]. Все вышесказанное привело нас к вопросу: может ли ЛП-компонент комплексов ЛП-Б[а]П изменять внутриклеточную стадию метаболической активации Б[а]П с участием ферментов системы цитохромов Р-450 микросомального окисления? Выполненное исследование показало, что арилгидрокарбонгидроксилазная активность снижается в комплексной форме Б[а]П с ЛП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Присутствие в инкубационной среде комплексов Б[а]П с ЛП-фракциями (ЛПОНП, ЛПВП, ЛПНП) сопровождалось снижением скорости метаболизма Б[а]П, при этом K_m для субстрата была неизменной, что, по всей видимости, может отражать факт проявления неконкурентного ингибирования процесса гидроксилирования Б[а]П. Полученные в настоящей работе результаты требуют объяснения и дальнейших исследований в данном направлении. Участие ЛП и их белковых компонентов во внутриклеточном транспорте и метаболизме Б[а]П и других липофильных ПАУ позволяет расширить представление о механизмах регуляции ферментов микросомальной системы окис-

ления, а также глубже понять патогенетические механизмы возникновения и развития химически индуцированных опухолей.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019–2020 годы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Saikia J., Khare P., Saikia P., Saikia B.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) around tea processing industries using high-sulfur coals. *Environ. Geochem. Health*, 2017; 39 (5): 1101–1116. doi: 10.1007/s10653-016-9879-0
2. Li Y.C., Qiu J.Q., Shu M., Ho S.S.H., Cao J.J., Wang G.H., Wang X.X., Zhao X.Q. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2018; 25 (5): 4750–4760. doi: 10.1007/s11356-017-0603-0
3. Moffat I., Chepelev N., Labib S., Bourdon-Lacombe J., Kuo B., Buick J.K., Lemieux F., Williams A., Halapanavar S., Malik A., Luijten M., Aubrecht J., Hyde D.R., Fornace A.J. Jr, Swartz C.D., Recio L., Yauk C.L. Comparison of toxicogenomics and traditional approaches to inform mode of action and points of departure in human health risk assessment of benzo[a]pyrene in drinking water. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2015; 45 (1): 1–43. doi: 10.3109/10408444.2014.973934
4. Castelli F., Librando V., Sarpietro M.G. Calorimetric approach of the interaction and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons with model membranes. *Environ. Sci. Technol.*, 2002; 36: 2717–2723. doi: 10.1021/es010260w
5. Verma N., Pink M., Boland S., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S. Benzo[a]pyrene-induced metabolic shift from glycolysis to pentose phosphate pathway in the human bladder cancer cell line RT4. *Sci. Rep.*, 2017; 7 (1): 9773. doi: 10.1038/s41598-017-09936-1
6. Shu H.P., Bymun E.N. Systemic excretion of benzo(a)pyrene in the control and microsomally induced rat: the influence of plasma lipoproteins and albumin as carrier molecules. *Cancer Res.* 1983; 43 (2): 485–490.
7. Поляков Л.М., Князев Р.А., Рябченко А.В., Котова М.В., Трифонова Н.В. Липопротеины крови как платформа для транспорта гидрофильных и гидрофобных соединений. *Сиб. науч. мед. журн.*, 2019; 39 (4): 30–36. doi: 10.15372/SSMJ20190404
8. Busbee D.L., Norman J.O., Ziprin R.L. Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Arch. Toxicol.*, 1990; 64: 285–290. doi: 10.1007/bf01972988
9. Brown M.S., Goldstein J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 1997; 89: 331–340. doi: 10.1038/41672
10. Kazuhiro S., Kawanishi M., Yagi T. Modulation of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor. *Genes Environ.*, 2017; 39: 14. doi: 10.1186/s41021-017-0076-x
11. Uppstad H., Ovrebø S., Haugen A., Møllerup S. Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicol. Lett.*, 2010; 192 (2): 221–228. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.10.025
12. Reed L., Jarvis I.W., Phillips D.H., Arlt V.M. Enhanced DNA adduct formation by benzo[a]pyrene in human liver cells lacking cytochrome P450 oxidoreductase. *Mutat. Res.*, 2020; 852: 503162. doi: 10.1016/j.mrgentox
13. Hatch F.T., Lees R.S. Practical method for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res.*, 1968; 6: 2–68.
14. Schenkman J.B., Jansson I. Measurement of cytochrome P-450. *Curr. Protoc. Toxicol.*, 2002; Chapter 4: Unit 4.1. doi: 10.1002/0471140856.tx0401s13
15. Polyakov L.M., Chasovskikh M.I., Panin L.E. Binding and treatment of benzo(a)pyrene by blood plasma lipoproteins: The possible role of apolipoprotein B in this process. *Bioconjug. Chem.*, 1996; 7 (4): 396–400. doi: 10.1021/bc960005e
16. Souès S., Fernandez N., Souverain P., Lesca P. Intracellular lipoproteins as carriers for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benzo(a)pyrene in rat and mouse liver. *Biochem Pharmacol.*, 1989; 38 (17): 2841–2847. doi: 10.1016/0006-2952(89)90439-5
17. Layeghkhavidaki H., Marie-Claire Lanheris M.-C., Akbar S., Lynn G.-P., Thierry O., Grova N., Appenzeller B., Jasiewicz J., Feidt C., Corbier C., Yen F.T. Inhibitory action of benzo[a]pyrene on hepatic lipoprotein receptors in vitro and on liver lipid homeostasis in mice. *PLoS One*, 2014; 9 (7): e102991. doi: 10.1371/journal.pone.0102991

EFFECT OF BLOOD PLASMA LIPOPROTEINS ON HYDROXYLATION OF BENZO[a]PYRENE IN LIVER MICROSOMES OF RATS

L.M. Polyakov, R.A. Knyazev, N.V. Trifonova, M.V. Kotova, E.I. Solovyova, A.V. Ryabchenko

Research Institute of Biochemistry of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

This work presents the characteristics of the catalytic activity of hydroxylation of benzo[a]pyrene (B[a]P) in rat liver microsomes using plasma lipoproteins (LP) (VLDL, LDL, HDL) as transport forms of B[a]P. The aim of the study was: to study the effect of the LP-component of the LP-B[a]P complexes on the rate of B[a]P hydroxylation in rat liver microsomes. The studies were carried out on the microsomal fraction of rat liver using B[a]P as a substrate, ultracentrifugation of

individual fractions of VLDL, LDL, HDL plasma, and spectrofluorimetric determination of the activity of arylhydrocarbonhydroxylase. In work on microsomes of rat liver the rate of hydroxylation of B[a]P in free form and in the form of B[a]P complexes with various fractions of LP was analyzed. The analysis showed that the arylhydrocarbonhydroxylase activity (pmol 3-OH-B[a]P in 1 min per 1 mg of protein) decreases in the complex form B[a]P with LP. So for transport form B[a]P with HDL the decrease was by 22%, for transport form B[a]P with VLDL the decrease was 30%, and for transport form B[a]P with LDL it was 52%. It should be noted that K_m for the substrate remained practically unchanged in all forms. The V_{max} and K_m values indicate that the LP component in complexes with B[a]P can be a noncompetitive inhibitor of B[a]P hydroxylation in rat liver microsomes.

Keywords: benzo[a]pyrene, rat liver microsomes, blood plasma lipoproteins

*Статья поступила 11 ноября 2020 г.
Принята к печати 25 ноября 2020 г.*