

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

Выходит шесть номеров в год

Журнал основан в июле 1957 года

МИНСК, БЕЛОРУССКАЯ НАУКА, 2014, ТОМ 58, № 1

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Редакционная коллегия:

М. В. Мясникович (главный редактор),
А. М. Русецкий (заместитель главного редактора),
С. Я. Килин (заместитель главного редактора),
И. М. Богдевич, Н. А. Борисевич, Г. А. Василевич, П. А. Витязь,
И. Д. Волоотовский, И. В. Гайшун, В. Г. Гусаков, И. В. Залуцкий, О. А. Ивашкевич,
Н. А. Изобов, А. Ф. Ильющенко, Н. С. Казак, А. А. Коваленя,
Ф. Ф. Комаров, И. В. Котляров, В. А. Лабунов, Ф. А. Лахвич, О. Н. Левко,
А. И. Лесникович, В. Ф. Логинов, А. А. Махнач, А. А. Михалевич, П. Г. Никитенко,
О. Г. Пенязьков, Ю. М. Плескачевский, А. Ф. Смеянович, Л. М. Томильчик,
В. М. Федосюк, Л. В. Хотылева, С. А. Чижики, И. П. Шейко

Адрес редакции:

220072, Минск, ул. Академическая, 1, к. 119,
тел. 284-19-19

<http://nasb.gov.by/rus/publications/dan/>

E-mail: doklady@open.by

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕМАТИКА

Мурашко В. И. Свойства класса конечных групп с R -субнормальными циклическими примарными подгруппами	5
Милованов М. В., Медведева О. Г. Применение методов группового анализа к изучению обобщенных цепочек Тоды с двумя экспонентами	9
Картынный Ю. А., Орлович Ю. Л. Доминантно-треугольные графы и графы верхних границ	16
Бударина Н. В., Бересневич В. В., Берник В. И. Совместные диофантовы приближения с немонотонной правой частью	26
Гайшун И. В. Дифференциальные уравнения над кольцом функций на множестве гомоморфизмов дифференциального кольца в кольцо констант	31

ФИЗИКА

Томильчик Л. М. Масштабная неинвариантность в конформной геометрии и ее возможные проявления	34
---	----

Степанов В. П., Могилевцев Д. С., Малоштан А. С., Килин С. Я. Классический разделитель пучка для одиночных фотонов и управление спонтанным излучением с помощью перепутывания	43
Сытова С. Н. Влияние внешних условий на хаос в объемных лазерах на свободных электронах	47
ХИМИЯ	
Сыса А. Г., Панибрат О. В., Бабенко А. С., Шабуня П. С., Фатыхова С. А., Киселев П. А. Комплексный характер влияния полициклических ароматических углеводородов на метаболические процессы как важный фактор, определяющий особенности их канцерогенной активации	53
Алмодарресие Х. А., Шахаб С. Н., Филиппович Л. Н., Арико Н. Г., Агабеков В. Е. Получение и оптические свойства широкополосных поливинилспиртовых пленок, окрашенных смесью дихроичных красителей	57
Рахманько Е. М., Слепцова Н. Н., Гулевич А. Л., Цыганов А. Р. Бромидная функция пленочного электрода на основе тринонилоктадециламмония тетрабромомолибдата	62
Гарбуз О. С., Дубовская Л. В., Свиридов О. В. Новый реагент для мечения белков ионами редкоземельных металлов	68
Боборико Н. Е., Бобриков И. А., Мычко Д. И., Каркоцкий Г. Ф. Синтез и структура газочувствительных композитных материалов TiO_2-MoO_3	75
Башкиров Л. А., Кандидатова И. Н., Першукевич П. П. Сенсибилизирующее воздействие ионов хрома (III) на фотолюминесценцию активированного ионами празеодима люминофора на основе индита лантана	81
БИОЛОГИЯ	
Семенченко В. П., Сушеня Л. М. Влияние нагонных явлений и перемешивания водных масс на содержание биогенных элементов в литоральной зоне слабоэвтрофного озера	85
Валентович Л. Н., Лозюк С. К., Коломиец Э. И., Титок М. А. Молекулярно-генетическая идентификация биотехнологически значимых бактерий рода <i>Bacillus</i>	89
Панкратов В. С., Кушнеревич Е. И., Давыденко О. Г. Полиморфизм маркеров Y-хромосомы в популяции белорусских татар	94
ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ	
Витязь П. А., Хейфец М. Л., Колмаков А. Г., Зверев А. А., Кобелева Л. И. Мультифрактальный анализ строения структур и вейвлет-анализ рельефа поверхности трения композиционного материала	101
СОЦИАЛЬНО-ГУМАНИТАРНЫЕ НАУКИ	
Бабосов Е. М. Взаимосвязь фундаментальных и прикладных исследований в сфере гуманитарного знания как условие формирования перспективных направлений	109
Віцязь С. П. Праблема арэала прусаў: гістарыяграфічны вызначэнні	114

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ. 2014. Т. 58, № 1

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 387 от 18.05.2009.

Редактор Т. П. Петрович
Компьютерная верстка Н. И. Кашуба

Сдано в набор 12.02.2014. Выпуск в свет 25.02.2014. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 138 экз. Заказ 27.

Цена номера: индивидуальная подписка – 48 650 руб.; ведомственная подписка – 117 945 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/18
от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск.

© «Издательский дом «Беларуская навука».
Доклады НАН Беларуси, 2014

ХИМИЯ

УДК 577.152.1:547.681

А. Г. СЫСА¹, О. В. ПАНИБРАТ¹, А. С. БАБЕНКО², П. С. ШАБУНЯ¹,
С. А. ФАТЫХОВА¹, П. А. КИСЕЛЕВ¹

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

(Представлено членом-корреспондентом С. А. Усановым)

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

²РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Александрова

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 (СYP). 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 СYP, 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-7,8-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 % CO₂. 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 (ЛОМО, 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» (Амплисенс, 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 MgCl₂ 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 действию 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 СYP 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 действию 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.