

ISSN 0002-3590

ВЕСТИ



НАЦЫЯНАЛЬнай
АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ
СЕРИЯ ХИМИЧЕСКИХ НАУК

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY
OF SCIENCES OF BELARUS
CHEMICAL SERIES

3

Мінск
«Беларуская навука»
2014

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК 2014 № 3

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ ХИМИЧЕСКИХ НАУК 2014 № 3

ЗАСНАВАЛЬНИК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 1965 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

ЗМЕСТ

НЕАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

- У Цзэ, Башкиров Л. А., Слонская С. В., Труханов С. В., Лобановский Л. С., Галяс А. И. Магнитные свойства высококоэрцитивных ферритов $Sr_{1-x}Gd_xFe_{12-x}Co_xO_{19}$ ($0 \leq x \leq 0,5$) 5
- Мальтанова А. М., Воробьёва Т. Н., Веретенникова Е. А., Врублевская О. Н. Электрохимическое осаждение сплава Au–Sn из этиленгликолевых электролитов 10
- Кузьменков Д. М., Сакович А. А. Получение $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ и перекристаллизация его в $\alpha-CaSO_4 \cdot 0,5H_2O$ 18

КАЛОЇДНАЯ ХІМІЯ

- Комаров В. С., Бесараб С. В., Кузнецова Т. Ф. Темплатный метод регулирования структуры природных алюмосиликатов 22

ФІЗІЧНАЯ ХІМІЯ

- Володин А. Ю., Потапова Л. Л., Черчес Б. Х., Егизаров Ю. Г. Природа действия катализаторов на основе волокнистых ионитов в процессе дезоксигенации воды 26
- Утенкова Д. Б., Сидоренко А. Ю., Сеньков Г. М., Агабеков В. Е. Изомеризация компонентов скипидара на кислотно-модифицированном глауконите 35
- Иванец А. И., Воронец Е. А. Влияние Mn-оксидных прекурсоров на физико-химические свойства нанесенных катализаторов 41
- Михедова Е. В., Яскельчик В. В., Черник А. А., Жарский И. М. Электрохимическое осаждение желтой латуни в условиях импульсного электролиза 48

АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Хлебус М.В., Рубинов Д.Б., Лахвич Ф.А. Синтез этоксииминопроизводных 2-ацилциклогексан-1,3-дионов с фталимидным заместителем в ацильной цепи	53
Божок Т.С., Калининченко Е.Н. Синтез фторсодержащих аналогов 5-азацитидина	60
Басалаева Л.И., Тарасевич В.А., Лонг Ф.К., Хыонг Л.Т.М., Кыонг Н.М., Чинь Л.В., Трыонг В.В. Синтез и свойства новых азотсодержащих производных зерумбона	66
Татульченко М.Ю., Набиуллин А.Р., Квач М.В. Амидофосфитный реагент и твердофазный носитель для синтеза 5'- и 3'-фосфорилированных олигонуклеотидов	70

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Сыса А.Г., Панибрат О.В., Бабенко А.С., Шабуна П.С., Фатыхова С.А., Киселев П.А. Оценка уровня экспрессии и каталитической активности изоэнзимов цитохрома P450 в опухолевой клеточной линии A549 ..	74
--	----

ХІМІЯ ВЫСОКАМАЛЕКУЛЯРНЫХ ЗЛУЧЭННЯЎ

Плиско Т.В., Бильдюкевич А.В. Влияние концентрации многостенных углеродных нанотрубок на структуру и транспортные свойства капиллярных мембран из полисульфона	80
Костюченко М.А., Ревяко М.М. Термоокислительная деструкция и горение полимерных композиций на основе полиамида 6	89

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

Крутько Н.П., Яковец Н.В., Опанасенко О.Н., Юсевич А.И., Малевич Н.Н. Влияние ПАВ на термокрекинг тяжелого нефтяного сырья	94
Чердиченко Д.В., Воробьев П.Д., Крутько Н.П., Регино А.В., Воробьева Е.В. Методы оценки эффективности ингибиторов коррозии для систем оборотного водоснабжения	99
Бобкова Н.М., Гурин В.С., Трусова Е.Е. Получение и исследование фотокаталитических свойств $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$ композитов для очистки воды от органических загрязнителей	106
Готто З.А., Шевчук В.В., Можейко Ф.Ф., Островский Л.К. Активация фосфоритной муки путем частичного разложения минеральных кислот	110

ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ

Анатолий Викторович Кудельский (К 80-летию со дня рождения)	117
Олег Анатольевич Ивашкевич (К 60-летию со дня рождения)	122

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2014 №3

Серия химических наук

на русском, белорусском и английском языках

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации №390 от 18.05.2009

Тэхнічны рэдактар В. А. Тоўстая

Камп'ютэрная вёрстка А. У. Новік

Здадзена ў набор 28.07.2014. Падпісана ў друк 22.08.2014. Выхад у свет 28.08.2014. Фармат $60 \times 84 \frac{1}{8}$.

Папера афсетная. Друк лічбавы. Ум. друк. арк. 14,88. Ул.-выд. арк. 16,4. Тыраж 72 экз. Заказ 147.

Кошт нумару: індывідуальная падпіска – 58 650 руб., ведамасная падпіска – 141 919 руб.

Выдавец і паліграфічнае выкананне:

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецкі дом «Беларуская навука». Пасведчанне аб дзяржаўнай рэгістрацыі выдаўца, вытворцы, распаўсюджвальніка друкаваных выданняў № 1/18 ад 02.08.2013.

ЛП №02330/455 ад 30.12.2013. Вул. Ф. Скарыны, 40, 220141, Мінск.

© Выдавецкі дом «Беларуская навука».
Весці НАН Беларусі. Серыя хімічных навук, 2014

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

УДК 577.152.1:547.681

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

**ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ И КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ИЗОЭНЗИМОВ ЦИТОХРОМА P450 В ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ A549**

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси

²РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова МЗ Беларуси

(Поступила в редакцию 18.02.2014)

Введение. Большинство органических ксенобиотиков, включая лекарственные вещества и экотоксиканты, для проявления своего биологического эффекта нуждаются в метаболической активации [1–4]. Активация реализуется по трем основным путям [5]. Два из них обусловлены пероксидазной и монооксигеназной активностью изоэнзимов цитохрома P-450 (CYP). В третьем случае основная роль принадлежит семейству альдо-кеторедуктаз. У человека выявлено 57 изоформ CYP с различной, иногда перекрывающейся, субстратной специфичностью и разным механизмом регуляции экспрессии генов [6]. В частности, экспрессия CYP является чувствительной к различным воздействиям. Так, некоторые ксенобиотики вызывают усиление экспрессии генов тех CYP, которые их окисляют (эффект субстратной индукции) [3,7]. 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.

В связи с этим особый интерес вызывает содержание и каталитическая активность изоформ CYP, локализованных в легких человека, поскольку значительная часть загрязнителей окружающей среды поступает в организм посредством ингаляции и претерпевает окислительную трансформацию непосредственно в этом органе. Проведенные эпидемиологические исследования показали наличие в легочной ткани человека мРНК ряда изоэнзимов CYP [8,9]. Причем во всех образцах уровень представленности транскриптов CYP1B1, 2B6, 2C9 и 2E1 был наиболее высоким. Несколько более низким, но достоверно регистрируемым было содержание мРНК для CYP1A1, CYP3A4, CYP3A5 и CYP2D6. А вот возможность экспрессии CYP1A2, CYP2A6 и CYP2A13 была обнаружена лишь у некоторых доноров [9]. Еще сложнее дело обстоит с определением уровня и профиля метаболической активности, поскольку данные полученные в экспериментах на животных, а также с использованием субклеточных структур (например, микросомальной фракции клеток легких) в силу разных причин не всегда в полной мере способны отражать окислительно-восстановительные процессы, проходящие в легких человека. Не вызывает сомнения, что наиболее компетентной моделью являются клетки, выделенные из легочной ткани человека. Однако их применение осложнено трудностями получения, культивирования и сохранения в функционально активном состоянии. Более удобной моделью являются опухолевые клеточные линии, в частности A549, полученная из пневмоцитов II типа. Действительно, морфология и функциональные свойства A549, в том числе синтез сурфактантов, окислительный метаболизм, транспортные свойства, близки к таковым легочных эпителиальных клеток II типа [10]. Вместе с тем, несмотря на широкое применение этой клеточной линии для характеристики многих протекаю-

щих в легких процессов, ряд аспектов, например связанных с окислительным метаболизмом, остаются далеко не ясными. В частности, весьма противоречивыми являются данные об уровнях экспрессии и индуцибельности изоэнзимов CYP [9, 10–12].

Более того, в силу относительно невысокого уровня экспрессии изоэнзимов семейства CYP высказывается даже мнение о малой пригодности клеточной линии A549 для оценки биологического потенциала эндогенных и экзогенных веществ, обусловленного их окислительной трансформацией [9,13]. Укажем также, что каталитическая активность, например семейства CYP1, в основном охарактеризована с использованием модельных субстратов в первую очередь эфиров резорфина и кумарина, что в неполной мере отражает значительно более сложный профиль метаболитов таких загрязнителей окружающей среды, как полициклические ароматические соединения, в превращении которых в канцерогены принимают участие эти ферменты [14–16].

Поэтому цель настоящей работы – оценка вклада монооксигеназной составляющей в канцерогенную активацию 7,8-дигидрокси-7,8-дигидробензо[а]пирена (Б[а]П-7,8-диол) в раковой клеточной линии A549, а также характеристика влияния на процесс классического индуктора монооксигеназ – 20-метилхолантрена (20-МХ).

Материалы и методы исследования. Культивирование клеточной культуры. В работе монослойную клеточную культуру A549 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).

Индукция монооксигеназной активности в клеточной линии A549. Для индукции использовали раствор 20-МХ в диметилсульфоксиде (концентрация маточного раствора 20-МХ 3,0 мМ). При 70–80 % 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.

Выделение РНК. Общую фракцию РНК выделяли с использованием набора реагентов «РНК-ВТК» (Институт биоорганической химии (ИБОХ) 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.

Обратная транскрипция. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реагентов «РЕВЕРТА» (Амплисенс, Россия), согласно протоколу производителя.

Конструирование праймеров. Специфические олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно меченые TaqMan зонды для амплификации *CYP1B1*, *CYP1A1*, *CYP1A2* были сконструированы с помощью программного обеспечения ABI Primer Express (version 3.0), а затем синтезированы и методом ВЭЖХ очищены ОДО «Праймтех» (Беларусь). Информация о нуклеотидных последовательностях праймеров и зондов представлена в табл. 1.

Положительный контроль ПЦР и калибровочные пробы. 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 ИБОХ НАН Беларуси.

ПЦР в режиме реального времени. Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали амплификатор Applied Biosystems 7500 (США). Реакция протекала в инкубационной среде объемом 25 мкл, содержащей ~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-НCl, 2 мМ MgCl₂ и 1,25 МЕ Taq ДНК-полимеразы (ИБОХ НАН Беларуси). ПЦР состояла из первичной денатурации ДНК при +95 °С в течение 5 мин и 45 циклов

Т а б л и ц а 1. Основная информация о специфических олигонуклеотидных праймерах и флуоресцентно-меченых зондах

Название	Последовательность
1B1_F	5-CACCAGGTATCCTGATGTGC-3
1B1_R	5-AAATACTTCGGTACGCGAAG-3
1B1_PR (FAM-BHQ1)	5-CGAGTGCAGGCAGAAATTGGATCAGGTCGTGG-3
1A1_F	5-CCTTTGAGAAGGGCCACATC-3
1A1_R	5-CATCCAGCTGCTTCTCCTGAC-3
1A1_PR (FAM-BHQ1)	5-ACATCACAGACAGCCTGATTGAGC-3
1A2_F	5-GGACTTTGACAAGAACAGTGTCC-3
1A2_R	5-CGCTGGCTCTAGGCCCTTC-3
1A2_PR (FAM-BHQ1)	5-GACATCACGGGTGCCCTGTTCAAGC-3

амплификации, проводимых при следующих условиях: денатурация при +95°C в течение 10 с, отжиг праймеров и синтез ДНК при +60 °С в течение 60 с. Измерение флуоресценции образца проводили 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. Оценку уровня экспрессии генов проводили с помощью метода $\Delta\Delta C_p$ [17]. Сырые данные ПЦР в режиме реального времени были проанализированы с помощью программного пакета OriginProv.8.6.0. Значение верхнего максимума второй производной кривой флуоресценции принимали за C_p .

Определение каталитической активности цитохрома P450 в клеточной культуре по отношению к B[a]П-7,8-диолу. Ферментативную реакцию проводили во флаконе (2,0 млн клеток) в 2 мл питательной смеси, содержащей B[a]П-7,8-диол. Начальная концентрация субстрата 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.

ВЭЖХ-анализ продуктов биотрансформации B[a]П-7,8-диола. Хроматографический анализ проводился на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с флуоресцентным детектором FLD G1321A. Была использована колонка Zorbax EclipseplusC18 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. Использовали 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 % В следующие 15 мин. Общее время анализа – 30 мин.

Определение концентрации продуктов реакции осуществляли на базе калибровки, построенной по стандартным образцам тетрагидроксипроизводных бензо[а]пирена (B[a]П). Содержание г-7,т-8-дигидрокси-с-9,10-эпокси-7,8,9,10-тетрагидро-бензо[а]пирена (ДЭ1) рассчитывали как сумму концентраций г-7,т-8-с-9,с-10-тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирена и г-7,т-8-с-9,т-10-тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирена. Для г-7,т-8-дигидрокси-т-9,10-эпокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирена (ДЭ2) характеристичными тетролами были г-7,т-8,т-9,с-10-тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирен и г-7,т-8,т-9,т-10-тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирен.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета SPSS 21.

Результаты исследований. Основные загрязнители окружающей среды, в том числе полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), типичным представителем которых является B[a]П, 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-МХ, который вводился в клеточную культуру в настоящей работе. Его присутствие не мешает проведению анализа Б[а]П-7,8-диола и продуктов его дальнейшего окисления в раковой клеточной линии А549, с одной стороны, и хорошо моделирует индукцию, вызываемую ПАУ, – с другой. На первом этапе в рамках выполнения экспериментальной работы было проанализировано 40 образцов кДНК, полученных из раковой клеточной линии А549. С каждым образцом была проведена ПЦР в режиме реального времени в дублях. В качестве генов-мишеней использовали *CYP1B1* и *CYP1A1*. В качестве референсного гена использовали *CYP1A2*, так как известно, что в используемой нами клеточной культуре его экспрессия конститутивна и не индуцибельна [19]. В наших предварительных экспериментах он также показал высокую стабильность экспрессии. Изменения Ср гена *CYP1A2* в первой группе были практически равны нулю (табл. 2). Результаты нормализации количественных данных ПЦР представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 2. Значения Ср целевых генов

Ген	Интактные клетки	Индукция 20-МХ
<i>CYP1B1</i>	30,9±0,5	30,5±0,6
<i>CYP1A1</i>	30,0±0,5	29,0±0,5
<i>CYP1A2</i>	33,0±0,2	33,0±0,2

Т а б л и ц а 3. Результаты оценки уровня экспрессии целевых генов

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

Как видно из табл. 3, 20-МХ приводит к некоторому повышению уровня экспрессии в клетках гена изоэнзимов СYP, играющих важную роль в биоактивации ПАУ. Полученные нами данные хорошо согласуются с результатами работ [9, 12, 18], где также в клеточной линии А549 зарегистрировано небольшое, но все же достоверное увеличение уровня экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B1*. Этим действие 20-МХ существенно отличается от другого широко используемого индуктора монооксигеназ – 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*p*-диоксина, для которого характерен значительно более высокий уровень индукции как гена *CYP1A1*, так и гена *CYP1B1* [19].

Следующим этапом нашей работы стала оценка монооксигеназной составляющей в трансформации ключевого соединения в процессе канцерогенной активации Б[а]П – Б[а]П-7,8-диола в стандартно культивируемой опухолевой клеточной культуре и при ее экспонировании действием 20-МХ. Для этого определено количество израсходованного субстрата и содержание обоих продуктов его монооксигеназного окисления – ДЭ2 и ДЭ1. Полученные данные представлены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Оценка количества израсходованного Б[а]П-7,8-диола и продуктов его монооксигеназного окисления, нмоль

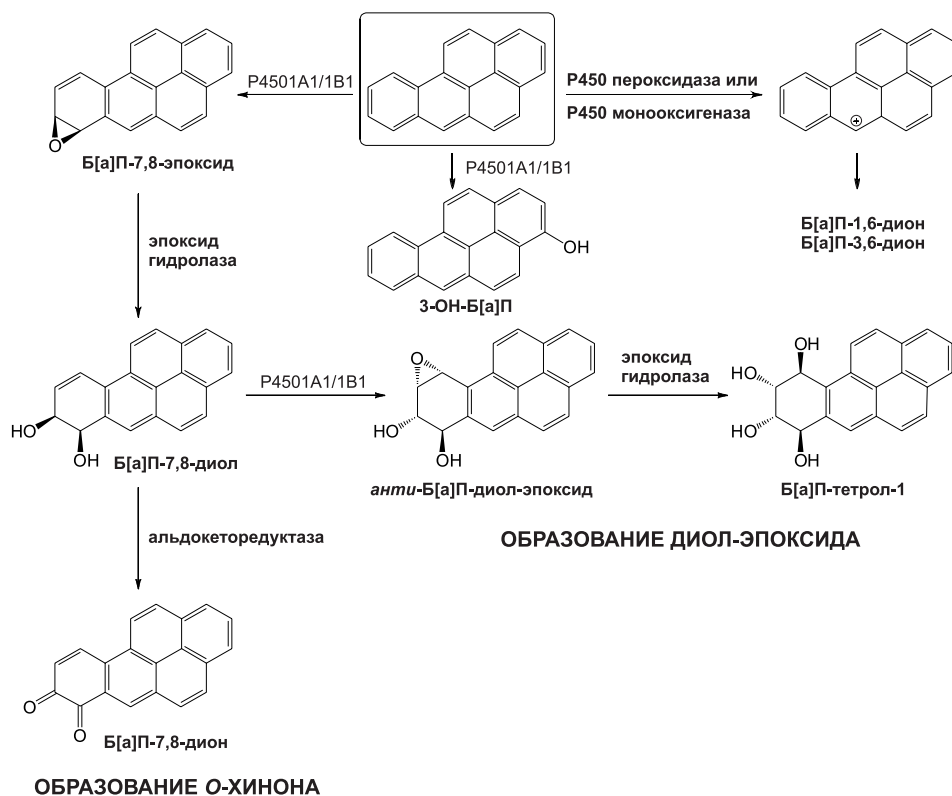
Наименование	Стандартные условия культивирования	Экспонирование 20-МХ
Б[а]П-7,8-диол	8,62	11,93
ДЭ1	0,18	0,32
ДЭ2	0,83	2,58

Как и следовало ожидать на основании данных по влиянию 20-МХ на экспрессию в клеточной культуре генов *CYP1B1* и *CYP1A1*, использование индуктора приводит к увеличению каталитической активности исследуемой системы. Причем действие индуктора в первую очередь проявляется в отношении каталитической активности клеток А549. Действительно, более чем трехкратное увеличение содержания ДЭ1 и ДЭ2 наблюдается на фоне лишь полуторакратного повышения уровня экспрессии гена *CYP1A1* (см. табл. 3 и 4). Причина подобного поведения системы не ясна. Правда, можно предположить, что наряду с индукцией генов гемопротеидов

в клеточной культуре происходит повышение уровня экспрессии необходимого для реализации монооксигеназного процесса электронотранспортного белка – цитохром-Р450-редуктазы, как это наблюдается в гепатоцитах [3].

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.

Обсуждение результатов. Полициклические ароматические углеводороды относятся к широко распространенным загрязнителям окружающей среды. Типичный представитель ПАУ – Б[а]П. Сам по себе Б[а]П является гидрофобной и достаточно инертной молекулой. Вместе с тем в результате его метаболической активации в организме образуется ряд соединений, обладающих высоким канцерогенным потенциалом. В настоящее время рассматриваются три основных пути превращения Б[а]П в канцерогенные производные [5].



Возможные пути метаболизма Б[а]П и его основные метаболиты

Как видно из рисунка, катион-радикальный путь связан с пероксидазной активностью изоферментов СYP; образование о-хинонов предполагает участие альдокеторедуктаз; диолэпоксиды образуются в результате монооксигеназных реакций, катализируемых различными изоформами СYP. В результате первых двух метаболических путей образуются дионовые производные Б[а]П, которые способны как непосредственно образовывать стабильные аддукты с ДНК, так и участвовать в генерировании активных форм. В настоящее время считается, что основной вклад в канцерогенную активацию Б[а]П вносят реакции его окисления СYP с образованием диолэпоксидов.

В первую очередь речь идет о ДЭ1 и ДЭ2. Причем, именно ДЭ2 относят к так называемым «полным» канцерогенам, способным участвовать как в стадии инициации, так и промоции опухолевого процесса [14]. Однако, несмотря на очевидные достижения в установлении путей канцерогенной активации ПАУ, некоторые ее аспекты остаются неясными. Например, количественные соотношения между отдельными метаболическими путями трансформации ПАУ и их зависимость от внешних факторов. В данной работе мы попытались оценить вклад монооксигеназной составляющей в канцерогенную активацию одного из ключевых проканцерогенных производных Б[а]П – 7,8-Б[а]П-диола в клеточной линии аденокарциномы легких А549.

Выбор клеточной линии обусловлен двумя соображениями: во-первых, ПАУ в значительной мере поступают в организм посредством ингаляции, в особенности при курении; во-вторых, A549 обладают высоким конститутивным уровнем экспрессии изоэнзимов AKR1C1–AKR1C3 семейства альдо-кето-редуктаз и содержат способные к индукции *CYP1A1* и *CYP1B1* [5]. Использование стандартных тетрольных производных Б[а]П позволило нам количественно определить содержание обоих диолэпоксидов – ДЭ1 и ДЭ2, образующихся в результате монооксигеназной реакции, и сопоставить с израсходованным количеством субстрата (табл. 3 и рисунок). Оказалось, что вклад монооксигеназного процесса в условиях нашего эксперимента в клетках A549 составляет лишь 13 %, что в принципе согласуется с относительно низким уровнем конститутивной экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1* [5]. Картина существенно меняется при экспонировании клеток действию 20-МХ. Как видно из табл. 4, в этом случае монооксигеназная составляющая в канцерогенной активации 7,8-Б[а]П-диола достигает уже 25 %. Причем практически 90 % приходится на долю «полного» канцерогена – ДЭ2. Напомним, что 20-МХ является полициклическим ароматическим соединением и наряду с Б[а]П входит в состав табачного дыма. Это позволяет полагать, что попадание в организм не одного, а целого пула полициклических ароматических углеводородов может существенным образом влиять не только на уровень, но и на направление канцерогенной активации отдельных представителей ПАУ.

Литература

1. De Montellano O., Paul R. // *Future Med. Chem.* 2013. Vol. 5(2). P. 213–228.
2. Пономаренко Т.М., Сычёв Д.А., Чикало А.О., Бердникова Н.Г., Кукес В.Г. // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2012. № 1. С. 25–28.
3. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. / Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. М.: Наука, 1981.
4. Кобляков В.А. / Цитохромы семейства Р-450 и их роль в активации проканцерогенов. М.: ВИНТИ, 1990.
5. Zhang Li, Jin Yi, Huang M., Penning T.M. // *Pharmacol.* 2012. Vol. 3. P. 1–12.
6. De Montellano O., Paul R. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. 3rd edition. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005.
7. Handschin C., Meyer U. // *Pharmacol. Rev.* 2003. Vol. 55. P. 649–673.
8. Hukkanen J., Pelkonen O., Hakkola J., Raunio H. // *Crit. Rev. Toxicol.* 2002. Vol. 32(5). P. 391–411.
9. Castell J.V., Teresa D.M., Gomez-Lechon M.J. // *Exp. Toxicol. Pathol.* 2005. Vol. 57. P. 189–204.
10. Foster K.A. *Exp. Cell. Res.* 1998. Vol. 243. P. 336–359.
11. Hukkanen J., Lassila A., Paivarinta K., Valanne S., Sarpo S., Hakkola J., Pelkonen O., Raunio H. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2000. Vol. 22. P. 360–366.
12. Hitoshi K., Katoh M., Suzuki T., Ando Y., Nadai M. // *Drug. Metab. Dispos.* 2012. Vol. 40. N3. P. 579–587.
13. Newland N., Baxter A., Hewitt K., Minet E. // *Toxicol In Vitro*. 2011. Vol. 25(4). P. 922–929.
14. Conney A.H. // *Cancer Res.* 1982. Vol. 42. P. 4875–4917.
15. IARC-Monographs. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 32, Polynuclear Aromatic Compounds, Pt. 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, IARC, Lyon, France, 1983.
16. Conney A.H., Chang R.L., Jerina D.M., Wei S.J.C. // *Drug. Metab. Rev.* 1994. Vol. 26. P. 125–163.
17. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. Vol. 25. N4. P. 402–408.
18. Tsuchiya Y., Nakajima M., Itoh S., Iwanari M., Yokoi T. // *Toxicol. sci.* 2003. Vol. 72. P. 253–259.
19. Hukkanen, J., Lassila A., Paivarinta K., Valanne S., Sarpo S., Hakkola J., Pelkonen O., Raunio H. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2000. Vol. 22. P. 360–366.

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

EVALUATION OF THE EXPRESSION AND CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P450 ISOENZYMES IN CANCER CELL LINE A549

Summary

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