

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Малыгина Д.А., Роговская Н.Ю., Бельтюков П.П., Бабаков В.Н.

Роль цитохромов CYP1A и CYP3A в генотоксическом действии бенз(а)пирена

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России», 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация

Введение. Метаболиты бенз(а)пирена – генотоксичные соединения, накопление которых способствует канцерогенезу. Основным механизмом их образования является окисление бенз(а)пирена с участием цитохромов P450 (CYP). Ингибиторы основных цитохромов могут приводить к снижению скорости образования метаболитов и, как следствие, к уменьшению генотоксических эффектов метаболитов бенз(а)пирена. Индукторы цитохромов, напротив, способствуют усилению генотоксичности.

Цель исследования – разработка клеточной модели на основе линии HераRG для исследования роли активности цитохромов в генотоксическом действии бенз(а)пирена.

Материал и методы. Для оценки влияния ингибиторов цитохромов CYP3A и CYP1A на генотоксические эффекты бенз(а)пирена в клетках HераRG было определено содержание активных форм белков системы репарации ДНК, фосфорилированных форм белков сигнальных каскадов методом иммуноанализа по технологии Luminescence MAP. Оценку цитотоксичности бенз(а)пирена осуществляли с помощью мониторинга клеточного индекса.

Результаты. Ингибиторы цитохромов CYP3A и CYP1A, кетоконазол и α -нафтофлаван снижают токсические эффекты бенз(а)пирена и активацию системы репарации ДНК, оказывают разнонаправленное действие на фосфорилирование различных тирозинкиназ в сигнальных путях.

Заключение. Клетки гепатомы человека HераRG представляют собой подходящую клеточную модель как для оценки вклада цитохромов в метаболизм ксенобиотиков, так и для изучения защиты клеток от генотоксического действия бенз(а)пирена ингибиторами цитохромов.

Ограничения исследования. Исследование выполнено на культуре клеток, для экстраполяции данных на организм требуется учитывать данные токсикодинамики и токсикокинетики.

Ключевые слова: бенз(а)пирен; HераRG; цитохромы; α -нафтофлаван; кетоконазол

Соблюдение этических стандартов. Исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Для цитирования: Малыгина Д.А., Роговская Н.Ю., Бельтюков П.П., Бабаков В.Н. Роль цитохромов CYP1A и CYP3A в генотоксическом действии бенз(а)пирена. *Токсикологический вестник*. 2022; 30(3): 158-166. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-3-158-166>

Для корреспонденции: Бабаков Владимир Николаевич, кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГУП «НИИ ГПЭЧ ФМБА России», 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: babakov@rihophe.ru

Участие авторов: Малыгина Д.А. – сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста; Роговская Н.Ю. – сбор и обработка материала; Бельтюков П.П. – редактирование; Бабаков В.Н. – концепция и дизайн исследования, редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила в редакцию: 20 апреля 2022 / Принята в печать: 25 мая 2022 / Опубликовано: 30 июня 2022

Malygina D.A., Rogovskaya N.Yu., Beltyukov P.P., Babakov V.N.

The role of cytochromes CYP1A and CYP3A in the genotoxic effect of benzo(a)pyrene

FSUE "Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology", FMBA of Russia, g.p. Kuzmolovskii, 188663, Leningrad Region, Russian Federation

Introduction. Benzo(a)pyrene metabolites are genotoxic compounds, the accumulation of which contributes to carcinogenesis. The main mechanism of metabolite formation is the benzo(a)pyrene oxidation by cytochromes P450 (CYP). Inhibitors of the main cytochromes can reduce the rate of metabolite formation and, as a result, to decrease the genotoxic effects of benzo(a)pyrene metabolites. In contrast, inducers of cytochromes contribute to the enhancement of genotoxicity.

Objective. The aim of the work was to develop a cell model based on the HepaRG cells to study the role of cytochromes activity in the genotoxic effect of benzo (a) pyrene.

Material and methods. To assess the effect of inhibitors of cytochromes CYP3A and CYP1A on the genotoxic effect of benzo(a)pyrene in HepaRG cells, the content of active forms of proteins of the DNA damage detection and repair system, phosphorylated forms of signaling cascade proteins was determined by immunoassay using Luminex xMAP technology. The cytotoxicity of benzo(a)pyrene was assessed by real-time cell analysis on xCelligence analyzer.

Results. Inhibitors of CYP3A and CYP1A cytochromes, ketoconazole and α -naphthoflavone demonstrate the ability to diminish the toxic effects of benz (a) pyrene, reduce the activation of the DNA repair system, and have a multidirectional effect on the different tyrosine kinases phosphorylation in signaling pathways.

Conclusion. HepaRG human hepatoma cells are a suitable cell model both to assess the contribution of cytochromes to the metabolism of xenobiotics and to study of the cell protection from the genotoxic effect of benzo (a) pyrene by cytochrome inhibitors.

Limitations. The study was performed on a cell culture. To extrapolate the data to the organism, it is necessary to take into account the data of toxicodynamics and toxicokinetics.

Keywords: *benzo(a)pyrene; HepaRG; cytochromes; α -naphthoflavone; ketoconazole*

Compliance with ethical standards. The study does not require the submission of the opinion of the biomedical ethics committee or other documents.

For citation: Malygina D.A., Rogovskaya N.Yu., Beltyukov P.P., Babakov V.N. The role of cytochromes CYP1A and CYP3A in the genotoxic effect of benzo(a)pyrene. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2022; 30(3): 158-166. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-3-158-166> (In Russian)

For correspondence: *Vladimir N. Babakov*, Ph.D., leading researcher, FSUE "Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology", FMBA of Russia, g.p. Kuzmolovskii, 188663, Leningrad Region, Russian Federation. E-mail: babakov@rihophe.ru

Information about authors:

Мальгина Д.А., <https://orcid.org/0000-0001-9664-2072>

Бельтюков П.П., <https://orcid.org/0000-0003-4050-6172>

Author contribution: *Malygina D.A.* – collection and processing of the material, statistical analysis, writing a text; *Rogovskaya N.Yu.* – collection and processing of the material; *Beltyukov P.P.* – editing; *Babakov V.N.* – the concept and design of the study, editing. *All co-authors* – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received: April 20, 2022 / Accepted: May 25, 2022 / Published: June 30, 2022

Введение

Загрязнение окружающей среды полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) — одна из причин развития онкологических заболеваний. Наиболее изученным веществом этой группы является бенз(а)пирен (БП) [1]. Метаболизм БП сопровождается образованием высокорекреационных диолэпоксидов (БПДЭ), способных ковалентно связываться с ДНК и другими биомолекулами. Подобные повреждения ДНК способствуют мутагенезу и канцерогенезу. Ключевую роль в этих процессах играют цитохромы P450, участвующие в трансформации ксенобиотиков [2]. Основным цитохромом, приводящим к накоплению токсичных метаболитов БП, является цитохром CYP1A. Цитохромы характеризуются значительным генетическим полиморфизмом и существенными индивидуальными различиями в активности, которые лежат в основе различной чувствительности к токсическому действию ПАУ. Активность цитохрома CYP1A2 в образцах печени разных людей может различаться в 60 раз [3]. Индукция экспрессии и увеличение активности цитохромов способствует инициации канцерогенеза ПАУ за счет накопления генотоксичных диолэпоксидов [4]. Напротив, пониженная активность цитохромов должна уменьшать вероятность образования и последующего транспорта в ядро генотоксичных метаболитов БП. Повреждения ДНК, вызванные воздействием БП, приводят к активации системы детекции таких нарушений и репарации ДНК. К белкам, вовлечённым в этот процесс, относят серин-треониновые протеинкиназы ATR, Chk1, Chk2, гистон H2AX, E3-убиквитин протеин лигазу Mdm2, опухолевый клеточный антиген p53 и ингибитор циклин-зависимой киназы 1 (p21) [5]. Определение содержания активных форм этих белков в клетках после воздействия ксенобиотиков позволяет определить степень влияния потенциальных протекторных соединений на генотоксическое действие ПАУ. Метаболиты бенз(а)пирена 1,6-бенз(а)пиренхинон (1,6-BPQ) и 3,6-бенз(а)пиренхинон (3,6-BPQ) активируют тирозинкиназный сигнальный путь ERK1/2-JNK через образование активных форм кислорода (АФК) [6, 7]. Повышение активности тирозинкиназных сигнальных каскадов в конечном итоге может приводить к росту пролиферативной активности трансформированных клеток [8].

Цель работы — разработать клеточную модель на основе гепатомы человека линии HepaRG для оценки вклада цитохромов с различной активностью

в формирование токсичных метаболитов и на этой модели оценить влияние бенз(а)пирена и его смеси с ингибиторами цитохромов CYP3A и CYP1A на внутриклеточные маркеры генотоксического действия и тирозинкиназных сигнальных каскадов в клетках линии HepaRG.

Материал и методы

Культивирование клеток. Исследование проводили на клетках гепатомы человека линии HepaRG (Gibco) и линии HepaRG PXR-/- с нокаутом по гену прегнанового X-рецептора (PXR Knockout HepaRG™ Cells, Sigma-Aldrich, MTOX1011). Клетки культивировали в среде Вильямса E (Gibco) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, средовых добавок инсулина и гидрокортизона, антибиотиков стрептомицина и пенициллина при 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

Анализ экспрессии генов. Для проверки активации цитохромов в клетках HepaRG был проведен анализ экспрессии генов CYP3A4, CYP1A1 методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ПЦР). Для индукции CYP3A в клетках HepaRG был использован рифампицин в концентрации 10 мкМ (инкубация 7 дней). Для стабилизации РНК клетки после эксперимента фиксировали реагентом RNAlater (Sigma), согласно инструкции производителя. Тотальную РНК выделяли при помощи набора реагентов Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов MMLV RT kit (Евроген) согласно инструкции производителя. Для проведения реакции брали 1 мкг РНК. ПЦР проводили при помощи набора реагентов qPCRmix-HS SYBR (Евроген) согласно протоколу производителя. Для детекции накопления ДНК использовали краситель SYBR Green. Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 1.

Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали с помощью метода 2^{ΔΔC_t} относительно среднего геометрического C_t трёх генов домашнего хозяйства: актина, кислого рибосомного белка 60S P0 (RPLP0), β2-микроглобулина (B2M) [11].

Оценка цитотоксичности. Определение интегральной цитотоксичности осуществлялось с помощью клеточного анализатора xCelligence RTCA (ACEA, США). Мониторинг клеточного индекса проводили в течение 3 дней после добавления ниже указанных соединений [12]. Для определения влияния индукции цитохромов на

Таблица 1 / Table 1

Последовательности использованных праймеров
Sequences of used primers

Ген	Аллель	Прямой праймер	Обратный праймер	Источник
CYP1A1	NM_000499,5	CATCCCCACAGCACAACA	CAGGGGTGAGAAACCGTCA	[9]
CYP3A4	NM_001202855,3	AAGTCGCCTCGAAGATACACA	AAGGAGAGAACTGCTCGTG	PrimerBank
ACTB	NM_001101,5	GCGAGAAGATGACCCAGATCA	GATAGCACAGCCTGGATAGCAA	[9]
RPLP0	NM_001002,4	GGCGACTGGAAGTCCAACCT	CCATCAGCACCACAGCCTTC	RTPrimerDB
B2M	NM_004048,3	CTCCGTGGCCTTAGCTGTG	TTTGGAGTACGCTGGATAGCCT	[10]

цитотоксичность БП индуцированные рифампицином клетки НераRG и неиндуцированные клетки НераRG инкубировали с добавлением в среду 10 мкМ БП в течение 24 ч. Для оценки цитотоксичности БП в присутствии ингибиторов цитохромов клетки культивировали в среде, содержащей 10 мкМ бенз(а)пирена, смесь 10 мкМ бенз(а)пирена и 2 мкМ кетоконазола (ингибитор CYP3A [13]), смесь 10 мкМ бенз(а)пирена и 0,5 мкМ α -нафтофлавона (ингибитор CYP1A [14]).

Оценка маркеров сигнальных путей и генотоксичности. Для исследования генотоксичности БП клетки инкубировали в 24-луночных планшетах с добавлением в среду 10 мкМ бенз(а)пирена, смеси 10 мкМ бенз(а)пирена и 2 мкМ кетоконазола, смеси 10 мкМ бенз(а)пирена и 0,5 мкМ α -нафтофлавона в течение 24 и 48 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Параллельно культивировали клетки в контрольных условиях (без добавления указанных веществ). Клетки после инкубации лизировали с помощью Cell Signaling Lysis Buffer (Millipore) с добавлением ингибитора протеаз (Complete, Roche) и фермента бензоназы. Концентрацию белка в лизатах определяли методом Лоури. Маркеры генотоксического действия были проанализированы в клеточных лизатах с использованием иммунофлуоресцентной технологии Luminex xMAP и набора реактивов MILLIPLEX MAP 7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit (Millipore) [15]. Изменения в содержании фосфорилированных белков Chk1 (Ser345), Chk2 (Thr68), H2A.X (Ser139), p53 (Ser15), а также белков ATR, MDM2, p21 были определены в клеточных лизатах.

Для анализа клеточных сигнальных каскадов использовали набор реактивов Multi-Pathway 9-plex Magnetic Bead Panel (Millipore). В клеточных лизатах были определены изменения в содержании фосфорилированных белков ERK/MAP киназы 1/2 (Thr185/Tyr187), Akt (Ser 473), STAT3

(Ser 727), JNK (Thr183/Tyr185), p70S6 киназы (Thr412), NF- κ B (Ser536), STAT5A/B (Tyr 694/699), CREB (Ser 133), p38 (Thr180/Tyr182).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных экспрессии генов производили в программе SPSS Statistics 22. Различия между группами определяли при помощи теста Стьюдента для 2 независимых групп. Статистическую обработку данных интенсивности флуоресценции белков сигнальных путей и активации системы репарации ДНК проводили в программе Bio-Plex Data Pro. Различия между группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для клеток линии НераRG характерен уровень экспрессии цитохромов, сопоставимый с экспрессией этих ферментов в первичных гепатоцитах человека [16]. Активность цитохромов можно индуцировать различными лекарственными средствами через прегнанный X-рецептор (PXR), конститутивный андростановый рецептор (CAR) и арилгидрокарбонный рецептор (AhR) [17].

Одним из наиболее изученных индукторов экспрессии цитохромов является антибиотик рифампицин. Индукция цитохромов рифампицином в концентрации 10 мкМ в течение 7 дней приводила к увеличению относительного уровня экспрессии генов CYP3A4 (тест Стьюдента, $p < 0,05$) и CYP1A1 (тест Стьюдента, $p < 0,05$) в клетках НераRG (табл. 2). Увеличение экспрессии генов на уровне РНК коррелирует с ферментативной активностью цитохромов, что позволяет использовать подобную клеточную модель для оценки влияния активности цитохромов на формирование токсичных метаболитов БП.

Таблица 2 / Table 2

Влияние индукции цитохромов рифампицином на относительный уровень экспрессии генов CYP3A4, CYP1A1 в клетках HepaRG, отн. ед. (среднее ± стандартное отклонение)

Effect of induction of cytochromes by rifampicin on the relative level of expression of the CYP3A4, CYP1A1 genes in HepaRG cells, arb. unit, mean ± SD

Ген	Контроль	Рифампицин, 10 мкМ
CYP3A4	1,01 ± 0,14	8,61 ± 0,71*
CYP1A1	1,01 ± 0,14	1,74 ± 0,22*

Примечание. * $p < 0,05$ (тест Стьюдента) по сравнению с контролем.

Инкубация клеток HepaRG с бенз(а)пиреном (10 мкМ) снижала скорость роста культуры с началом гибели клеток через 48 ч после введения ксенобиотика. Индукция экспрессии цитохромов рифампицином (10 мкМ) стимулировала гибель клеток в присутствии БП (рис. 1).

Клеточная линия HepaRG PXR-/- с нокаутом по гену прегнанового X-рецептора при культивировании в присутствии 10 мкМ рифампицина

в течение 7 дней не продемонстрировала увеличение экспрессии цитохромов, и форма кривых клеточного индекса, вызванных БП в контроле и при индукции цитохромов, оказалась сопоставима, усиления цитотоксичности при действии рифампицина не отмечено. Таким образом, клетки линии HepaRG и эта клеточная линия с нокаутом по рецептору прегнанового X-рецептора могут рассматриваться как единая модель, позволяющая изучать метаболизм ксенобиотиков при различной активности цитохромов.

Ингибиторы цитохромов CYP3A кетоконазол (2 мкМ) и CYP1A α -нафтофлаван (0,5 мкМ) снижали гибель клеток в присутствии бенз(а)пирена, при этом α -нафтофлаван демонстрировал более мощное цитопротекторное влияние на токсическое действие БП, чем кетоконазол (рис. 2).

Действие БП на клетки линии HepaRG приводит к заметной активации белков системы репарации ДНК через 24 и 48 ч, уровень активации увеличивается в десятки раз по сравнению с контролем (табл. 3). В качестве контрольных клеток использованы клетки HepaRG через 24 ч после смены среды. Белки системы репарации ДНК, которые активируются при действии БП,

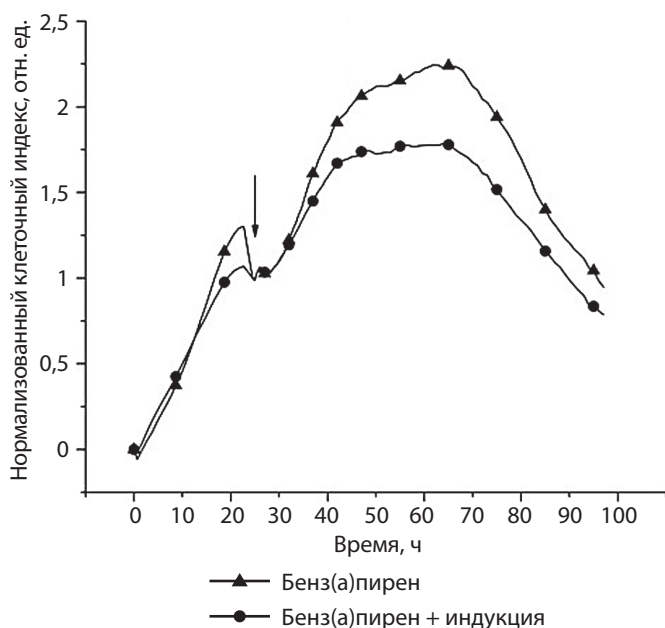


Рис. 1. График зависимости нормализованного клеточного индекса интактных клеток HepaRG от времени в присутствии бенз(а)пирена и индуцированных рифампицином клеток HepaRG в присутствии бенз(а)пирена. Стрелка указывает на время введения изучаемых соединений.

Fig. 1. Graph of the dependence of the normalized cell index of intact HepaRG cells on time in the presence of benzo(a)pyrene and rifampicin-induced HepaRG cells in the presence of benzo(a)pyrene. The arrow indicates the time of administration of the compounds under study.

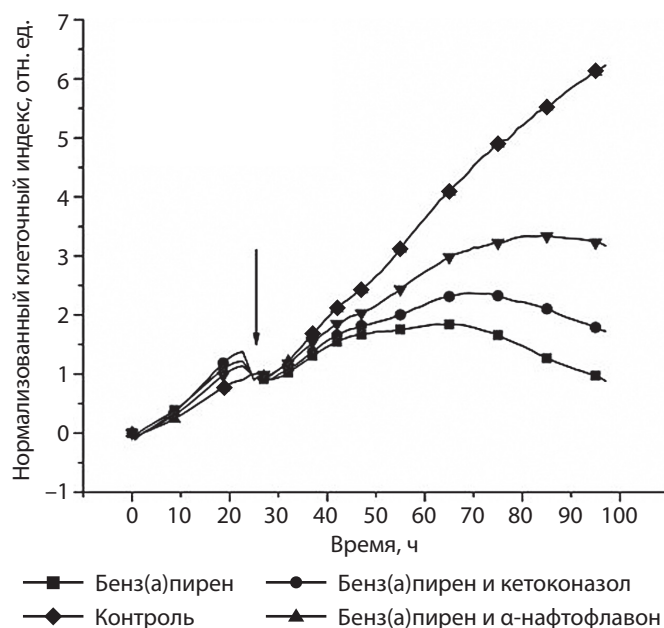


Рис. 2. График зависимости нормализованного клеточного индекса клеток линии HepaRG от времени в присутствии бенз(а)пирена, смеси бенз(а)пирена и кетоконазола, смеси бенз(а)пирена и α -нафтофлавола. Стрелка указывает на время введения изучаемых соединений.

Fig. 2. Graph of the dependence of the normalized cell index of HepaRG cells on time in the presence of benzo(a)pyrene, a mixture of benzo(a)pyrene and ketoconazole, a mixture of benzo(a)pyrene and α -naphthoflavone. The arrow indicates the time of administration of the compounds under study.

Таблица 3 / Table 3

Интенсивность флуоресценции (отн. ед.) активных форм белков p53, p21, Chk1, Chk2, ATR, MDM2 в лизатах клеток HepaRG через 24 и 48 ч после добавления бенз(а)пирена, смеси бенз(а)пирена и кетоконазола, смеси бенз(а)пирена и α -нафтофлавона (среднее \pm станд. отклонение)
Fluorescence intensity of active forms of p53, p21, Chk1, Chk2, ATR, MDM2 proteins in HepaRG cell lysates 24 and 48 hours after the addition of benzo(a)pyrene, a mixture of benzo(a)pyrene and ketoconazole, a mixture of benzo(a)pyrene and α -naphthoflavone, arb. unit (mean \pm SD)

Время	Белок	Контроль	Бенз(а)пирен, 10 мкМ	Бенз(а)пирен, 10 мкМ + кетоконазол, 2 мкМ	Бенз(а)пирен, 10 мкМ + α -нафтофлавон, 0,5 мкМ
24 ч	p53	29 \pm 2,65	2940,83 \pm 389,69 ^к	395,83 \pm 80,01 ^{к,б}	47,33 \pm 4,25 ^{к,б}
	p21	58,83 \pm 11,41	2994,67 \pm 501,92 ^к	338,67 \pm 30,66 ^{к,б}	59,5 \pm 6,26 ^б
	Chk1	22,33 \pm 2,84	338,17 \pm 17,86 ^к	117,67 \pm 13,5 ^{к,б}	26 \pm 2 ^б
	Chk2	24,33 \pm 1,53	83,5 \pm 4,27 ^к	45,5 \pm 1,8 ^{к,б}	31,83 \pm 6,03 ^б
	ATR	29,17 \pm 4,25	149,67 \pm 24,58 ^к	75,5 \pm 6,14 ^{к,б}	30 \pm 2,6 ^б
	MDM2	247 \pm 18,73	2432,5 \pm 132,06 ^к	1708,83 \pm 82,62 ^{к,б}	292,5 \pm 13,43 ^{к,б}
48 ч	p53	29 \pm 2,65	2040,17 \pm 155,6 ^к	685,75 \pm 90,16 ^б	26,67 \pm 2,31 ^б
	p21	58,83 \pm 11,41	605,67 \pm 38,37 ^к	718,5 \pm 315,21	28 \pm 3,46 ^{к,б}
	Chk1	22,33 \pm 2,84	171,67 \pm 11,37 ^к	149,67 \pm 17,82 ^к	23,33 \pm 5,13 ^б
	Chk2	24,33 \pm 1,53	59,67 \pm 9,71 ^к	56,5 \pm 4,92 ^к	23,83 \pm 6,71 ^б
	ATR	29,17 \pm 4,25	111 \pm 9,54 ^к	88,5 \pm 24,5 ^к	31,33 \pm 3,75 ^б
	MDM2	247 \pm 18,73	1058 \pm 110,62 ^к	1465,33 \pm 402,4 ^к	262,5 \pm 12,85 ^б

Примечание. Здесь и в табл. 4: статистически достоверные различия при $p < 0,05$ (ANOVA): ^к – по сравнению с контролем; ^б – по сравнению с бенз(а)пиреном.

могут рассматриваться как биомаркеры при оценке эффективности действия цитопротекторных соединений. Уровень активации этих белков снижался при действии на клетки смеси БП и агонистов арилгидрокарбонового рецептора [15].

При совместном действии ингибиторов цитохромов кетоконазола или α -нафтофлавона в смеси с БП активация белков системы репарации ДНК, индуцированных БП, существенно снижается (табл. 3). Ингибитор CYP1A α -нафтофлавон продемонстрировал более эффективное снижение генотоксичности, чем кетоконазол.

При действии БП были выявлены изменения в уровне фосфорилированных белков сигнальных каскадов, проанализированных с помощью набора Multi-Pathway 9-plex Magnetic Bead Panel (табл. 4). Наиболее значительные изменения в содержании активных форм белков были получены для p38, ERK1/2, JNK через 24 и 48 ч после добавления БП. Активация сигнальных путей, связанных с этими белками, приводит к активации транскрипционного фактора AP-1 и усилению пролиферации клеток [18], что может быть существенным фактором при злокачественной трансформации. Смесь ингибиторов цитохромов и БП на активацию этих белков демонстрирует разнонаправленную динамику.

Уровень активной формы ERK усиливается через 24 ч при действии на клетки смеси кетоконазола или α -нафтофлавона с БП, однако через 48 ч уровень активации ERK увеличивается на фоне действия БП, а ингибиторы цитохромов снижают уровень активной формы белка ERK, индуцированной БП.

Активация киназ JNK и p38, индуцированная БП, нейтрализуется ингибиторами цитохромов, причем для α -нафтофлавона эта нейтрализация выражена сильнее.

В предложенной системе не отмечено фосфорилирование p65 субъединицы транскрипционного фактора NF- κ B при действии на клетки БП. Полициклические ароматические углеводороды могут активировать этот транскрипционный фактор, однако реализация этой активации осуществляется через IKK-комплекс [12], и, вероятно, не задействуется рецепторный путь фосфорилирования p65 транскрипционного фактора RelA/NF- κ B.

БП в клетках HepaRG через 24 ч индуцировал увеличение уровня фосфорилированной формы белка STAT3 и снижал его через 48 ч по сравнению с контролем. В то же время инкубация с БП снижала уровень активированной формы белка STAT5 по сравнению с контролем спустя

Таблица 4 / Table 4

Интенсивность флуоресценции (отн. ед.) активных форм белков Akt, CREB, ERK1/2, JNK, NF-κB, p38, p70 S6, STAT3, STAT5 в лизатах клеток HepaRG через 24 и 48 ч после добавления бенз(а)пирена, смеси бенз(а)пирена и кетоконазола, смеси бенз(а)пирена и α-нафтофлавона (среднее ± станд. отклонение)

Fluorescence intensity of active forms of Akt, CREB, ERK1/2, JNK, NF-κB, p38, p70 S6, STAT3, STAT5 proteins in HepaRG cell lysates 24 and 48 hours after the addition of benzo(a)pyrene, a mixture of benzo(a)pyrene and ketoconazole, a mixture of benzo(a)pyrene and α-naphthoflavone, arb. unit (mean ± SD)

Время	Белок	Контроль	Бенз(а)пирен, 10 мкМ	Бенз(а)пирен, 10 мкМ + кетоконазол, 2 мкМ	Бенз(а)пирен, 10 мкМ + α-нафтофлавон, 0,5 мкМ
24 ч	Akt	61,62±3,7	71,33±1,15 ^к	52,33±11,81	62,5±8,51
	CREB	1335,25±384,57	1339,33±310,62	838,33±252,48	1222,25±392,75
	ERK 1/2	203,5±24,54	301,17±22,83 ^к	875,83±270,67 ^к	576,12±112,96 ^{к, б}
	JNK	114,75±7,31	243,17±23,96 ^к	221,83±22,03 ^к	152,87±22,37 ^к
	NF-κB	58,37±4,31	65±7,55	59,83±7,57	64±11,64
	p38	504,62±120,13	1283,5±295,75 ^к	1533,5±259,05 ^к	1004,12±251,6 ^к
	p70 S6	44,87±7,28	41,33±4,04	31,05±0,5 ^к	39,87±4,09
	STAT3	56,87±2,17	70,67±4,75 ^к	60,17±1,26 ^б	59,25±8,31
48 ч	STAT5	171±7,93	135,5±7,36 ^к	133,33±21,08	146,87±13,86 ^к
	Akt	63,5±3,97	47,67±4,64 ^к	40±4,24 ^к	59±7,62
	CREB	1440,83±142,35	687,25±245,28 ^к	586±179,46 ^к	818±14,23 ^к
	ERK 1/2	293,25±59,53	1257,5±213,35 ^к	811,37±284,66 ^к	395,75±41,02 ^{к, б}
	JNK	93,37±15,92	268,33±36,23 ^к	223,62±34,15 ^к	118,62±13,82 ^б
	NF-κB	57,5±7,2	58,33±2,52	53±9,42	51,62±5,44
	p38	356,62±78,92	934,62±317,97 ^к	1125,5±402,74 ^к	551,75±106,8 ^к
	p70 S6	43±7,94	29,5±8,35	21,25±1,71 ^к	39,25±6,85
STAT3	52±12,19	43,62±12,39	51,5±6,03	70,87±0,85 ^б	
STAT5	160,62±23,88	84,25±22,61 ^к	96,5±4,93 ^к	119,75±15,1 ^{к, б}	

24 и 48 ч после воздействия. При совместном действии БП и α-нафтофлавона уровень активных форм белков STAT3 и STAT5 менялся в сторону контрольного уровня. Ранее сообщали о снижении уровня экспрессии гена *STAT3* в клетках рака простаты РС-3 после воздействия на клетки бенз(а)пирена и α-нафтофлавона, сопровождавшееся снижением выживаемости клеток и мутагенной активности [19].

Таким образом, цитотоксичность БП усиливается в клетках линии HepaRG с индуцированной рифампицином повышенной экспрессией цитохромов CYP3A4, CYP1A1.

Цитохромы CYP1A и CYP3A приводят к появлению генотоксичных диолэпоксидов БП, вызывающих повреждение ДНК, запуск процесса репарации ДНК, остановку клеточного цикла и гибель клетки. Также параллельно активируются сигнальные каскады, которые стимулируют пролиферацию клеток и возможную промоцию опухолевого роста [20]. Активация MAPK-киназ,

таких как ERK1/2, JNK, p38, является результатом действия БП и его метаболитов на клетки, вероятно, через индукцию окислительного стресса [21, 22]. Ингибиторы цитохромов CYP3A (кетоконазол) и CYP1A (α-нафтофлавон) в концентрациях 2 мкМ и 0,5 мкМ, соответственно, снижают цитотоксичность БП и активацию ключевых белков системы репарации ДНК, индуцированную БП. При этом кетоконазол показывает менее выраженный эффект на воздействие БП по сравнению с α-нафтофлавоном.

Наиболее изученным путем метаболической активации БП является окисление между С-7 и С-8 с образованием БП-7,8-эпоксида, который может быть гидролизован микросомальной эпоксидгидролазой (mEH) в БП-7,8-дигидродиол. Затем это соединение может далее окисляться CYP1A с образованием высокорективно-го БП-7,8-дигидродиол-9,10-эпоксида (БПДЭ), который образует аддукты с ДНК, что делает его наиболее канцерогенной формой БП [23].

Индукция β -нафтофлавоном цитохромов группы CYP1A в микросомальной фракции S9 печени крыс в системе *in vitro* приводила к значительному увеличению ВРДЭ-ДНК аддуктов, определенным по радиоактивной метке ^{32}P , в то время как ингибирование CYP1A α -нафтофлавоном снижало уровень радиоактивности аддуктов ниже контрольного уровня неиндуцированных микросом. Одновременное ингибирование CYP1A α -нафтофлавоном и эпоксидгидролазы оксидом циклогексена приводило к еще большему снижению уровня БПДЭ-ДНК аддуктов [24].

Цитохром CYP3A – один из основных ферментов окисления лекарственных средств, но ранее не было информации о его влиянии на метаболизм полициклических ароматических углеводородов. Существенное снижение цитотоксичности индуцированной БП, в присутствии ингибитора CYP3A кетоконазола, позволяет сделать вывод об альтернативном пути метаболической активации ПАУ.

В исследовании на эмбрионах рыб *Fundulus heteroclitus*, живущих в загрязненных ПАУ условиях реки Элизабет, Вирджиния, США было установлено, что могут развиваться механизмы биохимической адаптации, связанные с устойчивостью к индукции цитохрома CYP1A. У рыб с биохимической адаптацией с меньшей вероятностью формируется БПДЭ метаболит БП, и метаболическое окисление сдвигается в сторону формирования менее токсичного 9,10-дигидродиол бенз(а)пирена по сравнению с контрольной популяцией рыб. Для этого фенотипа характерна меньшая тератогенность БП. Однако при ингибировании CYP1A флуорантеном у рыб с биохимической адаптацией тератогенные эффекты БП полностью не нейтрализуются [25].

Одним из возможных объяснений сохранения тератогенности БП при ингибировании цитохрома CYP1A является диоксиноподобная активность химически инертного БП при попадании в ядро клетки, при этом генотоксические метаболиты могут отсутствовать. ПАУ и их метаболиты могут транспортироваться в ядро с использованием транспортной системы транскрипционного фактора NF- κ B. Ранее было установлено, что при совместном действии на клетки липополисахарида, классического активатора NF- κ B и БП, происходит быстрая гибель клеток НераRG, при этом система репарации ДНК как маркер генотоксического действия БПДЭ метаболита БП не активируется [15].

Также ряд авторов сообщает о способности кетоконазола и α -нафтофлавона [26] индуцировать арилгидрокарбонный рецептор и запускать экспрессию генов, связанную с ним [27, 28]. Агонисты [12] и антагонисты арилгидрокарбонного рецептора [29] также могут снижать токсическое действие ПАУ, вероятно, конкурируя за транспортную систему этого рецептора в ядро. Имеются данные об использовании общих механизмов транспорта транскрипционного фактора NF- κ B и AhR [30].

Заключение

Клетки гепатомы человека линии НераRG могут быть использованы как клеточная модель для оценки вклада цитохромов в метаболизм ксенобиотиков. Ингибиторы цитохромов CYP3A и CYP1A кетоконазол и α -нафтофлавоном соответственно снижают цитотоксичность бенз(а)пирена, а также его генотоксические эффекты, что, в конечном итоге, может приводить к снижению вероятности злокачественной трансформации, индуцированной полициклическими ароматическими углеводородами.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 1–3, 5–11, 13, 14, 16–30 см. References)

4. Кобляков В.А. Индукторы суперсемейства цитохрома P-450 как промоторы канцерогенеза. *Биохимия*. 1998; 63(8): 1043-58.
12. Бабаков В.Н., Роговская Н.Ю., Курдюков И.Д., Бельтюков П.П., Дулов С.А., Радиллов А.С. Влияние бенз(а)-пирена и эндогенного агониста арил-гидрокарбонного рецептора ficz на активацию транскрипционного фактора NF- κ B и

- цитокинный секретом в клетках гепатомы человека линии НераRG. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2018; 20(3): 432-8.
15. Бабаков В.Н., Роговская Н.Ю., Курдюков И.Д., Бельтюков П.П., Дулов С.А., Радиллов А.С. Влияние агонистов арилгидрокарбонного рецептора и липополисахарида на маркеры генотоксического действия бенз(а)пирена. *Токсикологический вестник*. 2019; (3): 19-25.

REFERENCES

1. Błaszczak E., Mielżyńska-Śwach D. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J Appl Genet*. 2017; 58(3): 321-30.
2. Moorthy B., Chu C., Carlin D.J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci*. 2015; 145(1): 5-15.
3. Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich F.P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 270(1): 414-23.
4. Koblyakov V.A. Inductors of the cytochrome P-450 superfamily as promoters of carcinogenesis. *Biokhimiya*. 1998; 63(8): 1043-58. (in Russian)

5. Niida H., Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*. 2006; 21(1): 3-9.
6. Rodríguez-Fragoso L., Melendez K., Hudson L.G., Lauer F.T., Burchiel S.W. EGF-receptor phosphorylation and downstream signaling are activated by benzo[a]pyrene 3,6-quinone and benzo[a]pyrene 1,6-quinone in human mammary epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 235(3): 321-8.
7. Burdick A.D., Davis J.W., Liu K.J., Hudson L.G., Shi H., Monske M.L., et al. Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res*. 2003; 63(22): 7825-33.

8. Kometani T., Yoshino I., Miura N., Okazaki H., Ohba T., Takenaka T., et al. Benzo[a]pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *Cancer Lett.* 2009; 278(1): 27-33.
9. Berge G., Øvrebø S., Botnen I.V., et al. Resveratrol inhibits benzo[a]pyrene–DNA adduct formation in human bronchial epithelial cells. *Br J Cancer.* 2004; 91(2): 333-8.
10. Cicinnati V.R., Shen Q., Sotiropoulos G.C., Radtke A., Gerken G., Beckebaum S. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer.* 2008; 8(1): 350-62.
11. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-8.
12. Babakov V.N., Rogovskaya N.Y., Kurdyukov I.D., Belyukov P.P., Dulov S.A., Radilov A.S. The effect of benzo(a)-pyrene and the endogenous agonist of the aryl hydrocarbon receptor FICZ on the activation of the transcription factor NF- κ B and the cytokine secretion in human hepatoma HepaRG cells. *Medicina extremalynkh situachiy.* 2018; 20(3): 432-8. (in Russian)
13. Lewis D.F. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics.* 2004; 5(3): 305-18.
14. Hodson P.V., Qureshi K., Noble C.A.J., Akhtar P., Brown R.S. Inhibition of CYP1A enzymes by alpha-naphthoflavone causes both synergism and antagonism of retene toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol.* 2007; 81(3): 275-85.
15. Babakov V.N., Rogovskaya N.Y., Kurdyukov I.D., Belyukov P.P., Dulov S.A., Radilov A.S. Effect of aryl hydrocarbon receptor agonists and lipopolysaccharide on benzo(a)pyrene genotoxicity markers. *Toksiikologicheskii vestnik.* 2019; (3): 19-25. (in Russian)
16. Lübberstedt M., Müller-Vieira U., Mayer M., Biemel K.M., Knöspel F., Knobloch D., et al. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2011; 63(1): 59-68.
17. Rhodes S.P., Otten J.N., Hingorani G.P., Hartley D.P., Franklin R.B. Simultaneous assessment of cytochrome P450 activity in cultured human hepatocytes for compound-mediated induction of CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2011; 63(3): 223-6.
18. Patten Hitt E., DeLong M.J., Merrill A.H. Benzo(a)pyrene Activates Extracellular Signal-Related and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases in HT29 Colon Adenocarcinoma Cells: Involvement in NAD(P)H:quinone Reductase Activity and Cell Proliferation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 183(3): 160-7.
19. Gao M., Li H., Dang F., Chen L., Liu X., Gao J. Induction of proliferative and mutagenic activity by benzo(a)pyrene in PC-3 cells via JAK2/STAT3 pathway. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2020; 821: 111720.
20. Vondráček J., Machala M. The role of metabolism in toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their non-genotoxic modes of action. *Curr Drug Metab.* 2020; 21.
21. Wei Y., Zhao L., He W., et al. Benzo[a]pyrene promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis likely through the Aryl hydrocarbon receptor and ERK-dependent induction of MMP9 and c-myc. *Int J Oncol.* 2016; 49(5): 2055-63.
22. Burdick A.D., Ivnitski-Steele I.D., Lauer F.T., Burchiel S.W. PYK2 mediates anti-apoptotic AKT signaling in response to benzo[a]pyrene diol epoxide in mammary epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2006; 27(11): 2331-40.
23. Ericson G., Balk L. DNA adduct formation in northern pike (*Esox lucius*) exposed to a mixture of benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene and 7H-dibenzo[c,g]carbazole: time-course and dose-response studies. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2000; 454(1-2): 11-20.
24. Arif J., Gupta R. Effect of inducer and inhibitor probes on DNA adduction of benzo[a]pyrene and 2-acetylaminofluorene and their roles in defining bioactivation mechanism(s). *Int J Oncol.* 1996; 8(4): 681-5.
25. Wills L.P., Zhu S., Willett K.L., Di Giulio R.T. Effect of CYP1A inhibition on the biotransformation of benzo[a]pyrene in two populations of *Fundulus heteroclitus* with different exposure histories. *Aquat Toxicol.* 2009; 92(3): 195-201.
26. Aluru N., Vuori K., Vijayan M.M. Modulation of Ah receptor and CYP1A1 expression by α -naphthoflavone in rainbow trout hepatocytes. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol.* 2005; 141(1): 40-9.
27. Casley W.L., Ogródowczyk C., Larocque L., Jaentschke B., LeBlanc-Westwood C., Menzies J.A., et al. Cytotoxic doses of ketoconazole affect expression of a subset of hepatic genes. *J Toxicol Environ Health.* 2007; 70(22): 1946-55.
28. Korashy H.M., Brocks D.R., El-Kadi A.O.S. Induction of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 by ketoconazole and itraconazole: a mechanism of cancer chemoprotection. *Cancer Lett.* 2007; 258(1): 135-43.
29. Kim S.-H., Henry E.C., Kim D.-K., Kim Y.-H., Shin K.J., Han M.S., et al. Novel Compound 2-Methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic Acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) Prevents 2,3,7,8-TCDD-Induced Toxicity by Antagonizing the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol Pharmacol.* 2006; 69(6): 1871-8.
30. Voronov I., Li K., Tenenbaum H.C., Manolson M.F. Benzo[a]pyrene inhibits osteoclastogenesis by affecting RANKL-induced activation of NF- κ B. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75(10): 2034-44.

ОБ АВТОРАХ:

Малыгина Дарья Александровна (Malygina Daria Alexandrovna), мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: malygina.darja@yandex.ru

Роговская Надежда Юрьевна (Rogovskaya Nadezhda Yurievna), науч. сотр. лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: nadin-r@mail.ru

Бельтюков Петр Петрович (Belyukov Petr Petrovich), кандидат мед. наук, зав. лабораторией молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: belyukov@gpetch.ru

Бабаков Владимир Николаевич (Babakov Vladimir Nikolaevich), кандидат биол. наук, ведущий науч. сотр. лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: babakov@gpetch.ru

