

УДК 547.7 : 615.099 : 616-006

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ АРИЛГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА МАРКЕРЫ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БЕНЗ(А)ПИРЕНА

В.Н. Бабаков,
Н.Ю. Rogovskaya,
И.Д. Курдюков,
П.П. Бельтюков,
С.А. Дулов, А.С. Радилов

ФГУП НИИ гигиены,
профпатологии и экологии
человека ФМБА России,
г. Санкт-Петербург, Российская
Федерация

Оценивали влияние агонистов арилгидрокарбонowego рецептора (FICZ и ITE), а также липополисахарида при токсическом действии бенз(а)пирена в клетках гепатомы человека линии HeraRG. В качестве маркеров генотоксического действия бенз(а)пирена определяли активные формы белков ключевых стресс-активируемых киназных каскадов и системы репарации ДНК. Липополисахарид в смеси с бенз(а)пиреном усиливает токсичность бенз(а)пирена и снижает активацию белков системы репарации ДНК ниже контрольного уровня. Агонисты арилгидрокарбонowego рецептора (FICZ и ITE) проявляют цитопротекторное действие на фоне токсичности бенз(а)пирена, усиливают активацию киназы Akt1 и снижают уровень активации белка p53 и чекпойнт-киназ Chk1 и Chk2. Таким образом, FICZ и ITE снижают генотоксичность бенз(а)пирена.

Ключевые слова: полиароматические углеводороды, бенз(а)пирен, арилгидрокарбонový рецептор, HeraRG, NF-κappaB, генотоксичность.

Введение. Генотоксический тип канцерогенеза связан с образованием в ходе метаболизма ксенобиотиков высокорекреационных метаболитов, способных вызывать окислительный стресс, образование аддуктов с ДНК и белками и вызывать повреждения ДНК [1]. Ключевую роль в этом процессе играют цитохромы P450, вызывающие окислительное гидроксилирование ксенобиотиков [2]. Бенз(а)пирен (далее БП) и 3-метилхолантрен являются наиболее изученными из полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) и часто используются как модельные соединения в экспериментальной онкологии. В экспериментах на животных было показано, что аппликация спиртового раствора БП на кожу вызывает развитие опухоли в течение 90-100 сут, внутримышечная инъекция – быстрое развитие саркомы [3].

Повреждения ДНК восстанавливаются с помощью системы внутриклеточной репарации. В детекцию повреждений ДНК и их репарацию вовлечен ряд белков, наиболее широко класси-

фицируемых как сенсоры, медиаторы, трансдюсеры и эффекторы [4]. Сенсорные белки, такие как Rad9, Rad1, Hus1, аккумулируются на участке повреждения ДНК, способствуя фосфорилированию белков чекпойнт-киназ, и влияют на белки-трансдюсеры ATM и ATR. Активация медиаторов, таких как H2AX, BRCA1, SMC1 приводит к формированию устойчивого мультибелкового комплекса на участке повреждения ДНК, дополнительно активируя ATM сигналинг и чекпойнт-киназы. Киназы контроля клеточного цикла Chk1 и Chk2 важны для остановки клеточного цикла перед митозом в ответ на повреждение ДНК. К эффекторным молекулам относятся белки p53 и MDM2. Белок p53 играет ключевую роль в определении судьбы клетки после стресса различного типа (радиоактивное или химическое повреждение ДНК, гипоксия, активация онкогенов) – остановка клеточного цикла или гибель клетки. Определение уровня экспрессии и функционального состояния белков, вовлечен-

Бабаков Владимир Николаевич (Babakov Vladimir Nikolaevich), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России, babakov@rihophe.ru

Роговская Надежда Юрьевна (Rogovskaya Nadezhda Yurievna), научный сотрудник ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России

Курдюков Иван Дмитриевич (Kurdyukov Ivan Dmitrievich), старший научный сотрудник ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России

Бельтюков Петр Петрович (Belyukov Petr Petrovich), кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России

Дулов Сергей Анатольевич (Dulov Sergei Anatolievich), кандидат медицинских наук, заместитель заведующего отделом токсикологии ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России

Радилов Андрей Станиславович (Radilov Andrei Stanislavovich), доктор медицинских наук, профессор, и.о. директора ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России, radilov@rihophe.ru

ных во все элементы репарационного процесса после генотоксического действия, позволяет быстро определять соединения, обладающие генотоксическим действием, а также оценивать влияние на генотоксическое действие потенциальных протекторных соединений.

Ранее нами было продемонстрировано цитопротекторное влияние агониста арилгидрокарбонового рецептора FICZ в ответ на токсическое действие БП в клетках гепатомы человека линии НераRG и возможное участие в этом влиянии транскрипционного фактора NF-κB [5].

Основной целью настоящей работы было оценить влияние нетоксичных высокоаффинных эндогенных агонистов арилгидрокарбонового рецептора (AhR) 5,11-дигидроиндоло[3,2-b]карбазол-6-карбоксальдегида (FICZ, $K_d=70$ пМ) и метилового эфира 2-(1H-индол-3-илкарбонил)-4-тиазолекарбоксильной кислоты (ITE, $K_d=3$ нМ), а также активатора транскрипционного фактора NF-κB – липополисахарида из *S. typhosa* (ЛПС) на внутриклеточные маркеры генотоксического действия БП в клетках линии НераRG.

Материалы и методы исследования. Клетки линии НераRG (Gibco) культивировали во флаконах в среде Вильямса E (Gibco) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, средовых добавок инсулина и гидрокортизона, антибиотиков стрептомицина-пенициллина при 37 °C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. FICZ и ITE были получены из Tocris Bioscience, БП и ЛПС из *S. typhosa* – из Sigma-Aldrich.

Для определения интегральной цитотоксичности с помощью оборудования xCelligence RTCA, 10 тыс. клеток вносили в лунку специализированного планшета, позволяющего определять клеточный индекс в режиме реального времени и культивировали в полной среде Вильямса. На следующий день после пассажа среду меняли на содержащую 10 мкМ БП, 1 нМ FICZ, 10 нМ ITE, 1 мкг/мл ЛПС и их смеси. Мониторинг клеточного индекса проводили в течение 3 дней после добавления изучаемых соединений. Каждое соединение и их смеси вносили в 6 лунок экспериментального планшета.

Для получения данных по определению активированных молекулярных маркеров сигнальных путей, ассоциированных с гибелью клетки, и активации репарационных процессов, клетки культивировали в 24-луночных планшетах, промывали на следующий день после пассажа, добавляли среду, содержащую 10 мкМ БП, 1 нМ FICZ, 10 нМ ITE, 1 мкг/мл ЛПС и их смеси, и инкубировали 24 и 48 ч.

Клетки после инкубации дважды промывали ледяным раствором Хенкса и после тщательного удаления остатков жидкости замораживали при –70°C.

Замороженные клетки лизировали с помощью буферного раствора Cell Signaling Lysis Buffer (Millipore) с добавлением ингибитора протеаз (Complete, Roche) и фермента бензоназы. Полученные лизаты центрифугировали 10 мин при 12000 g, отбирали аликвоту супернатанта, в которой определяли концентрацию белка по протоколу DC Protein Assay (метод Лоури, реактивы Bio-Rad). Концентрацию белка в лизатах выравнивали и исследовали их на активность репарационных процессов, вызванных генотоксическим действием, по фосфорилированию/дефосфорилированию ключевых представителей сигнальных каскадов и белков системы репарации ДНК.

Маркеры сигнальных путей и генотоксического действия были проанализированы в клеточных лизатах с использованием многопараметрической иммунофлуоресцентной технологии Luminex xMAP. Для анализа использовали набор реактивов для определения ранних маркеров апоптоза (7-Plex MILLIPLEX MAP Early Apoptosis Magnetic Bead Kit, Кат. № 48-669MAG Merck/Millipore, США), который позволяет определять активированные фосфорилированные формы следующих белков: Akt1 (Ser473), p53 (Ser46), BAD (Ser112), Bcl-2 (Ser70), JNK (Thr183/Tyr185), а также активных форм каспазы-8 (гидролизованной по Asp384) и каспазы-9 (гидролизованной по Asp315). В этих же образцах определяли маркеры генотоксического действия с помощью набора реактивов MILLIPLEX MAP 7-plex DNADamage/Genotoxicity Magnetic Bead kit (Кат. № 48-621MAG, Merck/Millipore, США). Набор позволяет детектировать изменения в уровне фосфорилирования белков Chk1 (Ser 345), Chk2 (Thr68), H2A.X (Ser138), p53 (Ser15), а также определять уровень экспрессии белков ATR, MDM2, p21.

Статистическую обработку проводили в пакете Bio-Plex Data Pro Plus, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Результаты и обсуждение. Для проявления токсических свойств БП, ему необходимо пройти метаболическую активацию с помощью цитохромов P450, с образованием химически активных метаболитов диолэпоксидов БП. Клеточная линия НераRG в настоящее время является единственной доступной иммортализованной линией, экспрессирующей цитохром P450 на уровне, сопоставимом с экспрессией этого же типа ферментов в гепатоцитах человека [6].

С помощью измерения электрического импеданса (полного сопротивления) поверхности клеток можно в реальном времени интегрально оценивать целый ряд показателей, в том числе и скорость роста культуры в долговременных экспериментах [7].

На рисунке 1 представлены графики зависимости нормализованного клеточного

индекса от времени инкубации клеток HераRG с 10 мкМ БП, 1 нМ FICZ, 10 нМ ITE, 1 мкг/мл ЛПС из *S. typhosa* и их смеси. FICZ, ITE и ЛПС в исследуемых концентрациях заметно не влияют на рост культуры и пролиферацию клеток до 72 часов после добавки к клеткам (рис. 1 Б). БП в концентрации 10 мкМ, замедляет рост культуры с началом гибели клеток через 48 ч после введения, которые требуются на метаболическую активацию. Липополисахарид с БП усиливает гибель клеток, агонисты AhR в концентрации 1 нМ FICZ и 10 нМ ITE демонстрируют цитопротекторное влияние на токсическое действие БП (рис. 1 А).

Основной путь гибели клетки при действии БП – некроз, который вызывается гиперактивацией фермента PARP-1 и истощением клеточных резервов НАД⁺ [8], что приводит к невозможности энергозависимого апоптотического пути гибели клетки [7].

При анализе молекулярных событий, ассоциированных с апоптозом, можно отметить, что основные маркеры апоптоза при действии БП не активировались, активные формы каспазы-8 и каспазы-9 и активные формы белков BAD (Ser112) и Bcl-2 (Ser70) не накапливались в клеточных экстрактах в течение 48 часов токсического действия БП.

Однако, БП вызывал статистически значимое повышение уровня активных фосфорилированных форм белка Akt (Ser473), c-Jun N-концевой киназы – JNK (Thr183/Thr185) и белка p53 (Ser15 и Ser46) (рис. 2).

Агонисты арилгидрокарбонового рецептора FICZ и ITE статистически значимо повышали уровень активных форм белка Akt через 24 ч и через 48 ч (для ITE) дополнительно к повышению, вызванному БП. На повышение уровня фосфорилированной формы стресс-активируемой киназы JNK, вызванной БП, FICZ и ITE влияния не оказывали.

FICZ и ITE снижали в сторону контрольных значений уровень фосфорилированных форм белка p53 через 24 часа, повышение которых было вызвано БП, и демонстрировали разнонаправленную динамику через 48 ч.

Во всех случаях в смеси БП с ЛПС для этих белков уровни были ниже контрольных (рис. 2).

Общий уровень белка ATR в клеточном лизате при действии БП незначительно повышается, FICZ и ITE снижают это повышение в первые сутки действия. На вторые сутки повышенный уровень белка отмечен только для смеси БП и ITE.

Общий уровень эффекторного белка MDM2 при действии БП в клеточных лизатах повышается практически в 2 раза, FICZ и ITE демонстрируют разнонаправленное влияние на это повышение. На вторые сутки уровни белка MDM2 для БП и смеси БП с агонистами AhR не отличаются от контрольного уровня. Уровни белков ATR и MDM2 для смеси БП и ЛПС были существенно ниже контрольных значений на первые и вторые сутки действия.

Уровень активной формы медиаторного белка – гистона H2A.X, фосфорилированного по Ser139, незначительно повышается в первые сутки действия БП, смеси БП и FICZ и смеси БП с ЛПС; а смесь БП с ITE снижает этот уровень ниже контрольных значений (рис. 3).

Уровни активных форм чекпойнт-киназ Chk1 и Chk2 статистически значимо повышаются при действии БП, агонисты AhR снижают это повышение в первые сутки и демонстрируют разнонаправленную динамику на вторые сутки. Смесь БП и ЛПС также снижает уровень активных форм чекпойнт-киназ ниже контрольного уровня через 24 ч и 48 ч после введения (рис. 4).

Таким образом, липополисахарид в смеси с БП значительно снижает уровень активных форм ре-

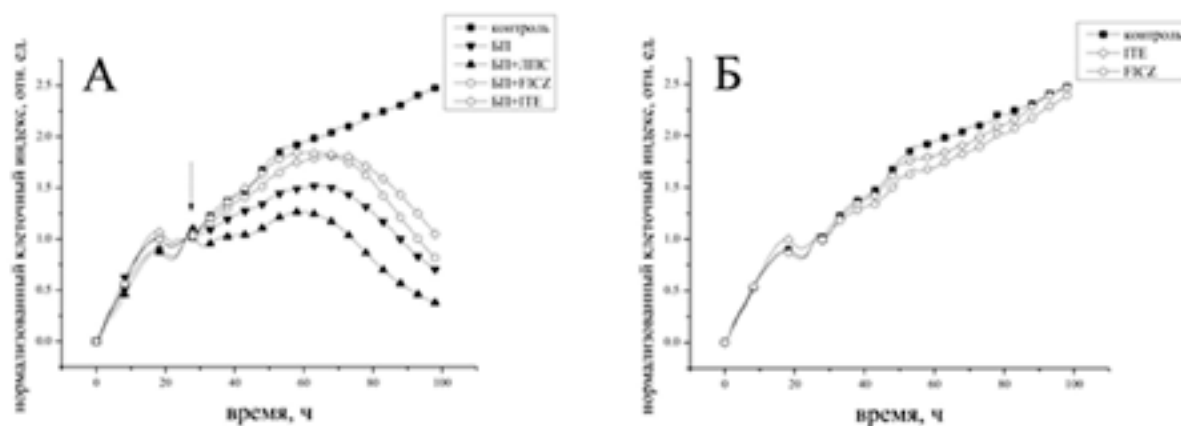


Рис. 1. График зависимости нормализованного усредненного ($n=6$) клеточного индекса клеток линии HераRG от времени в присутствии 10 мкМ БП, 1 нМ FICZ, 10 нМ ITE, 1 мкг/мл ЛПС и их смеси. Отмечено время введения изучаемых соединений. Контрольные клетки культивировали в полной среде Вильямса Е.

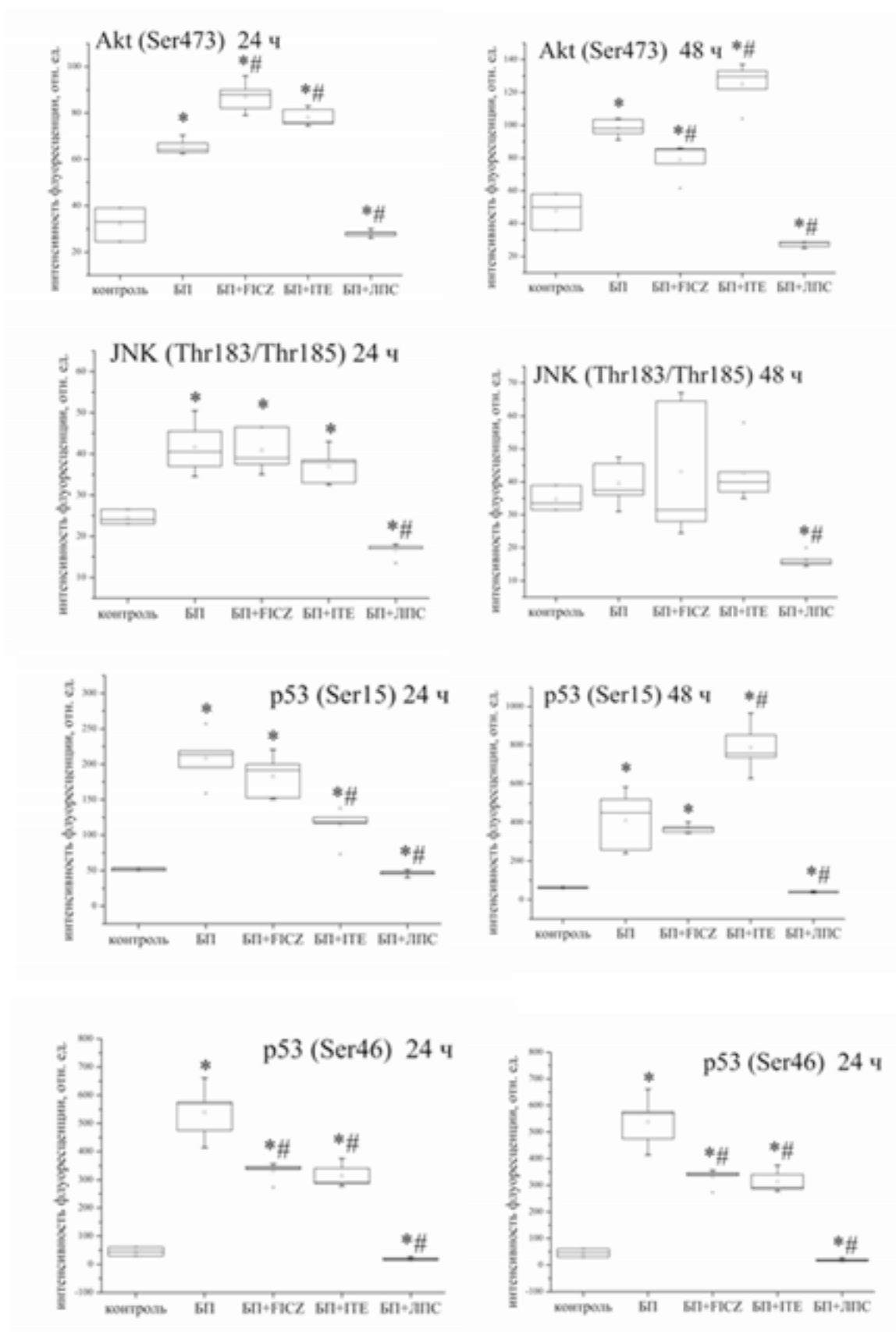


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции (диаграмма размаха, среднее, границы 1-3 квартилей) фосфорилированных белков Akt1 (Ser473), JNK (Thr183/Thr185) и белка p53 (Ser15 и Ser46) в лизатах клеток HelaRG через 24 ч и 48 ч после добавления БП, смеси БП+FICZ, смеси БП+ITE и смеси БП+ЛПС.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с БП (ANOVA).

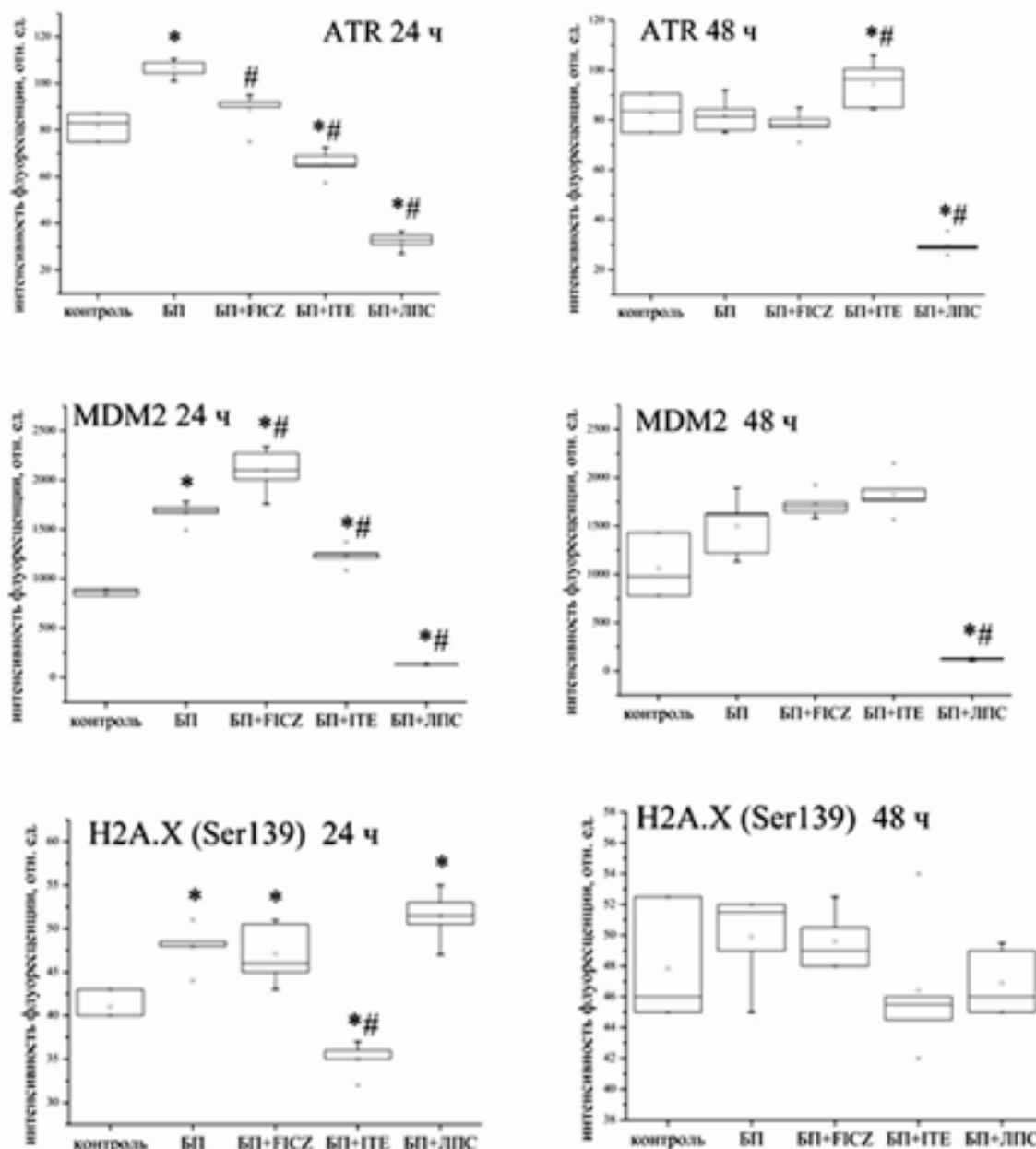


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции (диаграмма размаха, среднее, границы 1-3 квартилей) белков ATR, MDM2 и активной формы гистона H2A.X (Ser139) в лизатах клеток HepaRG через 24 ч и 48 ч после добавления БП, смеси БП+FICZ, смеси БП+ITE и смеси БП+ЛПС.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с БП (ANOVA).

гуляторных белков в клеточных лизатах через 24 ч и 48 ч после введения, часто даже ниже контрольных значений, что на фоне большей цитотоксичности свидетельствует о быстром развитии некроза.

Добавка FICZ и ITE в смесь к БП приводила к меньшей цитотоксичности БП. Агонисты AhR увеличивали уровень активной формы киназы Akt1 дополнительно к повышению, вызванному БП, что демонстрирует дополнительный сигнал к выживанию клеток и снижали уровни активных форм транскрипционного фактора p53

и чекпойнт-киназ Chk1 и Chk2, что подтверждает меньшую активацию репарационных процессов, индуцированных БП. FICZ и ITE демонстрировали разнонаправленную динамику на 2 сутки для ряда маркеров генотоксичности, что скорее всего связано с индивидуальными свойствами изучаемых агонистов AhR.

В ряде работ было продемонстрировано, что БП способен индуцировать провоспалительный ответ [9], а индукторы воспаления усиливают генотоксичность БП [10,11]. У мышей, с вызванным ЛПС воспалением, детектируется

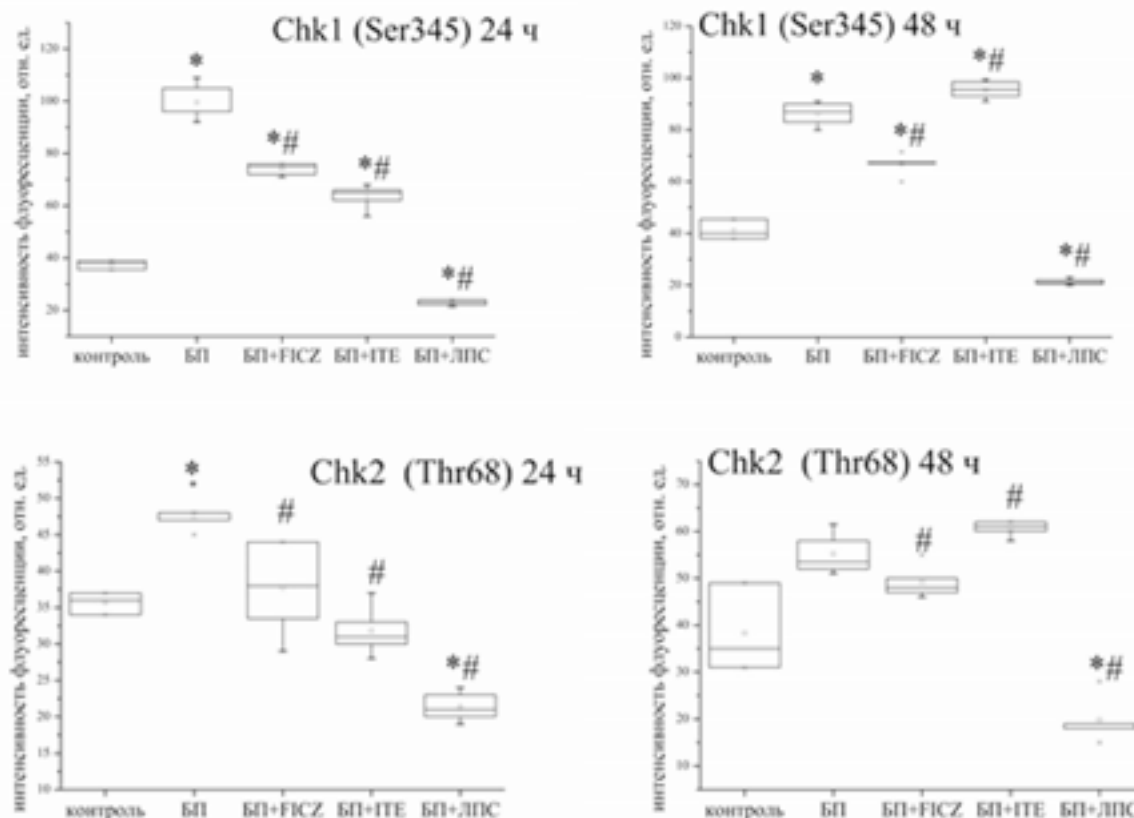


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции (диаграмма размаха, среднее, границы 1-3 квартилей) активных форм чекпойнт-киназ Chk1 (Ser345) и Chk2 (Thr68) в лизатах клеток НераRG через 24 ч и 48 ч после добавления БП, смеси БП+FICZ, смеси БП+ITE и смеси БП+ЛПС.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с БП (ANOVA).

мые уровни аддуктов БП с ДНК были выше, чем при действии одного БП [12,13].

При анализе изменений экспрессии генов в тканях легких мышей, экспонированных БП, ЛПС и смесью БП и ЛПС было установлено, что смесь БП и ЛПС снижает уровень мРНК генов Cyp1A1, эпоксидгидролазы, глутатион-S-трансферазы, SULT и повышает экспрессию генов UGT, β -глюкуронидазы, что способствует конвертации UGT-метаболитов в свободные формы, и также усиливает формирование БП-ДНК аддуктов на третьи сутки после экспонирования [14]. По нашим данным, гибель клеток после обработки смесью БП и ЛПС начинается уже на 1 сутки и система репарации фактически является «выключенной», что свидетельствует о масштабном повреждении ДНК, что согласуется с увеличением концентрации БП-ДНК аддуктов [13]. Изменение экспрессии генов 1 и 2 фазы метаболизма детоксикации ксенобиотиков в меньшей степени влияет на усиление токсичности смеси БП и ЛПС. По нашему мнению, токсичность БП усиливается в присутствии активаторов NF- κ B за счет увеличения доставки БП в ядро, с использованием цитоплазматически-ядерной транспортной системы доставки транскрипционного фактора в ядро. NF- κ B явля-

ется индуцибельным транскрипционным фактором, в интактных клетках локализован в цитоплазме в комплексе с ингибиторной субъединицей I κ B- α . При активации ингибиторная субъединица фосфорилируется ИКК комплексом, и быстро деградирует в протеасомах. Согласно данным иммунопреципитации, AhR и p65 субъединица NF- κ B, взаимодействуют, это взаимодействие усиливается в присутствии БП и разрушается в присутствии активаторов NF- κ B [15]. Согласно ранее предложенному механизму взаимодействия, часть AhR может находиться в комплексе с NF- κ B и ингибиторной субъединицей I κ B- α , взаимодействие может осуществляться через PAS домен, который также имеется у других белков семейства I κ B – c-Rel и RelB. ЛПС через TLR-рецептор быстро активирует ИКК комплекс, что приводит к деградации I κ B- α и разрушению комплекса AhR и NF- κ B. При разрушении комплекса AhR и NF- κ B БП может быстро попадать в ядро в составе транспортной системы транскрипционных факторов и вызвать масштабное повреждение ДНК, с которой не справляется система репарации. В итоге уже на первые сутки инкубации клетки гибнут по некротическому пути.

Нетоксичные высокоаффинные агонисты AhR конкурируют за рецептор с БП и снижают

вероятность попадания его в ядро, что приводит в более сильной активации сигналов к выживанию клетки (Akt) и менее выраженной активации белков, контролирующих клеточный цикл – чекпойнт-киназ и транскрипционного фактора p53. Снижение генотоксичности БП

в присутствии агонистов AhR приводит к меньшей гибели клеток на фоне токсического действия БП. Арилгидрокарбонный рецептор и его агонисты могут также рассматриваться как потенциальные мишени для противоопухолевой терапии [16].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Coates P.J., Lorimore S.A., Wright E.G. Cell and tissue responses to genotoxic stress. *J. Pathol.* 2005; 205(2): 221-35.
- Shimada T. Inhibition of carcinogen-activating cytochrome P450 enzymes by xenobiotic chemicals in relation to antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Toxicol. Res.* 2017; 33(2):79-96.
- Siddens L.K., Larkin A., Krueger S.K., et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: comparison of benzo[a]pyrene, dibenzo[def,p]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 264(3): 377-86.
- Niida H., Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis.* 2006; 21(1):3-9.
- Babakov V.N., Rogovskaya N.Yu., Kurdyukov I.D., Belyukov P.P., Dulov S.A., Radilov A.S. Влияние бенз(а)пирена и эндогенного агониста арил-гидрокарбонного рецептора FICZ на активацию транскрипционного фактора NF-κB и цитокинового секрета в клетках гепатомы человека линии HepaRG. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2018; 20(3): 432-438.
- Lübbert 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.
- Lin T., Yang M.S. Benzo[a]pyrene-induced necrosis in the HepG2 cells via PARP-1 activation and NAD⁺ depletion. *Toxicology.* 2008; 245(1-2): 147-153.
- Роговская Н. Ю., Бабаков В. Н. Маркеры апоптоза – молекулярные мишени токсического действия сернистого иприта. *Токсикологический вестник.* 2017; (5): 28-34.
- Волков М.С., Кобляков В.А. Активация транскрипционного фактора NF-κB в клетках гепатомы под действием канцерогенных полициклических ароматических углеводородов. *Цитология.* 2011; 53(5): 418-422.
- Smerdova L., Neca J., Svobodova J., Topinka J., Schmuczerova J., Kozubik A., et al. Inflammatory mediators accelerate metabolism of benzo[a]pyrene in rat alveolar type II cells: the role of enhanced cytochrome P450 1B1 expression. *Toxicology.* 2013; 314: 30-38.
- Uno S., Makishima M. Benzo[a]pyrene toxicity and inflammatory disease. *Curr. Rheumatol. Rev.* 2009; 5: 266-271.
- Arit V.M., Krais A.M., Godschalk R.W., Rizzo-Vasquez Y., Mrizova I., Roufosse et al. Pulmonary inflammation impacts on CYP1A1-mediated respiratory tract DNA damage induced by the carcinogenic air pollutant benzo[a]pyrene. *Toxicol. Sci.* 2015; 146: 213-225.
- Shi Q., Haenen G.R., Maas L., Arit V.M., Spina D., Vasquez Y.R., et al. Inflammation-associated extracellular beta-glucuronidase alters cellular responses to the chemical carcinogen benzo[a]pyrene. *Arch. Toxicol.* 2016; 90: 2261-2273.
- Shi Q., Fijten R.R., Spina D., Rizzo Vasquez Y., Arit V.M., Godschalk R.W., et al. Altered gene expression profiles in the lungs of benzo[a]pyrene-exposed mice in the presence of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017; 336:8-19.
- Voronov I., Li K., Tenenbaum H.C., Manolson M.F. Benzo[a]pyrene inhibits osteoclastogenesis by affecting RANKL-induced activation of NF-κB. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 75(10): 2034-2044.
- Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О., Кузин Б.А., Симонова О.Б. Арил-гидрокарбонный рецептор как потенциальная мишень для противораковой терапии. *Биомедицинская химия* 2018; 64(5): 397-415.
- Coates P.J., Lorimore S.A., Wright E.G. Cell and tissue responses to genotoxic stress. *J. Pathol.* 2005; 205(2):221-35.
- Shimada T. Inhibition of carcinogen-activating cytochrome P450 enzymes by xenobiotic chemicals in relation to antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Toxicol. Res.* 2017; 33(2):79-96.
- Siddens L.K., Larkin A., Krueger S.K., et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: comparison of benzo[a]pyrene, dibenzo[def,p]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 264(3): 377-86.
- Niida H., Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis.* 2006; 21(1):3-9.
- Babakov V.N., Rogovskaya N.Yu., 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-κB and the cytokine secretion in human hepatoma HepaRG cells. *Medicine of Extreme Situations.* 2018; 20(3): 432-438 (in Russian).
- Lübbert 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.
- Lin T., Yang M.S. Benzo[a]pyrene-induced necrosis in the HepG2 cells via PARP-1 activation and NAD⁺ depletion. *Toxicology.* 2008; 245(1-2): 147-153.
- Rogovskaya N.Yu., Babakov V.N. Apoptosis markers are molecular targets of sulfure mustard toxic action. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review).* 2017; (5): 28-34 (in Russian).
- Volkov M.S., Kobliakov V.A. Activation of transcription factor NF-κB by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Tsitologiya.* 2011; 53(5):418-22. (In Russian).
- Smerdova L., Neca J., Svobodova J., Topinka J., Schmuczerova J., Kozubik A., et al. Inflammatory mediators accelerate metabolism of benzo[a]pyrene in rat alveolar type II cells: the role of enhanced cytochrome P450 1B1 expression. *Toxicology.* 2013; 314: 30-38.
- Uno S., Makishima M. Benzo[a]pyrene toxicity and inflammatory disease. *Curr. Rheumatol. Rev.* 2009; 5: 266-271.
- Arit V.M., Krais A.M., Godschalk R.W., Rizzo-Vasquez Y., Mrizova I., Roufosse et al. Pulmonary inflammation impacts on CYP1A1-mediated respiratory tract DNA damage induced by the carcinogenic air pollutant benzo[a]pyrene. *Toxicol. Sci.* 2015; 146: 213-225.
- Shi Q., Haenen G.R., Maas L., Arit V.M., Spina D., Vasquez Y.R., et al. Inflammation-associated extracellular beta-glucuronidase alters cellular responses to the chemical carcinogen benzo[a]pyrene. *Arch. Toxicol.* 2016; 90: 2261-2273.
- Shi Q., Fijten R.R., Spina D., Rizzo Vasquez Y., Arit V.M., Godschalk R.W., et al. Altered gene expression profiles in the lungs of benzo[a]pyrene-exposed mice in the presence of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017; 336:8-19.
- Voronov I., Li K., Tenenbaum H.C., Manolson M.F. Benzo[a]pyrene inhibits osteoclastogenesis by affecting RANKL-induced activation of NF-κB. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 75(10): 2034-2044.
- Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Kuzin B.A., Simonova O.B. Aryl-hydrocarbon receptor as a potential target for anticancer therapy. *Biomed. Khim.* 2018; 64(5): 397-415 (in Russian).

V.N. Babakov, N.Yu. Rogovskaya, I.D. Kurdyukov, P.P. Belyukov, S.A. Dulov, A.S. Radilov

EFFECT OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR AGONISTS AND LIPOPOLYSACCHARIDE ON BENZO(A)PYRENE GENOTOXICITY MARKERS

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russian Federation

The effect of aryl hydrocarbon receptor agonists (FICZ and ITE), as well as lipopolysaccharide under the toxic action of benzo(a)pyrene in HepaRG human hepatoma cells was evaluated. Active forms of the key stress-activated kinase cascades and DNA repair system proteins were used as markers of the genotoxic action of benzo(a)pyrene. A mixture of lipopolysaccharide with benzo(a)pyrene increases benzo(a)pyrene cytotoxicity and reduces the activation of DNA repair system proteins below the control level. Aryl hydrocarbon receptor agonists (FICZ and ITE) exhibit a cytoprotective effect against benzo(a)pyrene, enhance Akt1 kinase activation, and downregulate activation of the p53 protein and Chk1 and Chk2 checkpoint kinases. Thus, FICZ and ITE reduce the genotoxicity of benzo(a)pyrene.

Keywords: polyaromatic hydrocarbons, benzo(a)pyrene, aryl hydrocarbon receptor, HepaRG, NF-κappaB, genotoxicity.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.