

Особенности и количественные характеристики взаимодействия бензо[а]пирена с фракциями липопротеинов плазмы крови человека

Л.М. Поляков, Р.А. Князев, М.В. Котова, Е.И. Соловьёва, А.В. Рябченко

*НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Резюме

В работе рассмотрены особенности и количественные характеристики взаимодействия липопротеинов низкой (ЛПНП), очень низкой (ЛПОНП) и высокой (ЛПВП) плотности с полициклическим ароматическим углеводородом бензо[а]пиреном (Б[а]П). **Материал и методы.** Исследования выполнены с использованием препаративного ультрацентрифугирования фракций липопротеинов плазмы крови человека и флуоресцентной спектроскопии. **Результаты.** Приведены спектральные характеристики триптофановой флуоресценции фракций ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП при титровании раствором Б[а]П. Взаимодействие фракций ЛП с Б[а]П сопровождалось тушением флуоресценции триптофанилов: наибольшее снижение флуоресценции при насыщающих концентрациях Б[а]П отмечено для фракции ЛПВП – свыше 80 % от исходного уровня, слабее эффект Б[а]П был выражен для ЛПНП (65–74 %) и для ЛПОНП (50–60 %). На основании результатов кривых тушения триптофановой флуоресценции и с учетом молекулярных масс получены количественные характеристики взаимодействия фракций ЛП с Б[а]П: константы ассоциации были порядка $(1,3–2,5) \times 10^{-6}$ М, а количество мест связывания для Б[а]П на частицах ЛП составило от 19 для ЛПВП и до 43 для ЛПОНП. **Заключение.** Полученные для комплексов ЛП с Б[а]П количественные характеристики взаимодействия позволяют считать ЛП плазмы крови реальными транспортными формами для Б[а]П и других гидрофобных соединений в клетки органов и тканей организма.

Ключевые слова: бензо[а]пирен, липопротеины очень низкой плотности, липопротеины низкой плотности, липопротеины высокой плотности, плазма крови, флуоресцентная спектрометрия.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Автор для переписки: Поляков Л.М., e-mail: plm@niibch.ru

Для цитирования: Поляков Л.М., Князев Р.А., Котова М.В., Соловьёва Е.И., Рябченко А.В. Особенности и количественные характеристики взаимодействия бензо[а]пирена с фракциями липопротеинов плазмы крови человека. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (2): 28–32. doi: 10.18699/SSMJ20210204

Features and quantitative characteristics of the interaction of benzo[a]pyrene with fractions of the human blood plasma lipoproteins

L.M. Polyakov, R.A. Knyasev, M.V. Kotova, E.I. Coloveva, A.V. Ryabchenko

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

Abstract

The paper considers the features and quantitative characteristics of the interaction of human blood plasma low (LDL), very low (VLDL) and high density lipoproteins (HDL) with a polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene (B[a]P). **Material and methods.** The studies were performed using preparative ultracentrifugation of human plasma lipoprotein fractions and fluorescence spectroscopy. **Results.** The spectral characteristics of tryptophan fluorescence of VLDL, LDL and HDL fractions during titration with B[a]P solution are presented. The interaction of LP fractions with B[a]P was accompanied by quenching of tryptophanil fluorescence: the greatest decrease in fluorescence at saturating concentra-

tions of B[a]P was noted for the HDL fraction — over 80 %; the effect of B[a]P was weaker for LDL (65–74 %) and for VLDL (50–60 %) of the initial level. Based on the results of the tryptophan fluorescence quenching curves and taking into account the molecular weights, quantitative characteristics of the interaction of the LP fractions with B[a]P were obtained: the association constants were of the order of $(1.3 - 2.5) \times 10^{-6}$ M, and the number of binding sites for B[a]P on LP particles ranged from 19 for HDL and up to 43 for VLDL. **Conclusion.** The quantitative characteristics of the interaction obtained for the complexes of LP with B[a]P allow us to consider the LP of blood plasma as real transport forms for B[a]P and other hydrophobic compounds into the cells of organs and tissues of the body.

Key words: benzo[a]pyrene, very low density lipoproteins, low density lipoproteins, high density lipoproteins, blood plasma, fluorescence spectroscopy.

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

Correspondence author: Polyakov L.M., e-mail: plm@niibch.ru

Citation: Polyakov L.M., Knyasev R.A., Kotova M.V., Soloveva E.I., Ryabchenko A.V. Features and quantitative characteristics of the interaction of benzo[a]pyrene with fractions of the human blood plasma lipoproteins. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (2): 28–32. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210204

Введение

Полициклические ароматические углеводороды являются опасными стойкими загрязнителями окружающей среды, большинство из них обладает мутагенными, канцерогенными и тератогенными свойствами [1]. К ним относится и полициклический ароматический углеводород бензо[а]пирен (Б[а]П), который образуется при неполном сгорании древесины, каменного угля, автомобильного топлива [2, 3], а также в процессе термической обработки пищи, включая жарку, копчение и т.д. [4]. Существует представление, что из плазмы крови Б[а]П и его липофильные метаболиты путем пассивной диффузии легко проникают в клетку [5, 6], где могут взаимодействовать с лиганд-активируемым транскрипционным фактором – арил-гидрокарбонным рецептором [7].

Однако следует заметить, что существует и другая точка зрения. По разным источникам, основная часть Б[а]П в плазме крови связана с ЛП [7, 8]. По нашим данным, в плазме крови крыс более 80 % радиоактивности гидрофобных соединений (бензантрацен, Б[а]П) транспортируется в составе различных фракций ЛП [9]. Все это свидетельствует о том, что в отличие от пассивной диффузии через клеточную мембрану Б[а]П может попадать в клетку посредством рецепторно-обусловленного эндоцитоза в составе комплексов с ЛП-фракциями плазмы крови [10–12]. В настоящей работе представлены особенности и количественные характеристики взаимодействия Б[а]П с фракциями ЛП плазмы крови человека.

Материал и методы

В работе использовали Б[а]П в виде порошка (Sigma-Aldrich, США). Маточный раствор Б[а]П

готовили в ацетонитриле (250 мг/л), рабочие растворы получали путем последовательных разведений в концентрации от 1000 до 100 мкг/л. Фракции ЛП из плазмы крови человека выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования в растворах КВг в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na₂ на центрифуге OptimaL-90K (Beckman-Coulter, Австрия) с использованием ротора 70.1Ti [13]. Получали три основные фракции липопротеинов: очень низкой (ЛПОНП, $0,94 < d < 1,006$ г/мл), низкой (ЛПНП, $1,006 < d < 1,063$ г/мл), высокой (ЛПВП, $1,063 < d < 1,21$ г/мл) плотности и фракцию инфранатанта с плотностью более 1,21 г/мл.

Расчет констант образования (ассоциации) комплексов ЛП-Б[а]П осуществляли методом тушения триптофановой флуоресценции [14]. Титрование проводили в термостатируемой кювете при температуре 20 °С с добавлением аликвот раствора (1 мМ) Б[а]П (по 2 мкл) к 2 мл фракции ЛП. При расчетах учитывали средние молекулярные массы ЛП-частиц плазмы крови человека: ЛПВП – 300×10^3 Да, ЛПНП – 3×10^6 Да, ЛПОНП – 6×10^6 Да. Содержание белка в данных фракциях принимали за 50, 20 и 10 % соответственно. Измерения проводили на спектрофлуориметре RF-5301PC (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 285 нм и эмиссии в диапазоне от 300 до 600 нм. Концентрацию белка определяли с использованием спектрофотометра Evolution 300 («Thermo Fisher Scientific», США). Спектрометрические измерения проводили с использованием оборудования ЦКП «Спектрометрические измерения» (НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск).

Результаты

Из рисунка, на котором приведены спектральные характеристики триптофановой флу-

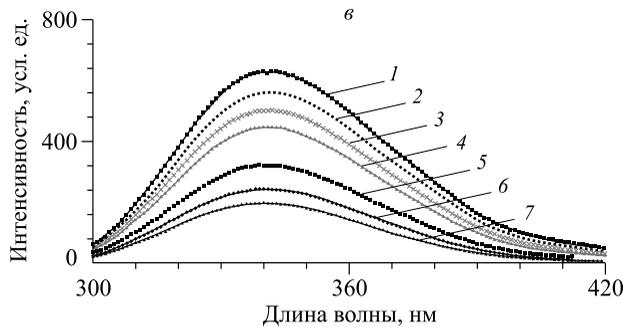
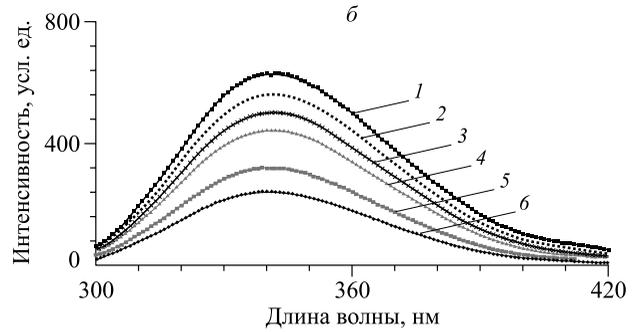
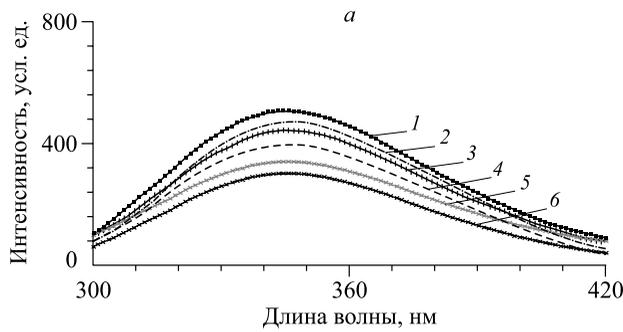


Рис. Кривые спектра триптофановой флуоресценции ЛПОНП (а), ЛПНП (б) и ЛПВП (в) при титровании раствором Б[а]П. 1 – исходная величина флуоресценции; 2–7 – величины флуоресценции после добавления аликвот Б[а]П

Fig. Curves of VLDL (a), LDL (б) and HDL (в) tryptophan fluorescence spectrum when titrated with a solution of B[a]P. 1 – initial value of fluorescence; 2–7 – values of fluorescence after adding aliquots of B[a]P

оресценции фракций ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП при титровании раствором Б[а]П, видно, что их взаимодействие с Б[а]П сопровождалось тушением флуоресценции триптофанилов. При этом форма спектров, их полуширина практически не изменялись. Наблюдался небольшой сдвиг в длинноволновую область спектра, что объясняется локальными конформационными перестройками белкового компонента ЛП после взаимодействия его с Б[а]П. Следует отметить, что наибольшее снижение флуоресценции при насыщающих концентрациях Б[а]П отмечено для фракции ЛПВП – около 80 %. Несколько слабее этот эффект был выражен для ЛПНП и ЛПОНП (на 65–74 и 50–60 % от исходного уровня).

Изучение временной зависимости тушения флуоресценции при одномоментном добавлении насыщающих количеств Б[а]П к фракциям ЛП показало, что практически полное насыщение связывающих областей ЛП-фракций лигандом наблюдалось через 30 мин инкубации. При анализе кривых тушения триптофановой флуоресценции и с учетом молекулярных масс получены количественные характеристики взаимодействия фракций ЛП с Б[а]П: величины констант ассоциации (K_{acc}) и число центров связывания (таблица). Молекулярные массы ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНП принимались за 300, 3000 и 6000 кДа соответственно. Константы ассоциации были порядка $(1,3–2,5) \times 10^{-6}$ М, а количество мест связывания для Б[а]П на частицах ЛП составило от 19 (для ЛПВП) до 43 (для ЛПОНП).

Таблица. Константы ассоциации (K_{acc}) и количество мест связывания для фракций ЛП плазмы крови человека при взаимодействии с Б[а]П

Table. Association constants (K_{acc}) and the number of binding sites (n) for fractions of human plasma LP when interacting with B[a]P

Класс ЛП	K_{acc}	Число мест связывания
ЛПОНП	$(1,7 \pm 0,43) \times 10^{-6}$	43
ЛПНП	$(1,3 \pm 0,28) \times 10^{-6}$	27
ЛПВП	$(2,5 \pm 0,72) \times 10^{-6}$	19

Примечание. Приведены средние значения после серии из четырех измерений.

Обсуждение

Характер распределения многих липофильных ксенобиотиков между фракциями ЛП, а также связывание их с альбумином сыворотки крови зависят от целого ряда факторов, в том числе от жирорастворимости вводимого соединения: чем оно липофильнее, тем в большей степени связывается фракциями ЛП и в меньшей степени – альбумином [12]. При этом вклад белкового и липидного компонента во взаимодействие с гидрофобными лигандами может различаться в зависимости от класса ЛП, индивидуальных характеристик входящих в их состав белковых молекул, состава липидной фазы и, конечно, от свойств самих ли-

гандов. Константы взаимодействия Б[а]П с ЛП, близкие к обнаруженным в настоящем исследовании, установлены нами ранее для фракций ЛП сыворотки крови крыс [9]. Полученные величины K_{acc} свидетельствуют, что данные комплексы характеризуются недостаточно высоким сродством, и поэтому такое взаимодействие нельзя характеризовать как высокоспецифическое. Однако следует заметить, что на сегодняшний день имеются данные о возможности реализации биологически значимых эффектов комплексов ЛП и стероидных гормонов с K_{acc} аналогичного порядка [15]. Основываясь на этом, можно предположить, что и в данном случае связанный с ЛП Б[а]П попадает в клетки органов и тканей путем рецептор-обусловленного эндоцитоза, а невысокая специфичность образованных комплексов будет даже способствовать «освобождению» Б[а]П внутри клетки и дальнейшей реализации его патогенного эффекта.

В настоящей работе мы представили особенности и количественные характеристики взаимодействия Б[а]П с фракциями ЛП плазмы крови человека в представлении «рецептор – лиганд». В связи с вышесказанным следует обратить внимание и на обратную сторону такого взаимодействия – на непосредственное воздействие самого Б[а]П на липидный обмен, в частности, через влияние на метаболизм ЛП путем ингибирования экспрессии мРНК рецепторов ЛПНП, липолиз-стимулирующего рецептора и АТФ-связанного рецептора АВСА1 в печени [16]. Полученные в настоящей работе результаты, на наш взгляд, требуют дальнейшего продолжения исследования в данном направлении. Непосредственное участие ЛП и их белковых компонентов во внутриклеточном транспорте и метаболизме Б[а]П и других липофильных полициклических ароматических углеводородов позволяет расширить представление о механизмах регуляции ферментов микросомальной системы окисления, а также глубже понять патогенетические механизмы возникновения и развития химически индуцированных опухолей.

Список литературы / References

1. Page D., Boehm P.D., Douglas G.S., Bence A.E., Burns W.A., Mankiewicz P.J. Pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments record past human activity: a case study in Prince William Sound, Alaska. *Mar. Pollut. Bul.* 1999; 38 (4): 247–260.
2. Bostrom C.E., Gerde P., Hanberg A., Jernstrom B., Johansson C., Kyrklund T., Rannug A., Törnqvist M., Victorin K., Westerholm R. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic

aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* 2002; 110 (3): 451–488. doi: 10.1289/ehp.110-1241197

3. Brevik A., Lindeman B., Rusnakova V., Olsen A.K., Brunborg G., Duale N. Paternal benzo[a]pyrene exposure affects gene expression in the early developing mouse embryo. *Toxicol. Sci.* 2012; 129 (1): 157–165. doi: 10.1093/toxsci/kfs187

4. Moffat I., Chepelev N., Labib S., Bourdon-Lacombe J., Kuo B., Buick J.K., Lemieux F., Williams A., Halappanavar S., Malik A., Luijten M., Aubrecht J., Hyduke D.R., Fornace A.J. Jr, Swartz C.D., Recio L., Yauk C.L. Comparison of toxicogenomics and traditional approaches to inform mode of action and points of departure in human health risk assessment of benzo[a]pyrene in drinking water. *Crit. Rev. Toxicol.* 2015; 45 (1): 1–43. doi: 10.3109/10408444.2014.973934

5. Castelli F., Librando V., Sarpietro M.G. Calorimetric approach of the interaction and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons with model membranes. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36 (12): 2717–2723. doi: 10.1021/es010260w

6. Verma N., Pink M., Petrat F., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S. Exposure of primary porcine urothelial cells to benzo(a)pyrene: in vitro uptake, intracellular concentration, and biological response. *Arch. Toxicol.* 2012; 86 (12): 1861–1871. doi: 10.1007/s00204-012-0899-y

7. Safe S., Lee S.O., Jin U.H. Role of the arylhydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target. *Toxicol. Sci.* 2013; 135 (1): 1–16. doi: 10.1093/toxsci/kft128

8. Vauhkonen M., Kuusi T., Kinnunen P.K. Serum and tissue distribution of benzo[a]pyrene from intravenously injected chylomicrons in rat *in vivo*. *Cancer Lett.* 1980; 11 (2): 113–119. doi: 10.1016/0304-3835(80)90101-9

9. Polyakov L.M., Chasovskikh M.I., Panin L.E. Binding and treatment of benzo(a)pyrene by blood plasma lipoproteins: The possible role of apolipoprotein B in this process. *Bioconjug. Chem.* 1996; 7 (4): 396–400. doi: 10.1021/bc960005e

10. Поляков Л.М., Князев Р.А., Рябченко А.В., Котова М.В., Трифонова Н.В. Липопротеины крови как платформа для транспорта гидрофильных и гидрофобных соединений. *Сиб. науч. мед. ж.* 2019; 39 (4): 30–36. doi: 10.15372/SSMJ20190404

- Polyakov L.M., Knyazev R.A., Ryabchenko A.V., Kotova M.V., Trifonova N.V. Blood lipoproteins as a platform for transport of hydrophilic and hydrophobic compounds. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2019; 39 (4): 30–36. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190404

11. Brown M.S., Goldstein J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by

proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997, 89 (3): 331–340. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80213-5

12. Shu H.P., Bymun E.N. Systemic excretion of benzo(a)pyrene in the control and microsomally induced rat: the influence of plasma lipoproteins and albumin as carrier molecules. *Cancer Res*. 1983; 43 (2): 485–90.

13. Busbee D.L., Norman J.O., Ziprin R.L. Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Arch. Toxicol*. 1990; 64: 285–290. doi: 10.1007/bf01972988

14. Hatch F.T., Lees R.S. Practical method for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res*. 1968; 6: 2–68. doi: 10.1016/B978-1-4831-9942-9.50008-5

15. Поляков Л.М., Суменкова Д.В., Князев Р.А., Панин Л.Е. Анализ взаимодействия липопротеинов

и стероидных гормонов. *Биомед. химия*. 2011; 57 (3): 308–313. doi: 10.18097/pbmc20115703308

Polyakov L.M., Sumenkova D.V., Knyazev R.A., Panin L.E. The analysis of interaction lipoproteins and steroid hormones. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*. 2011; 57 (3): 308–313. [In Russian]. doi: 10.18097/pbmc20115703308

16. Layeghkhavidaki H., Lanhers M.-C., Akbar S., Lynn G-P., Thierry O., Grova N., Appenzeller B., Jasniewski J., Feidt C., Corbier C., Yen F.T. Inhibitory action of benzo[*a*]pyrene on hepatic lipoprotein receptors *in vitro* and on liver lipid homeostasis in mice. *PLoS One*. 2014; 9 (7): e102991. doi: 10.1371/journal.pone.0102991

Сведения об авторах:

Лев Михайлович Поляков, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0001-5905-8969, e-mail: plm@niibch.ru

Роман Александрович Князев, к.б.н., ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru

Мария Владимировна Котова, ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru

Елена Игоревна Соловьёва, e-mail: klena01@gmail.com

Александр Владимирович Рябченко, к.б.н., ORCID: 0000-0002-1658-4982, e-mail: borrelia@mail.ru

Information about the authors:

Lev M. Polyakov, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0001-5905-8969, e-mail: plm@niibch.ru

Roman A. Knyazev, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru

Marya V. Kotova, ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru

Elena I. Soloveva, e-mail: klena01@gmail.com

Aleksandr V. Ryabchenko, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-1658-4982, e-mail: borrelia@mail.ru

Поступила в редакцию 17.10.2020

После доработки 13.10.2020

Принята к публикации 05.11.2020

Received 17.10.2020

Revision received 13.10.2020

Accepted 05.11.2020