

# Индукцию тирозинаминотрансферазы у мышей ингибируют активированные метаболиты орто-аминоазотолуола

В.И. Каледин<sup>1</sup>, С.И. Ильницкая<sup>1</sup>, Н.А. Попова<sup>1</sup>, О.А. Коваль<sup>2</sup>, И.А. Пышная<sup>2</sup>, Л.Ф. Гуляева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; <sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; <sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, Россия

Аминоазокрасители и другие гепатоканцерогенные вещества ингибируют глюкокортикоидную индукцию адаптивных ферментов печени, в том числе тирозинаминотрансферазы (TAT), в печени мышей и крыс. Имеется определенное соответствие между величиной ингибирующего влияния на индукцию TAT и канцерогенностью соединения для печени данных животных. Если развитие опухолей, как предполагают, вызывают не сами применяющиеся канцерогены, а их активированные метаболиты, возникает вопрос, ингибируют ли индукцию ферментов также активированные метаболиты канцерогенов или это делают исходные соединения. Мы попытались ответить на этот вопрос. Были использованы инбредные мыши, различающиеся по чувствительности как к канцерогенному, так и к антиглюкокортикоидному (ингибирующему индукцию TAT) действию специфичного для мышей гепатоканцерогена орто-аминоазотолуола (OAT), в серии экспериментов с изменением статуса половых и глюкокортикоидных гормонов (удалением половых желез и надпочечников), а также с введением ингибиторов (CoCl<sub>2</sub>, пентахлорфенол) и индукторов (3,4-бензпирен, 20-метилхолантрен, ароклор 1254) активности ферментов метаболизма ксенобиотиков) и др. Полученные результаты однозначно свидетельствуют о том, что глюкокортикоидную индукцию TAT у мышей ингибируют активированные метаболиты (метаболит) OAT, а не исходное соединение. При этом неспецифические генотоксические агенты, такие как цисплатин и циклофосфамид, не оказывают влияния на индукцию TAT глюкокортикоидными гормонами. Массовость (индукция фермента подавляется практически в каждой экспрессирующей его клетке) и быстрая обратимость этого вызываемого канцерогеном антиглюкокортикоидного эффекта указывают на то, что он осуществляется не на генетической, а на эпигенетической основе.

**Ключевые слова:** мыши, орто-аминоазотолуол, тирозинаминотрансфераза, индукция и ингибирование активности ферментов.

## Induction of tyrosine aminotransferase in mice is inhibited by activated metabolites of ortho-aminoazotoluene

V.I. Kaledin<sup>1</sup>, S.I. Ilnitskaya<sup>1</sup>, N.A. Popova<sup>1</sup>, O.A. Koval<sup>2</sup>, I.A. Pyshnaya<sup>2</sup>, L.F. Gulyaeva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia; <sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia; <sup>3</sup> Institute of Molecular Biology and Biophysics SB RAMS, Novosibirsk, Russia

Aminoazo dyes and other hepatocarcinogenic substances inhibit glucocorticoid-mediated induction of adaptive enzymes, including tyrosine aminotransferase (TAT), in mouse and rat liver. There is a specific relationship between the effect of a carcinogen on TAT induction and its liver carcinogenicity in animals. Presuming tumor development being initiated not directly by the chemicals employed but their metabolically activated derivatives, the question arises whether TAT induction is inhibited by carcinogen metabolites or by their parent compounds. The goal of this paper is to shed some light on the issue. Mouse strains differing in the sensitivity to both carcinogenic and antiglucocorticoid (TAT induction inhibitory) effects of the mouse-specific carcinogen ortho-aminoazotoluene (OAT) underwent a set of experimental procedures: ablation of gonadal and adrenal glands, administration of inhibitors (CoCl<sub>2</sub>, pentachlorophenol), inducers (3,4-benzopyrene, Aroclor 1254, 20-methylcholanthrene) of xenobiotic-metabolizing enzyme activities, and others. The results unequivocally confirm that glucocorticoid induction of TAT activity in mouse liver is inhibited by activated metabolite(s) of OAT rather than by its intact molecules. In contrast, nonspecific genotoxic agents such as cyclophosphamide and cisplatin exert no effect on TAT induction by glucocorticoids. The wide occurrence (practically in each TAT-expressing

hepatocyte) and rapidly reversible inhibition of enzyme induction by the carcinogen point to the epigenetic nature of this phenomenon.

Key words: mice, ortho-aminoazotoluene, tyrosine aminotransferase, enzyme induction and inhibition.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Каледин В.И., Ильницкая С.И., Попова Н.А., Коваль О.А., Пышная И.А., Гуляева Л.Ф. Индукцию тирозинаминотрансферазы у мышей ингибируют активированные метаболиты орто-аминоазотолуола. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):136-143.

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Kaledin V.I., Il'nitskaya S.I., Popova N.A., Koval O.A., Pyshnaya I.A., Gulyaeva L.F. Induction of tyrosine aminotransferase in mice is inhibited by activated metabolites of ortho-aminoazotoluene. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):136-143.

Канцерогенные аминозокрасители характеризуются выраженной видовой и органной специфичностью действия: они вызывают опухоли почти исключительно в печени мышей и крыс и не вызывают их в других органах и у животных других видов. Из множества производных аминозобензола (АБ) наиболее активными в канцерогенном отношении для крыс являются *N,N*-диметил-4-аминозобензол (ДАБ) и его 3'-метильное производное (3'-МеДАБ), а для мышей – 2',3-диметил-4-аминозобензол (по старой номенклатуре орто-аминоазотолуол, ОАТ). При этом мыши разных генотипов неодинаково чувствительны к действию ОАТ: вызывая опухоли у 100 % животных одних линий (DD, CBA, SWR, PT), он слабо влияет на других (AKR, BALB/c, CC57BL) (Каледин и др., 1984; Морозкова и др., 2014).

Уже почти 50 лет назад было обнаружено, что у крыс, получавших ДАБ, заметно снижается уровень глюкокортикоидной индукции адаптивных ферментов печени тирозинаминотрансферазы (ТАТ) и триптофандиоксигеназы (Anderson et al., 1966; Kizer et al., 1969). Подобное влияние на индукцию этих ферментов у крыс было показано для афлатоксина В1 (Wogan, Friedman, 1968), этионина и стеригматоцистина (Horikoshi et al., 1988), и у мышей – для ОАТ (Каледин и др., 1979; Каледин, Захарова, 1984) и эстрагола (Каледин и др., 2009). При этом в последнем случае наблюдалась положительная связь между влиянием канцерогенов на индукцию ТАТ и чувствительностью мышей к их гепатоканцерогенному действию (Каледин и др., 1979, 2010; Каледин, Захарова, 1984; Морозкова и др., 2014). С учетом литературных данных о видовой и органной специфичности действия канцерогенов это создавало впечатление, что имеется определенный параллелизм между способностью соединений вызывать образование опухолей в печени и подавлять в ней индукцию адаптивных ферментов глюкокортикоидами, т. е. между их гепатоканцерогенным и антиглюкокортикоидным эффектами. В таком случае изучение механизма действия канцерогенов на индукцию ферментов могло пролить некоторый свет и на механизм их канцерогенного действия. Первое, что, очевидно, следовало выяснить в этом плане, был

вопрос о том, вызываются ли опухолеиндуцирующий и антиглюкокортикоидный эффекты канцерогенов теми же самыми или разными их молекулярными формами. Относительно азокрасителей и канцерогенов ряда других классов (нитрозаминов, полициклических углеводородов, ароматических аминов) в литературе утвердилось мнение, что развитие опухолей вызывают не сами эти соединения, а их активированные метаболиты (Турусов и др., 2004). Поэтому в настоящей работе мы предприняли попытку выяснить, исходное соединение или активированные метаболиты ОАТ ответственны за ингибирование им глюкокортикоидной индукции ТАТ в печени чувствительных мышей.

#### Материалы и методы

В работе использованы ОАТ (фирма «ICN» США), ацетат гидрокортизона и лецитин (объединение «Здоровье», Украина), 3,4-бензпирен («FERAK», ФРГ), дексаметазон-21-фосфат («ICN», США), 20-метилхолантрен, цисплатин (cis-diammineplatinum(II) dichloride), этоксирезорурфин и метоксирезорурфин (все – «Sigma», США), ароклор 1254 («SUPELCO», США), альфа-кетоглутаровая кислота («Serva», ФРГ). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации «х.ч.» и «о.с.ч.».

Использованные в работе животные – взрослые и подсосные (12–14-дневные) мыши-самцы линий ICR, DD, CBA, PT и CC57BR – были получены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Их содержали группами по 6–10 особей в пластиковых ванночках площадью 20 × 36 см при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище (полнорационные брикеты ПК 120-1 и «Чара», AGRO RU, Россия). Все манипуляции с мышами проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive (86/609 EEC)).

Для увеличения активности микросомальных монооксигеназ их индукторы – 20-метилхолантрен (МХ), 3,4-бензпирен (БП) и Ароклор 1254 – в виде растворов в оливковом масле вводили животным внутривентрально (в/б) в дозах 80, 100, и 250 мг/кг массы тела соответственно за 2–5 сут до введения канцерогена. Для подавления активности цитохрома P450 использовали

$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{CoCl}_2$ ), а для ингибирования сульфотрансферазы – пентахлорфенол (ПХФ). Водный раствор  $\text{CoCl}_2$  вводили под кожу спины трижды по 50 мг/кг за 72, 48 и 24 ч, а ПХФ в оливковом масле – однократно в/б в дозе 11–14 мг/кг за 45 мин до введения ОАТ.

Влияние  $\text{CoCl}_2$  на содержание цитохрома P450 и активность ферментов печени изучали в экспериментах, в которых микросомы выделяли дифференциальным центрифугированием, а концентрацию P450 и активность его изоформ *сyp1a1* и *сyp1a2*, имеющих отношение к метаболизму ОАТ (Mikhailova et al., 2005), определяли, как указано в работе В.И. Каледина с соавт. (1999), с использованием в качестве функциональных маркеров 7-метоксирезорифин-О-деметилазы (7-МРОД) и 7-этоксирезорифин-О-деэтилазы (7-ЭРОД).

В большинстве экспериментов ОАТ использовали в виде 0,1 М раствора в оливковом масле, который вводили в/б однократно по 1 мл на 100 г массы тела животных за 19–20 ч до индукции ТАТ. Это обеспечивало дозу ОАТ 225 мг/кг. Эту дозу в отдельных экспериментах кратно увеличивали или уменьшали (см. при описании результатов). Циклофосфамид и цисплатин вводили мышам в/б в дозах 100 и 4 мг на кг массы тела соответственно за 19 ч до индукции фермента. При приготовлении липосом к спиртовому раствору фосфатидилхолина добавляли ОАТ (в соотношении 3:1), смесь выпаривали под вакуумом и высушенную пленку гидратировали в физиологическом растворе NaCl при механическом встряхивании. Образовавшуюся суспензию расфасовывали в ампулы, замораживали и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Перед использованием суспензию липосом разбавляли физиологическим раствором до содержания ОАТ 12 мг/мл и вводили мышам в латеральную хвостовую вену (по 1 мл на 100 г массы тела) за 30 мин до индукции ТАТ.

Индукцию ТАТ осуществляли введением гидрокортизона в/б в дозе 50 мг/кг или дексаметазон-фосфата в дозе 5 мг/кг массы тела. Через 5 ч после индукции мышей умерщвляли декапитацией, печень гомогенизировали в 1,15 %-м растворе KCl, центрифугировали 30 мин при 9 тыс. г и в индивидуальных супернатантах определяли активность ТАТ по методу Дيامондстона, как описано ранее (Каледин, Захарова, 1984). Активность фермента выражали в мкмоль пара-гидроксибензилпирувата на 100 мг белка/ч. Концентрацию белка определяли по методу Лоури.

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием t-критерия Стьюдента.

## Результаты

### Динамика влияния орто-аминоазотолуола на глюкокортикоидную индукцию тирозинаминотрансферазы

В отличие от индукции опухолей, требующей длительного присутствия канцерогена в организме, следователь-

но, многократного введения его животным, влияние на гормональную регуляцию активности ферментов хорошо выявляется и может быть изучено при однократном применении канцерогенов. При выяснении вопроса о том, является ли в этом случае действующим началом исходное соединение или продукты его метаболизма, осложняющим обстоятельством оказалась высокая гидрофобность ОАТ, обуславливающая его медленное всасывание из масляных растворов, которое протекает на фоне индукции адаптивных ферментов эндогенными гормонами, вызванной инъекционным стрессом. Все это не может не сказываться на динамике активности ТАТ при ее индукции экзогенным глюкокортикоидом после введения ОАТ.

Как показано в табл. 1, в ближайшие полчаса после введения ОАТ уровень индукции ТАТ у чувствительных мышей линии DD довольно слабо отличается от контроля, а у резистентных (CC57BR) может даже превышать контрольный уровень, чего не наблюдается у адреналэктомированных животных. По мере увеличения срока между введением ОАТ и гидрокортизона уровень индукции фермента заметно снижается (у чувствительных мышей более чем в 2 раза по сравнению с контролем) и в дальнейшем медленно восстанавливается, возвращаясь к норме через 2–4 недели (табл. 2). При подкожном введении влияние ОАТ на индукцию ТАТ развивается медленнее и длится несколько дольше, чем при внутрибрюшинном, что, очевидно, обусловлено более медленным его всасыванием. Напротив, увеличение дозы канцерогена сверх оптимальной (225 мг/кг) при внутрибрюшинном введении не приводит к увеличению ингибирующего влияния на индукцию ТАТ (рис. 1). Как морфологическое, так и биохимическое исследование (по активности в крови аланинаминотрансферазы) показало, что ингибирующее индукцию ТАТ влияние ОАТ не обусловлено его токсическим действием на печень (Timofeeva et al., 2008). Это влияние может лимитироваться: а) количеством всосавшегося ОАТ; б) количеством его активированного метаболита, если действует таковой, и в) насыщением реагирующей системы действующим началом. Выяснить, является ли это действующее начало исходным соединением или его метаболитом, можно при изучении влияния на антиглюкокортикоидный эффект ОАТ ингибиторов и индукторов ферментов его метаболизма.

### Влияние индукции ферментов метаболизма орто-аминоазотолуола на его антиглюкокортикоидное действие

Метаболическая активация аминоазокрасителей в печени осуществляется через их первичное окисление, катализируемое микросомальными монооксигеназами (цитохромом P450), и этерификацию N-гидроксипроизводных в реакциях второй фазы метаболизма ксенобиотиков главным образом через сульфоконъюгацию

**Таблица 1.** Влияние орто-аминоазотолуола на последующую индукцию ТАТ гидрокортизоном у нормальных и адреналэктомированных мышей

Группы опыта (линия и статус мышей)	Активность ТАТ в печени при индукции через 30 мин или 19 ч после введения масла (контроль) или ОАТ			
	Индукция гидрокортизоном через 30 мин		Индукция гидрокортизоном через 19 ч	
	мкмоль – ГПФ <sup>#</sup> на 100 мг белка/ч	% от контроля	мкмоль – ГПФ <sup>#</sup> на 100 мг белка/ч	% от контроля
CC57BR масло (контроль)	78 ± 6,6 (3)	100	74 ± 1,8 (4)	100
CC57BR ОАТ	107 ± 3,7* (3)	137,2	68 ± 5,4 (4)	91,8
CC57BR адреналэктомированные масло (контроль)	97 ± 4,0 (3)	100	–	–
CC57BR адреналэктомированные ОАТ	97 ± 7,0 (3)	0	–	–
DD масло (контроль)	113 ± 4,5 (4)	100	114 ± 3,0 (4)	101
DD ОАТ	93 ± 1,5** (4)	82,3	63 ± 1,9*** (4)	55,3

В скобках указано число животных. <sup>#</sup> ГПФ – п-гидроксифенилпируват. Достоверное отличие от контроля: \*  $p < 0,5$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Таблица 2.** Влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ у мышей линии DD в зависимости от времени и способа введения канцерогена

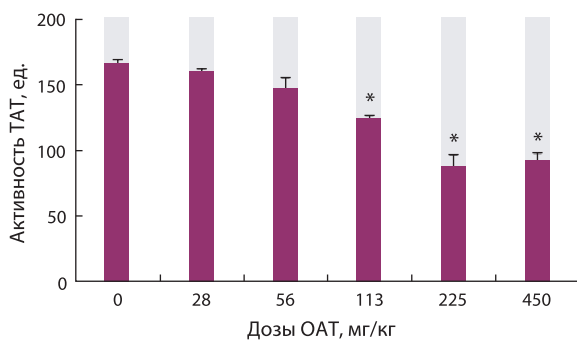
Время после введения ОАТ, сут	Активность ТАТ (% от контроля). Индукция после введения ОАТ	
	в брюшную полость	подкожно
0 (контроль)	100 ± 5,5	100 ± 3,2
1	62 ± 1,9***	–
7	–	73 ± 2,0***
14	95 ± 3,0	76 ± 4,8**
28	98 ± 5,0	89 ± 4,8

В каждой группе по 6 животных. Доза ОАТ в обоих случаях – 225 мг/кг массы тела. Достоверное отличие от контроля: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

(Каледин и др., 1999; Турусов и др., 2004). Поэтому на первом этапе исследования мы изучили влияние индукции ферментов первичного окисления ОАТ на его антиглюкокортикоидное действие. С этой целью использовали известные индукторы этих ферментов: 20-метилхолантрен (МХ), 3,4-бензпирен (БП) и смесь полихлорированных бифенилов (Ароклор 1254), которые вводили животным за 2–5 сут до введения канцерогена. Оказалось, однако, что Ароклор 1254 в поздние сроки после введения сам подавляет индукцию ТАТ (данные не приведены), поэтому при его использовании не представлялось возможным решить, является ли увеличение эффекта (если таковое было бы получено) результатом усиления действия ОАТ или суммированием эффектов индуктора и канцерогена. Для решения поставленной задачи мы постарались исключить влияние всасывания канцерогена, осуществив его прямую доставку в печень в составе фосфолипидных везикул (липосом), которые вводили внутривенно. В предварительных экспериментах было установлено, что при внутрибрю-

шинном введении в традиционной дозе 225 мг/кг за 19 ч до введения гидрокортизона ОАТ снизил уровень индукции ТАТ на 43 %, а при внутривенном введении 1/2 этой дозы в липосомах за полчаса до индукции – на 49 %, т. е. практически на ту же величину. Липосомы, не содержащие ОАТ, при подобном введении не оказывали большего, чем физиологический раствор, влияния на индукцию ТАТ. Поэтому влияние индукции ферментов метаболизма ОАТ на его антиглюкокортикоидное действие мы изучали на данной модели с использованием в качестве индукторов БП и МХ. Оказалось, что при введении в липосомах, т. е. при непосредственной доставке ОАТ в печень за полчаса до введения гормона, уровень индукции ТАТ снизился у контрольных мышей на 11 %, а у мышей, получавших БП или МХ, – на 38 и 44,5 % соответственно (рис. 2). Таким образом, одно и то же количество ОАТ за полчаса нахождения в печени снизило уровень индукции ТАТ у преиндуцированных животных в 4 раза сильнее, чем у контрольных, из чего следует, что действующим началом в ингибировании

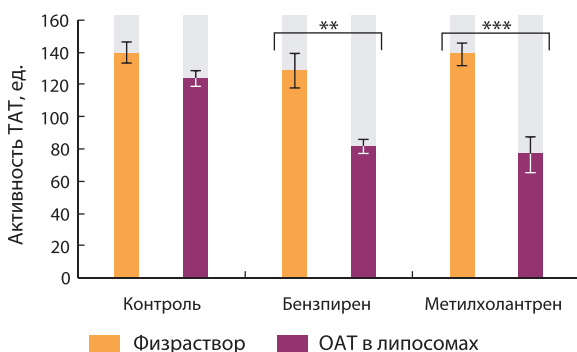




**Рис. 1.** Влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ в зависимости от его дозы.

Канцероген в масляном растворе вводили в брюшную полость мышам СВА в указанных дозах (мг/кг веса) за 19 ч до индукции. Индукцию осуществляли в/б введением фосфата дексаметазона в дозе 0,5 мг/100 г массы тела животных. Активность ТАТ (по оси ординат) в мкмольях *п*-гидроксифенилпирувата на 100 мг белка супернатанта печени в час определяли через 5 ч после индукции.

Значения, достоверно отличающиеся от контроля: \*  $p < 0,001$ .



**Рис. 2.** Влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ у мышей в контроле и на фоне индукции ферментов его метаболизма 3,4-бензпиреном (БП) или 20-метилхолантеном (МХ).

Для стимуляции метаболизирующих ОАТ ферментов печени мышам СВА в брюшную полость вводили БП в дозе 100 мг/кг или МХ в дозе 80 мг/кг массы тела. Через 2 сут половине мышей каждой группы ввели в хвостовую вену физиологический раствор (1 мл/100 г массы тела), а другой половине – аналогичный объем суспензии липосом, содержащих ОАТ (доза ОАТ составила 120 мг/кг). Через 30 мин после этого мышам для индукции ТАТ ввели в/б гидрокортизон (5 мг/100 массы тела), а еще через 5 ч их умертвили декапитацией и в растворимой фракции белков печени определили активность ТАТ. Значения, достоверно отличающиеся от контрольных: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

глюкокортикоидной индукции ТАТ является не исходный препарат ОАТ, а его метаболит (метаболиты).

### Влияние ингибиторов метаболизма на антиглюкокортикоидное действие орто-аминоазотолуола

Подтверждение предположения о роли метаболитов ОАТ в ингибировании глюкокортикоидной индукции

ТАТ было получено нами в экспериментах с обратным воздействием, а именно с ингибированием метаболизма ОАТ в организме мышей. Известно, что ионы кобальта, ингибируя (через влияние на 5-аминолевулинатсинтетазу) синтез гема и ускоряя (через увеличение активности гемоксигеназы) окисление цитохрома P420 и других гемопротеидов до билирубина, приводят к дозозависимому снижению содержания цитохрома P450 и активности связанных с ним ферментов в печени (Testa, Jenner, 1981). В условиях наших экспериментов у мышей, получавших  $\text{CoCl}_2$ , уровень содержания P450 в печени снизился более чем на 70 %, что хорошо согласуется с данными, полученными другими исследователями (Testa, Jenner, 1981). Почти в такой же степени (на 62–65 % по сравнению с контролем) у них снижались и активности 7-МРОД и 7-ЭРОД, характеризующие соответственно *сyp1a1* и *сyp1a2* цитохромы, метаболизирующие канцерогенные аминоазокрасители (Mikhailova et al., 2005).

Как видно из табл. 3, если у контрольных мышей ОАТ снижал уровень индукции ТАТ гидрокортизоном более чем на 40 %, то у мышей, получавших  $\text{CoCl}_2$ , его действие было выражено в значительно меньшей степени, чем в контроле. Сходные результаты были получены и в опытах с ингибированием сульфоконъюгации ОАТ пентахлорфенолом. У мышей, которым перед ОАТ вводили ПХФ, индукция ТАТ ингибировалась не на 30–42 %, а лишь на 1–6,7 % (табл. 4).

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что у мышей антиглюкокортикоидное действие ОАТ, оцениваемое по влиянию на индукцию ТАТ, осуществляется не исходным соединением, а его метаболитами (метаболитом).

### Обсуждение

Активированные метаболиты аминоазокрасителей образуются при сульфоконъюгации их *N*-гидроксипроизводных, катализируемой цитозольным ферментом печени сульфотрансферазой, и характеризуются высокой реакционной способностью, обеспечивающей им возможность взаимодействовать с нуклеофильными центрами клеточных макромолекул, в том числе ДНК (Delclos et al., 1986; Турусов и др., 2004). Доказательство того, что при действии канцерогенов гормональная индукция ТАТ подавляется на уровне транскрипции, позволило некоторым исследователям утверждать, что их влияние на индукцию адаптивных ферментов вызывается прямым действием на генетические локусы этих ферментов (Hamilton et al., 1993; Miller et al., 1993). Авторы даже не рассматривали альтернативные возможности, в частности нарушение канцерогеном механизма индукции. Между тем для снижения уровня транскрипции в той степени, в какой это имеет место в условиях экспериментов (до 50 % и более), при непосредственном взаимодействии с ДНК канцероген (его ак-

**Таблица 3.** Влияние ОАТ на индукцию ТАТ гидрокортизоном в печени контрольных и предобработанных  $\text{CoCl}_2$  мышей

Экспериментальные группы	Активность ТАТ <sup>#</sup>	
	Контроль	Опыт ( $\text{CoCl}_2$ )
<b>Мыши ICR</b>		
Индукция гидрокортизоном (ГК)	167 ± 5,0 (4)	153 ± 4,3 (5)
ОАТ + индукция ГК	99 ± 6,1***(6)	142 ± 6,5 (5)
Снижение, %	40,7	7,2
<b>Мыши DD</b>		
Индукция ГК	131 ± 6,8 (5)	155 ± 10,7 (5)
ОАТ + индукция ГК	95 ± 4,0***(7)	157 ± 10,7 (5)
Снижение, %	27,5	0

<sup>#</sup> мкмоль *n*-гидроксифенилпирувата на 100 мг белка/ч, \*\*\* достоверное ( $p < 0,001$ ) снижение уровня глюкокортикоидной индукции ТАТ под действием ОАТ. В скобках указано количество животных.

**Таблица 4.** Влияние ОАТ на индукцию ТАТ гидрокортизоном у контрольных и получавших пентахлорфенол мышей

Группы опыта	Активность ТАТ <sup>#</sup>	
	Контроль	Пентахлорфенол
<b>Мыши ICR</b>		
Индукция гидрокортизоном (ГК)	149 ± 8,9 (4)	149 ± 1,0 (3)
ОАТ + индукция ГК	86 ± 9,5**(4)	139 ± 11,9 (5)
Снижение, %	42,3	6,7
<b>Мыши DD</b>		
Индукция ГК	179 ± 12,9 (4)	175 ± 6,5 (4)
ОАТ + индукция ГК	126 ± 8,9*(4)	167 ± 6,5 (4)
Снижение, %	29,6	4,6

<sup>#</sup> мкмоль *n*-гидроксифенилпирувата на 100 мг белка/ч. Достоверное снижение уровня глюкокортикоидной индукции ТАТ под действием ОАТ: \*  $p < 0,5$ ; \*\*  $p < 0,01$ . В скобках указано количество животных.

тивированный метаболит) должен подействовать на ген ТАТ практически в каждой экспрессирующей ее клетке. Фактическое же связывание канцерогенных аминоазокрасителей в этих условиях составляет менее 10 аддуков на  $10^6$  нуклеотидов ДНК, т. е. примерно 1 аддукт на 100 генов (Виленчик, 1977). В силу малых размеров молекулы канцерогенов не способны распознавать сколь-нибудь значительные последовательности нуклеотидов ДНК, поэтому столь удивительная избирательность их действия на те или иные гены может достигаться лишь при участии специальных посредников, распознающих эти гены. В случае глюкокортикоид-зависимых генов такими посредниками могут быть рецепторные белки гормонов и другие факторы транскрипции, которые и составляют механизм индукции этих генов (Kropachev et al., 2001; Merkulova et al., 2005). Сами же по себе в отсутствие белков-посредников активированные метаболиты канцерогенов вступают во взаимодействие не только с ДНК, но и с РНК и белками, причем в последнем случае они взаимодействуют преимущественно с одними белками и не взаимодействуют с другими.

Специфичность же взаимодействия определяется, очевидно, не на химическом уровне, поскольку нуклеофильные сайты имеют все белки, но атакуются или не атакуются эти сайты алкилирующим агентом, зависит, в частности, от их доступности, которая определяется стерическими свойствами как белковой молекулы, так и алкилирующего агента. Наиболее ярко это проявляется в случае лигандинда печени, транспортного белка с активностью глутатион-S-трансферазы, который связывает до 2 % введенного крысам 3'-Me-ДАБ (Ohmi et al., 1981). Экспериментально показано также функциональное взаимодействие гепатоканцерогенов с серией минорных ядерных белков печени (факторов транскрипции), участвующих в регуляции экспрессии глюкокортикоид-зависимых генов (Kropachev et al., 2001; Merkulova et al., 2005; Каледин и др., 2009). Полученные нами результаты позволяют полагать, что эти белки атакуются активированными метаболитами канцерогенов по нуклеофильным центрам и частично или полностью теряют свою специфическую функцию, что и отражается на экспрессии регулируемых ими генов (Овчинникова

**Таблица 5.** Влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ у 6-месячных мышей линии ICR контрольных и получавших в 12-дневном возрасте ОАТ в дозе 225 мг/кг

Воздействие		Активность ТАТ (мкмоль парагидроксифенилпирувата на 100 мг белка/ч)
в 12-дневном возрасте	в возрасте 6 мес.	
–	Без индукции	25 ± 2,0
–	Контроль: масло + индукция гидрокортизоном (ГК)	109 ± 8,6
–	ОАТ + индукция ГК	61 ± 5,8**
ОАТ	Контроль: масло + индукция ГК	123 ± 10,5
ОАТ	ОАТ + индукция ГК	64 ± 7,2**

ОАТ в дозе 225 мг/кг вводили мышам за 19 ч до индукции. В каждой группе по 3–4 животных. \*\* достоверное ( $p < 0,01$ ) снижение уровня индукции ТАТ гидрокортизоном под влиянием ОАТ у взрослых животных.

**Таблица 6.** Отсутствие влияния генотоксических агентов циклофосамида и цисплатина на глюкокортикоидную индукцию ТАТ в печени мышей

Группа и воздействие	Число животных	Активность ТАТ (мкмоль <i>p</i> -гидроксифенилпирувата на 100 мг белка/ч)
1. Без воздействия	3	22 ± 7,0
2. Индукция дексаметазоном	5	99 ± 1,2
3. Циклофосамид + индукция дексаметазоном	5	102 ± 7,7
4. Цисплатин + индукция дексаметазоном	5	95 ± 9,4

Циклофосфан в дозе 100 мг/кг и цисплатин в дозе 4 мг/кг вводили мышам линии ICR **внутрибрюшинно за 19 ч до индукции фермента**, которую осуществляли в/б введением дексаметазон-фосфата в дозе 0,5 мг на 100 г массы тела.

и др., 2012). По мере замещения поврежденного канцерогеном фактора транскрипции на вновь синтезированные молекулы антиглюкокортикоидный эффект канцерогена должен уменьшаться и нормальная индукция фермента должна восстанавливаться. Действительно, после введения ОАТ индуцибельность ТАТ в существенной степени восстанавливается примерно через 2 недели, а через 4 недели она практически не отличается от контроля (табл. 2). В отличие от хронического применения канцерогена, однократное его введение взрослым животным не приводит к сколько-нибудь заметному изменению клеточной популяции печени (Багинская и др., 2007). Полностью восстанавливается к взрослому состоянию индуцибельность ТАТ и при неонатальном введении мышам ОАТ в дозах, достаточных для инициации гепатоканцерогенеза. Так, введение подсосным мышатам ОАТ не оказывает влияния ни на индукцию ТАТ гидрокортизоном, ни на ингибирование ее канцерогеном при его повторном введении в 6-месячном возрасте (табл. 5).

Таким образом, представленные в работе данные показывают, что ингибирующее влияние ОАТ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ у мышей осуществляется активированными мутагенными (Овчинникова и др., 2012) метаболитами ОАТ. В то же время неканцерогенные для печени генотоксические агенты цисплатин и циклофосамид не оказывают влияния на индукцию ТАТ в печени (табл. 6). Следовательно, так называемое

антиглюкокортикоидное действие осуществляется мутагенными метаболитами ОАТ (Овчинникова и др., 2012), но на эпигенетической основе. Какое это имеет (и имеет ли) отношение к его канцерогенному действию, предстоит выяснить. В свете данных, которые мы получили в последнее время (Каледин и др., 2010; Каледин, Ильницкая, 2011; Овчинникова и др., 2012) и надеемся обобщить в следующем сообщении, этот вопрос не кажется тривиальным.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № VI.58.1.2.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Багинская Н.В., Ильницкая С.И., Никитенко Е.В., Каледин В.И. Промотирующее влияние орто-аминоазотолуола на гепатоканцерогенез сопровождается усилением воспалительных и пролиферативных процессов в ткани печени и снижением концентрации свободного тироксина в крови. Бюл. эксперим. биол. медицины. 2007;144:672-675.
- Виленик М.М. Закономерности молекулярно-генетического действия химических канцерогенов. М.: Наука, 1977.
- Каледин В.И., Глазко Т.Т., Захарова Н.П. Нарушение индукции тирозинаминотрансферазы в печени мышей, получавших о-аминоазотолуол. Докл. АН СССР. 1979;244:233-237.

- Каледин В.И., Гуляева Л.Ф., Вавилин В.А., Макарова С.М., Морозкова Т.С., Рихтер В.А. Активность ферментов метаболизма ксенобиотиков в печени чувствительных к гепатоканцерогенному действию орто-аминоазотолуола мышей линий SWR и СЗНА и резистентных – AKR и CC57BR. Эксперим. онкология. 1999;21:18-23.
- Каледин В.И., Захарова Н.П. Влияние гепатоканцерогенных соединений на гормональную индукцию тирозинаминотрансферазы в печени чувствительных и резистентных животных. Исследования по индукции и метастазированию злокачественных опухолей у экспериментальных животных. Новосибирск: ИЦиГ, 1984:146-185.
- Каледин В.И., Ильницкая С.И. Торможение метаболизма стимулирует, а активация метаболизма ингибирует канцерогенное действие орто-аминоазотолуола на печень мышей. Вопр. онкологии. 2011;7:216-220.
- Каледин В.И., Ильницкая С.И., Багинская Н.В. Ингибирующее влияние о-аминоазотолуола на гепатоканцерогенное действие диэтилнитрозамина при совместном применении у мышей. Вопр. онкологии. 2010;56(2):196-200.
- Каледин В.И., Пахарукова М.Ю., Пивоварова Е.Н., Кропачев К.Ю., Багинская Н.В., Васильева Е.Д., Ильницкая С.И., Никитенко Е.В., Кобзев В.Ф., Меркулова Т.И. Соответствие между гепатоканцерогенным действием эстрагола и его влиянием на глюкокортикоидную индукцию печенъспецифичных ферментов и активность факторов транскрипции в печени мышей и крыс. Биохимия. 2009;74:466-475.
- Каледин В.И., Серова И.А., Целлариус Ю.Г., Семенова Л.А., Алексеева Г.В. Межлинейные различия по частоте спонтанных и индуцированных орто-аминоазотолуолом опухолей у мышей. Исследования по индукции и метастазированию злокачественных опухолей у экспериментальных животных. Новосибирск: ИЦиГ, 1984:98-123.
- Морозкова Т.С., Жукова Н.А., Семенов Д.Е., Попова Н.А. Мыши линии РТ/У чувствительны к ингибирующему глюкокортикоидную индукцию тирозинаминотрансферазы и гепатоканцерогенному действию орто-аминоазотолуола. Бюл. эксперим. биол. медицины. 2014;158(12):757-761.
- Овчинникова Л.П., Богданова Л.А., Каледин В.И. Мутагенная активация снижает канцерогенность орто-аминоазотолуола для печени мышей. Бюл. эксперим. биол. медицины. 2012;154(11):623-628.
- Турусов В.С., Белицкий Г.А., Пылев Л.Н., Кобляков В.А. Механизмы действия и классификация химических канцерогенов. Канцерогенез. М.: Медицина, 2004:204-225.
- Andersen R.A., Raina P.N., Milholland R.J. Altered responses to cortisol in precancerous liver. *Oncologia*. 1966;20:153-166.
- Delclos K.B., Miller E.C., Miller J.F., Liem A. Sulfuric acid esters as major ultimate electrophilic metabolites of 4-aminoazobenzene and its N-methyl derivatives in infant male C57BL/6J × C3H/HeJ F<sub>1</sub> (B6C3F<sub>1</sub>) mice. *Carcinogenesis*. 1986;7:277-287.
- Hamilton J.W., Louis C.A., Doherty K.A., Hunt S.R., Reed M.J., Treadwell M.D. Preferential alteration of inducible gene expression *in vivo* by carcinogens that induce bulky DNA lesions. *Mol. Carcinog*. 1993;8:34-43.
- Horikoshi N., Tashiro F., Tanaka N., Ueno Y. Modulation of hormonal induction of tyrosine aminotransferase and glucocorticoid receptor by aflatoxin B<sub>1</sub> and sterigmatocystin in Reuber hepatoma cells. *Cancer Res*. 1988;48:5188-5192.
- Kizer D.E., Cox B., Howel B.A., Shirley B.C. Effect of hepatocarcinogens on hepatocyte DNA synthesis and cortisone induction of tryptophane oxygenase. *Cancer Res*. 1969;29:2039-2046.
- Kropachev K.Yu., Kaledin V.I., Kobzev V.F., Timofeeva O.A., Il'nitskaya S.I., Vasilyeva E.D., Plisov C.Y., Richkova N.A., Filipenko M.L., Merkulova T.I. Involvement of transcription factor HNF3γ in the effect of o-aminoazotoluene on glucocorticoid induction of tyrosine aminotransferase in mice sensitive to its hepatocarcinogenic action. *Mol. Carcinog*. 2001;31:10-15.
- Merkulova T.I., Kropachev K.Yu., Timofeeva O.A., Vasiliev G.V., Levashova Z.B., Il'nitskaya S.I., Kobzev V.F., Pakharukova M.Y., Bryzgalov L.O., Kaledin V.I. Species-specific effects of the hepatocarcinogens 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene and ortho-aminoazotoluene in mouse and rat liver. *Mol. Carcinog*. 2005;44:223-232.
- Mikhailova O.N., Vasyunina E.A., Ovchinnikova L.P., Timofeeva O.A., Filipenko M.L., Kaledin V.I. O-aminoazotoluene does induce the enzymes of its own metabolism in mouse liver. *Toxicology*. 2005;211:132-138.
- Miller M.S., Buzard G.S., McDowell A.E. *In vivo* inhibition of glucocorticoid-inducible gene expression by dimethylnitrosamine in rat liver. *Biochem. Pharmacol*. 1993;45:1465-1470.
- Ohmi R., Bhargava M., Arias I.M. Binding of 3'-methyl-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene metabolites to rat liver cytosol proteins and ligandin subunits. *Cancer Res*. 1981;41:3461-3464.
- Testa B., Jenner P. Inhibitors of cytochrome P450s and their mechanism of action. *Drug Metab. Rev*. 1981;12:1-117.
- Timofeeva O.A., Ereemeev A.V., Goloshchapov A., Kalashnikova E., Il'nitskaya S.I., Setkov N.A., Kobzev V.F., Buzard G.S., Filipenko M.L., Kaledin V.I., Merkulova T.I. Effect of o-aminoazotoluene on liver regeneration and p53 activation in mice susceptible and resistant to hepatocarcinogenesis. *Toxicology*. 2008;254:91-96.
- Warwick G.P., Roberts J.J. Persistent binding of butter yellow metabolites to rat liver DNA. *Nature*. 1967;215:1206-1207.
- Wogan G.N., Friedman M.A. Inhibition by aflatoxin B<sub>1</sub> of hydrocortisone induction of rat liver tryptophan pyrrolase and tyrosine aminotransferase. *Arch. Bioch. Biophys*. 1968;128:509-516.