ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.36-006.04-092.9

ИНДУКЦИЯ ИЗОФОРМЫ ЦИТОХРОМА Р450 2А5 В ПЕРЕВИВАЕМЫХ ГЕПАТОМАХ МЫШЕЙ

Л.Н. Куликова

НИИ канцерогенеза Российского Онкологического научного центра
им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия

Исследована возможность индукции *in vivo* изоформы цитохрома Р450 из подсемейства 2А, экспрессируемой в перевиваемых гепатомах мышей. Показано, что активность кумарин-7-гидроксилазы, катализируемой изоформой CYP2A5, была увеличена в гепатоме 61 после введения мышам пиразола или хлорида кобальта. Введение пиразола или соединения кобальта вызывало также значительное повышение (в 2-2,5 раза) активности 7-этоксикумарин-О-деэтилазы в гепатоме 61. Увеличение активности кумарингидроксилазы в гепатоме 61 сопровождалось повышением количества изоформы CYP2A5, определяемого методом иммуноблоттинга. Введение пиразола или соли кобальта не вызывало индукции CYP2A5 в перевиваемой гепатоме 60, хотя исходный уровень фермента оставался выше такового в печени. Иммунохимически изоформа в микросомах печени мышей выявлялась только после введения пиразола. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении свойства индуцибельности изоформой CYP2A5 в перевиваемой гепатоме 61. Высказано предположение о возникновении гепатом 60 и 61 из трансформированных гепатоцитов, расположенных в разных функциональных полях печеночной дольки.

Ключевые слова: цитохром Р450, изоформа CYP2A5, кумарингидроксилаза, опухоли печени, печень.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохром Р450 печени животных и человека играет ключевую роль в метаболических превращениях эндогенных и экзогенных соединений и представляет собой суперсемейство множественных форм [1]. Среди изоформ цитохрома Р450 особое место занимает подсемейство CYP2A, изоформы которого по каталитической активности и регуляции различаются большой степенью внутри- и межвидовой вариабельности [2]. У мышей одна из изоформ этого семейства CYP2A5 конститутивно экспрессируется в печени и эффективно окисляет кумарин по положению 7 в молекуле. Субстратами CYP2A5 являются многие производные кумарина, в том числе и 7-этоксикумарин. CYP2A5 участвует в метаболизме токсинов и канцерогенов (N-нитрозодиалкиламинов, афлатоксина B1, полициклических ароматических углеводородов и др.) [3].

Высокая экспрессия изоформы CYP2A5 была обнаружена нами в опухолях печени мышей [4]. Для понимания роли данной изоформы в опухоли необходимы ясные представления о ее функциональных свойствах, одним из которых является способность повышения ферментативной активности в ответ на введение определенных веществ-индукторов. В клетках печени с помощью индукторов цитохрома Р450 удается мобилизовать большие потенциальные ресурсы его изоформ, способных окислять различные субстраты. Несмотря на то, что индукция цитохрома Р450 является одним из важнейших свойств фермента в печени, сведения о проявлении индуцибельности цитохрома Р450 в опухолях *in vivo* весьма ограничены. Анализ работ показывает, что в настоящее время нет достаточно убедительных данных, которые бы удовлетворительно объяснили реакцию опухолевых клеток на воздействие индукторов цитохрома Р450. Отчасти это, по-видимому, обусловлено тем, что согласно результатам, полученным в ранних работах, явление индукции в опухолевых клетках либо отсутствовало, либо проявлялось в значительно меньшей степени. Пониженная индуцибельность микросомальных ферментов в клетках, подвергшихся опухолевому превращению, объяснялась общей тенденцией опухолевых клеток утрачивать чувствительность к внешним стимулам [5].

Индукторы изоформы CYP2A5 отличаются от классических индукторов цитохрома Р450. В печени кумарингидроксилазная активность, определяемая изоформой CYP2A5, способна индуцироваться при введении в организм химических соединений, структурно не родственных, но проявляющих гепатотоксическое действие. Наиболее специфичными индукторами этой монооксигеназы в печени мышей являются пиразол и его производные, тяжелые металлы (соли кобальта и индия), CCl_4 и кокаин [6,7].

Наши эксперименты были предприняты с целью выяснить способность к индукции *in vivo* изоформы CYP2A5 в перевиваемых гепатомах, характеризующихся высоким конститутивным уровнем фермента. В отличие от первичных гепатом, перевиваемые опухоли служат удобной моделью для изучения индукции цитохрома Р450. Если провести индукцию цитохрома Р450 в первичной опухоли, то информация об исходном уровне фермента и его изоформ будет утрачена.

В статье представлены данные, указывающие на возможность сохранения свойства индуцибельности изоформой CYP2A5 в перевиваемой опухоли печени мышей.

МЕТОДИКА. В работе были использованы мыши самцы линии C3HA (средняя масса тела около 25 г). Животные содержались на стандартной диете, но за 12-14 час перед забоем они не получали пищи.

В экспериментах использовали длительно перевиваемые мышиные гепатомы 60 и 61, штаммы которых исходно были получены доктором биологических наук В.И. Гельштейн у мышей C3HA после воздействия химическим канцерогеном (*о*-аминоазотолуолом и CCl_4 соответственно) и хранились в банке опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН [8]. По морфологической картине гепатома 60 описана как аденокарцинома, а гепатома 61 - трабекулярная карцинома. Для перевивки использовали 20%-ную (по массе) взвесь кусочков опухолевой ткани в питательной среде 199. Каждому животному вводили по 0,1 мл внутримышечно в правую заднюю лапу. Время генерации для гепатомы 60 составляло 3 недели и для гепатомы 61 - 1 месяц.

Индукторы вводили мышам по общепринятой схеме: внутрибрюшинно пиразол в дозе 200 мг/кг × 3 дня или подкожно $CoCl_2$ в дозе 40 мг/кг × 2 дня [6]. Контролем служили животные-опухоленосители, получавшие физиологический раствор в равном объеме.

Микросомную фракцию гепатом и печени выделяли методом дифференциального центрифугирования из гомогената печени или гепатомы в среде, содержащей сахарозу (250 мМ) + трис-HCl буфер (50мМ, pH 7,4) + 0,5мМ ЭДТА + 1 мМ ДДТ. Белок определяли в микросомах печени и опухоли в присутствии 0,5%-ного дезоксихолата натрия по методу Lowry [9]. Количественное содержание цитохрома Р450 в микросомах определяли по дифференциальной схеме, описанной Omura и Sato [10]. Для регистрации разностных спектров цитохрома Р450 (комплекс восстановленной формы цитохрома Р450 с оксидом углерода против восстановленной формы) использовали спектрофотометр Hitachi U-3210 (Япония) в режиме автоматической коррекции базовой линии. При расчете концентрации цитохрома Р450 по разнице оптической плотности между длинами волн 450 и 490 нм использовали коэффициент экстинкции 91 $мМ^{-1}\cdot см^{-1}$.

Электрофоретическое разделение белков микросом печени или опухоли проводили в градиентом (7,5 - 15%) полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по методу Laemmli [11]. Для более точного определения количественного соотношения гемопротеинов в печени и опухоли микросомные препараты были уравновешены не по количеству белка, а по количеству цитохрома Р450, спектрально измеренному, согласно рекомендации [12]. В качестве стандартов использовали белки-маркеры фирмы "Sigma" (MW-SDS-200 Kit) или "BIO-RAD" (Prestained SDS-PAGE Standarts). Электрофорез проводили на приборах фирмы Pharmacia Fine Chemicals.

После электрофоретического разделения микросомальных белков проводили Western blotting по стандартной методике [13]. Электроперенос белков с полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм, "Sigma") был проведен в буфере, содержащем 20% этанол, в течение 4 час при напряжении 100В. Полоску мембраны (размером, определяемым по положению в полиакриаламидном геле стандартных белков с мол. массой 30-70 кДа) инкубировали с антителами к изоформе цитохрома Р450 2А5 (первичные антитела) при комнатной температуре. Затем мембранные фильтры обрабатывали конъюгатом пероксидаза-анти IgG кролика (вторичные антитела). Белковые зоны, соответствующие изоформе CYP2A5 (мол. масса 50 кДа), выявляли, инкубируя фильтры с хромогенным субстратом (3,3-диаминобензидином) до появления окрашенных полос. Поликлональные антитела к CYP2A5 были любезно предоставлены проф. Lang M.A.

Активность цитохром Р450-специфичных монооксигеназ в печени и опухоли определяли общепринятыми методами с небольшими модификациями. Скорость гидроксилирования бензпирена определяли флуориметрически как описано [14]. Образующийся 3-гидроксибензпирен регистрировали на спектрофлуориметре Perkin Elmer, снабженном самописцем, при длинах волн возбуждения - 435 нм и эмиссии - 522 нм (максимальная) и 475 нм (минимальная флуоресценция). В качестве стандарта использовали 3-гидрокси-бензпирен ("Sigma"). Активность аминопирин-N-деметилазы и диметилнитрозамин-N-деметилазы оценивали по образованию формальдегида [15]. Концентрация субстрата составляла 8 мМ и 2 мМ, для аминопирина и диметилнитрозамина соответственно. Активность 7-этоксикумарин-О-деэтилазы определяли по скорости образования 7-гидроксикумарина, регистрируя на самописце флуориметра увеличение флуоресценции во времени [16]. Активность кумарингидроксилазы измеряли флуориметрическим методом по образованию 7-гидроксикумарина [17]. Конечная концентрация этоксикумарина или кумарина ("Sigma") составляла 0,1 мМ. В качестве стандарта использовали 7-гидроксикумарин ("Fluka").

Все данные представлены в виде средней (± ошибка средней) 3-4 препаратов микросом. Для получения каждого препарата микросомной фракции печени или гепатом было использовано не менее 5 животных. Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты анализа показателей считали достоверными при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Данные, приведенные в таблице 1, демонстрируют изменения функциональных свойств цитохрома Р450 в печени и перевиваемой гепатоме 61 после введения мышам пиразола или хлорида кобальта, а также после их совместного введения. В печени мышей, получавших пиразол, уровень цитохрома Р450 падал на 40-50% ($p<0,01$). Однако в микросомах гепатомы 61 после обработки пиразолом мышей-опухоленосителей количество цитохрома Р450 оставалось достоверно выше (на 30%, $p<0,05$) исходного уровня. Содержание другого гемопротеина, цитохрома b_5, уменьшалось только в печени мышей, получавших пиразол (на 30%, $p<0,05$). Введение кобальта мышам вызывало незначительное снижение содержания цитохрома P450 в микросомах печени, но не гепатомы 61.

Таблица 1. Влияние введения *in vivo* пиразола и $CoCl_2$ на монооксигеназы в микросомах гепатомы 61 и печени мышей линии C3HA.

микросомы	количество цитохромов нмоль/мг белка		активность монооксигеназ, нмоль/мин на 1 мг белка				
	b_5	P450	кумарин-7-гидроксилаза	7-этоксикумарин-O-деэтилаза	бензпирен-гидроксилаза	аминопирин-N-деметилаза	Диметилнитрозамин-N-деметилаза
печень							
контроль	0,540±0,046	1,010±0,119	0,547±0,082	2,704±0,401	0,960±0,145	14,62±1,67	3,15±0,47
пиразол	0,376±0,048	0,618±0,082	1,532±0,217	5,699±0,851	0,118±0,021	4,35±0,41	2,94±0,27
$CoCl_2$	0,572±0,059	0,857±0,081	1,045±0,151	4,526±0,673	0,894±0,131	12,50±1,21	3,68±0,57
пиразол+ $CoCl_2$	0,449±0,061	0,701±0,078	2,320±0,301	10,051±1,109	0,115±0,023	5,24±0,79	4,01±0,77
гепатома 61							
контроль	0,270±0,032	0,244±0,025	1,042±0,138	2,778±0,401	0,058±0,013	2,91±0,44	2,45±0,38
пиразол	0,307±0,033	0,325±0,045	2,161±0,301	6,788±0,979	0,062±0,011	3,73±0,71	3,96±0,40
$CoCl_2$	0,286±0,027	0,217±0,021	1,636±0,235	4,602±0,691	0,060±0,012	2,50±0,36	2,17±0,29
пиразол + $CoCl_2$	0,275±0,031	0,215±0,024	2,448±0,319	6,901±0,989	0,051±0,010	3,23±0,48	3,54±0,50

С общим уровнем цитохрома P450, как правило, коррелирует активность аминопирин-N-деметилазы. Действительно, на фоне выраженного изменения уровня общего цитохрома P450 в печени после введения мышам пиразола отмечалось существенное уменьшение (>3 раза) активности аминопирин-N-деметилазы. Однако в микросомах гепатомы 61 после введения пиразола активность аминопирин-N-деметилазы не снижалась. Можно предположить, что причиной таких различий в изменениях активности N-деметилазы печени и опухоли может быть разница в экспрессии цитохрома P450. Поскольку аминопирин относится к субстратам широкой специфичности, то можно допустить, что в результате обработки пиразолом в печени уменьшается число изоформ цитохрома P450, способных катализировать N-деметилирование данного субстрата. После обработки хлоридом кобальта активность монооксигеназы оставалась близкой к исходному уровню как в печени, так и в гепатоме.

Активность диметилнитрозамин-N-деметилазы в микросомах печени не уменьшалась введением пиразола мышам. В микросомах гепатомы 61 мышей, получавших пиразол, диметилнитрозамин-N-деметилазная активность возрастала в 1,5 раза ($p<0,05$). В ответ на введение хлорида кобальта не происходило значимых изменений в активности монооксигеназы в печени или гепатоме.

Активность бензпиренгидроксилазы резко падала в печени мышей после введения пиразола, но не соединения металла. В гепатоме 61 исходная активность фермента весьма низкая и оставалась на очень низком уровне после введения пиразола или соли кобальта.

При рассмотрении результатов (табл. 1) обнаруживается несоответствие между изменениями уровня цитохрома P450 и активности монооксигеназ.

На фоне одновременного снижения аминопирин-N-деметилазной и бензпиренгидроксилазной активностей и количества цитохрома P450 в печени мышей, получавших пиразол, наблюдалось значительное (в >2 раза, $p<0,001$) повышение активности кумарин-7-гидроксилазы. Введение соединения кобальта приводило также к ~2-кратному увеличению кумарингидроксилазной активности в печени мышей. Аналогично, после введения любого из приведенных выше химических соединений активность кумарин-7-гидроксилазы возрастала в 1,5-2 раза в микросомах гепатомы 61. Следует подчеркнуть высокую базальную активность кумарингидроксилазы в гепатоме 61. Хотя содержание цитохрома P450 в гепатоме 61 составляло не более 30% от печеночного уровня, исходная активность кумарингидроксилазы практически вдвое выше в опухоли по сравнению с ферментативной активностью в печени. Кроме того.

и после обработки пиразолом или кобальтом ферментативная активность оставалась выше в микросомах гепатомы 61.

Вместе с повышением активности кумарингидроксилазы после введения пиразола или соли металла в микросомах печени и гепатомы 61 обнаружено в >2 раза увеличение активности 7-этоксикумарин-О-деэтилазы. Обращают на себя внимание практически одинаковые активности этой монооксигеназы в печени и гепатоме 61 как без обработки, так и после введения пиразола или кобальта.

В печени мышей метаболизм 7-этоксикумарина и кумарина может катализироваться одной и той же изоформой цитохрома Р450 - CYP2A5 [2]. Следовательно, индукция кумарин-7-гидроксилазы должна сопровождаться изменением уровня изоформы CYP2A5. На рисунке 1 представлены результаты иммунохимического анализа микросом печени и гепатомы 61 и активность кумарин-7-гидроксилазы в расчете на 1 нмоль цитохрома Р450. Иммуноблоттинг показал, что в микросомах гепатомы 61 исходное содержание изоформы CYP2A5 выше, чем в печени. В печени значительное увеличение количества CYP2A5 обнаруживалось иммунологически только после введения пиразола. Представленные на рисунке 1 данные демонстрируют соответствие между высоким количеством апопротеина CYP2A5 и каталитической активностью кумарингидроксилазы (при расчете на 1 нмоль цитохрома Р450) в микросомах печени мышей, получавших пиразол. После введения хлорида кобальта кумарингидроксилазная активность печени возрастала без выраженного изменения уровня апопротеина CYP2A5. В гепатоме 61 без внешних воздействий уровень белка CYP2A5 весьма высок, тем не менее, визуально можно отметить, что в гепатоме также происходило повышение апопротеина CYP2A5 после обработки мышей индуктором. Микросомы гепатомы 61 характеризовались высокой активностью кумарингидроксилазы, которой соответствовал высокий уровень ферментного белка. Во всех испытуемых группах активность кумарин-7-гидроксилазы на 1 нмоль цитохрома Р450 была выше в микросомах опухоли, чем печени.

Поскольку диметилнитрозамин является одним из субстратов CYP2A5, то возможной причиной повышения активности диметилнитрозамин-N-деметилазы в гепатоме 61 мышей, получавших пиразол, может быть также индукция данной изоформы (табл. 1).

По индуцирующему эффекту на кумарин-7-гидроксилазу пиразол и хлорид кобальта похожи. Однако пиразол, но не соединение металла, вызывал снижение цитохрома Р450 и его монооксигеназных активностей (аминопирин-N-деметилазы и бензпиренгидроксилазы). Часто для демонстрации сходства или различия действия индукторов на цитохром Р450 проводят исследование совместного введения пары индукторов. Можно предположить, что при одновременном использовании 2-х индукторов, реализующих свое влияние на цитохром Р450 через единый механизм, "результирующая" активность фермента не может превышать эффекта раздельного введения каждого из индукторов. Напротив, если в основе действия индукторов лежат разные механизмы, то при совместном введении можно ожидать аддитивного эффекта. В настоящем исследовании совместное введение мышам пиразола и хлорида кобальта повышало активность кумарин-7-гидроксилазы в печени в такой степени, которая соответствует практически суммарной активности, обнаруженной при раздельном действии этих факторов (табл. 1). Активность 7-этоксикумарин-О-деэтилазы в печени при совместном введении пиразола и хлорида кобальта составляла суммарный эффект раздельного введения каждого из соединений (10,051 против 5,699 и 4,526 нмоль/мин на мг белка после введения пиразола с хлоридом кобальта, пиразола или хлорида кобальта соответственно). Аналогичные, хотя и менее выраженные, результаты получены по изменению активности кумарин-7-гидроксилазы и 7-этоксикумарин-О-деэтилазы в гепатоме 61 при совместном введении пиразола и хлорида кобальта (табл. 1). Как видно из рисунка 1, каталитическая активность изоформы CYP2A5 в микросомах печени (и гепатомы) при одновременном введении пиразола и хлорида кобальта превышала эффект раздельного введения соединений. По всей вероятности, в основе действия пиразола и соединения металла на изоформу CYP2A5 лежат разные механизмы.

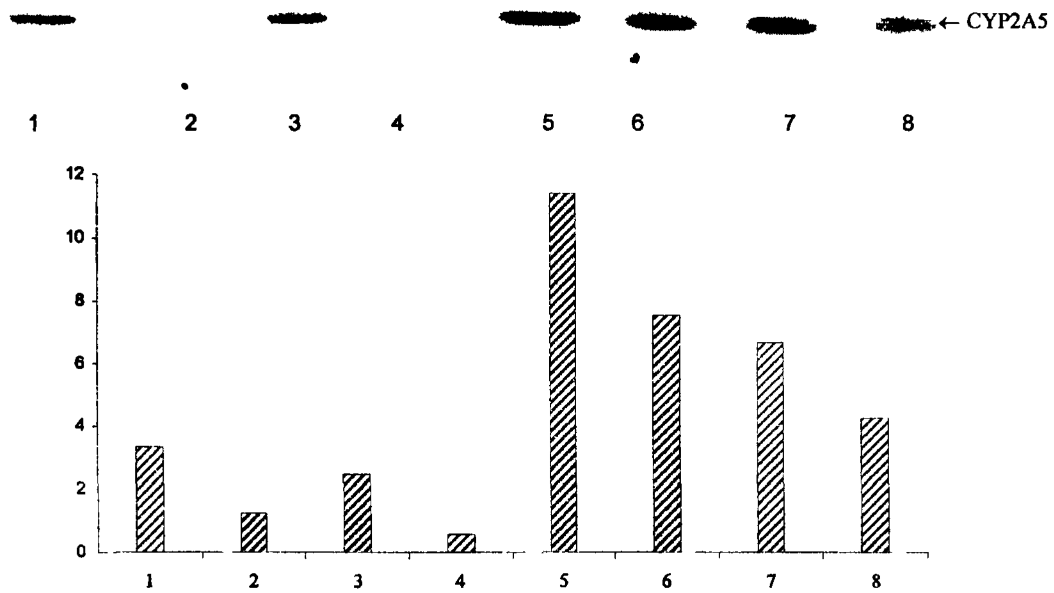

Рисунок 1.
Иммуноблоттинг (А) и активность кумарин-7-гидроксилазы (Б) микросом печени и перевиваемой гепатомы 61 после введения пиразола и $CoCl_2$ мышам линии С3НА. (А) - в присутствии антител против изоформы Cyp2a5. Каждая дорожка содержала 5 пмоль общего цитохрома Р450.
(Б) - нмоль/мин на 1 нмоль цитохрома Р450.1 - 4, микросомы печени: 1 - индукция пиразолом + $CoCl_2$, 2 - индукция $CoCl_2$; 3 - индукция пиразолом и 4 - контроль. 5 - 8, микросомы гепатомы 61: 5 - индукция пиразолом + $CoCl_2$; 6 - индукция $CoCl_2$; 7 - индукция пиразолом и 8 - контроль

Для печени мышей показано, что после введения пиразола наблюдаемое повышение активности кумарингидроксилазы сопровождалось усилением синтеза белка CYP2A5 и стабилизацей мРНК данной изоформы [6]. Можно предположить, что наблюдаемое после введения пиразола увеличение кумарингидроксилазной активности в опухоли также обусловлено активацией синтеза фермента *de novo*. Механизмы регуляции активности кумарингидроксилазы соединениями металлов в печени до конца не выяснены. Известно, что ионы Co^{2+} способны модифицировать внутриклеточный гем [18]. Возможно, в условиях деградации гема, вызываемой хлоридом кобальта, среди других конститутивных изоформ CYP2A5 проявляет избирательную стабильность, что проявляется в значительной ферментативной активности.

Из представленных результатов следует, пиразол и хлорид кобальта являются селективными индукторами опухолевого изофермента CYP2A5. Однако этот вывод правомочно сделать лишь для гепатомы 61. Что касается другой перевиваемой гепатомы 60, то активности кумарин-7-гидроксилазы и 7-этоксикумарин-О-деэтилазы не изменялись под воздействием пиразола или хлорида кобальта (табл. 2).

Без какого-либо внешнего воздействия содержание CYP2A5 в гепатоме 60 значительно выше, чем в нормальной печени, но меньше, чем в гепатоме 61. После введения пиразола или хлорида кобальта активность кумарин-7-гидроксилазы и уровень изоформы CYP2A5 в гепатоме 60 не изменялись (табл. 2, рис. 2). В печени мышей, которым трансплантировали гепатому 60, сохранялась высокая индукция специфичной изоформы и ее кумарингидроксилазной активности (рис. 2 и табл. 2).

Таблица 2. Влияние введения *in vivo* пиразола и $CoCl_2$ на монооксигеназы микросом перевиваемой мышиной гепатомы 60

микросомы	количество цитохрома Р450 нмоль/мг белка	Активность монооксигеназ нмоль/мин на мг белка		
		Кумарин-7-гидроксилаза	7-этоксикумарин-О-деэтилаза	Аминопирин-n-деметилаза
гепатома 60				
контроль	0,094 ± 0,010	0,310 ± 0,046	1,211 ± 0,165	1,14 ± 0,13
пиразол	0,117 ± 0,035	0,332 ± 0,053	1,041 ± 0,215	1,09 ± 0,25
$CoCl_2$	0,089 ± 0,012	0,242 ± 0,042	0,761 ± 0,085	0,99 ± 0,27
печень				
контроль	0,840 ± 0,060	0,410 ± 0,079	2,451 ± 0,449	15,84 ± 1,81
пиразол	0,471 ± 0,081	1,215 ± 0,109	5,149 ± 0,159	4,44 ± 0,84
$CoCl_2$	0,689 ± 0,089	0,881 ± 0,201	4,173 ± 0,743	12,49 ± 1,06

Сравнение интенсивности окрашивания иммунореактивной полосы, соответствующей апопротеину Cyp2a5, выявило количественно высокое содержание Cyp2a5 в гепатоме 60 (рис. 2).

Рисунок 2.
Иммуноблоттинг (в присутствии антител против изоформы Cyp2a5) микросом печени и перевиваемой гепатомы 60 после введения пиразола и $CoCl_2$ мышам линии C3HA. Дорожки 1 - 2, микросомы печени: 1 - индукция пиразолом и 2 - контроль. Дорожки 3 - 5, микросомы гепатомы 60: 3 - индукция $CoCl_2$; 4 - индукция пиразолом и 5 - контроль. Каждая дорожка содержала 10 пмоль общего цитохрома Р450

Принимая во внимание условия индуцирования первичных гепатом 60 и 61, можно заключить, что независимо от канцерогена существенным признаком исследуемых гепатом является выраженная экспрессия CYP2A5. Однако функциональные свойства данной изоформы в гепатомах различаются. Если CYP2A5 в гепатоме 61 отвечает на введение специфичных индукторов, то изоформа, экспрессируемая в гепатоме 60, остается устойчивой к экзогенным воздействиям. Что может отражать отсутствие индукции CYP2A5 в гепатоме 60? В настоящее время можно предложить две трактовки, объясняющие избирательную экспрессию изоформы цитохрома Р450 в гепатомах 60 и 61. Согласно первой, разнородность экспрессии цитохрома Р450 в исследуемых опухолях печени может быть связана с исходным положением трансформированной клетки в печеночной дольке. Для нормальной печени характерна градиентная топография гепатоцитов и неравномерное распределение некоторых белков и ферментов. Максимальное количество большинства изоформ цитохрома Р450 определяется в гепатоцитах центральной зоны печеночной дольки. Кроме того, процесс индукции некоторых изоформ цитохрома Р450 в нормальной печени развивается, начиная с гепатоцитов, расположенных вокруг центральных вен и распространяется по направлению к периферии дольки. При этом по мере удаления от центра дольки к периферии гепатоциты могут быть менее индуцибельны [19, 20]. Иммуногистохимический анализ выявил гетерогенность экспрессии CYP2A5 в нормальной печени [21]. Возможно, в процесс индукции изоформы могут быть вовлечены не все клетки печеночной дольки. Первичная гепатома 60 была получена в результате многократного смазывания кожи мыши раствором *о*-аминоазотолуолом, а гепатома 61 - путем подкожного введения CCl_4. Показано, что при парентеральном введении CCl_4 первые нарушения касаются клеток, расположенных преимущественно в центральных отделах дольки, в то же время гепатотоксин *о*-аминоазотолуол оказывает повреждающее действие на всем протяжении печеночной дольки [8]. Кроме того, в печени мышей линии DBA после однократного внутрибрюшинного введения кокаина или CCl_4 обнаружена 3-5-кратная стимуляция активности кумарингидроксилазы, что указывало на избирательную устойчивость изоформы CYP2A5 к гепатотоксинам [7]. Исходя из различия в экспрессии CYP2A5 в гепатомах 60 и 61, можно допустить, что исходные опухоли произошли из гепатоцитов, расположенных в разных функциональных полях. Гепатома 61 могла возникнуть исключительно из гепатоцитов, расположенных ближе к центральной зоне (вокруг печеночной вены), а при воздействии *о*-аминоазотолуола (в процессе инициации гепатомы 60) опухолевая трансформация, по-видимому, затронула клетки, расположенные в печеночной дольке ближе к периферии (у портального поля). Следовательно, содержание цитохрома Р450 в перевиваемой опухоли может характеризовать определенный клон (популяцию) клеток, который дал начало опухоли. Высказывается предположение, что моноклональность проявляется уже на уровне пренеопластических повреждений в печени [22]. Таким образом, можно полагать, что гепатома 61 произошла из трансформированных гепатоцитов с исходно высоким уровнем цитохрома Р450 2A5, способным к индукции.

Согласно второй трактовке полученных результатов, разница в экспрессии CYP2A5 и ее кумарингидроксилазной активности (базальной и индуцированной) в перевиваемых гепатомах 60 и 61 не зависит от зонального расположения гепатоцита в печеночной дольке, а обусловлена различной степенью опухолевой дифференцировки или неодинаковой прогрессией опухоли. В литературе имеются указания на связь монооксигеназной активности со степенью гистологической дифференцировки опухоли. Как показано на субпопуляциях мышиных эпидермальных кератиноцитов, различающихся стадиями дифференцировки, наибольшая базальная и индуцированная активность 7-этоксикумарин-О-деэтилазы выявлена в тех клетках, которые были более дифференцированы [23]. Известно, что находящиеся даже на поздних стадиях прогрессии, многие опухоли сохраняют признаки дифференцировки той ткани, из которой они возникли [24]. Соответствующие для гепатом 60 и 61 уровни дифференцировки могут различаться. С уменьшением дифференцировки ткани и увеличением степени ее анаплазии вероятность накопления неблагоприятных факторов значительно возрастает. Следовательно, с прогрессией опухолевого процесса уровень фермента должен падать. Однако исходный уровень цитохрома Р450 в исследуемых перевиваемых гепатомах оставался достаточно устойчивым параметром в процессе пассирования, т.е. фенотип опухоли по данному признаку не изменялся. Наличие цитохрома Р450 в опухоли уже является признаком дифференцировки опухолевой ткани, поскольку данный фермент считается маркером высокодифференцированных тканей и выявляется в поздние сроки периода пренатального развития. В частности, в низкодифференцированной гепатоме 22 цитохром Р450 не определялся [4]. Прямые доказательства в пользу того или другого предположения можно получить исследованием гепатом иммуногистохимическими методами.

Полученные результаты свидетельствуют о индуцибельности изоформы CYP2A5 в перевиваемой гепатоме 61, которая сопряжена с высокой экспрессией фермента. Избирательная индукция CYP2A5 в гепатоме 61 позволяет предположить о возможности индукции других изоформ в злокачественных новообразованиях. Можно допустить, что среди злокачественных опухолей печени могут обнаружиться опухоли, которые будут обладать способностью к индукции цитохрома Р450 на уровне, не отличающемся или даже превышающем степень индукции фермента в нормальной печени.

Частичное финансирование работы осуществлялось Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 01-04-49239).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nebert D.W., Gonzalez F.J.* (1987) Annu. Rev. Biochem., **156**, 945-993.
2. *Fernandez-Salguero P., Gonzalez F.J.* (1995) Pharmacogenetics, **5**, Spec No: S123-128.
3. *Tegtmeier M., Legrum W.* (1994) Archiv. Pharm. (Weinheim), **327**, 299-302.

4. *Kobliakov V., Kulikova L., Samoilov D., Lang M.A.* (1993) Mol. Carcinog., **7**, 276-280.
5. *Gelboin H.V., Wiebel F.J.* (1971) Ann. N.Y. Acad. Sci., **179**, .529-547.
6. *Hahnemann B., Salonpaa P., Pasanen M., Maenpaa J., Honkakoski P., Juvonen R., Lang M.A., Pelkonen O., Raunio H.* (1992) Biochem. J., **286** (Pt 1), 289-294.
7. *Pellinen P., Stenbeck•F., Rautio A., Pelkonen O., Lang M., Pasanen M.* (1993) Naunyn-Schmiedeberg's - Arch. Pharmacol., **348**, 435-443.
8. *Гельштейн В.И.* (1966) Возникновение и прогрессия экспериментальных опухолей печени. [Дис... докт мед наук]. Москва: ОНЦ РАМН,. 477 сс..
9. *Lowry O.H., Rosebrough N.F., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
10. *Omura T., Sato R.* (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2379-2385.
11. *Laemmli U.K.* (1970) Nature, **227**, 680-685.
12. *Bell D.Y., Hodgson E.* (1977) Gen. Pharmacol., **8**, 121-127.
13. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4350-4354.
14. *Dehnen W., Tomingas R., Roos J.* (1973) Anal. Biochem., **53**, 374-383.
15. *Werringloer J.* (1978) Meth. Enzymol., **52**, 297-302.
16. *Burke M.D., Prough R.A., Mayer R.* (1977) Drug Metab. Disp., **5**, 1-8.
17. *Prough R.A., Burke M.D., Mayer R.T.* (1978) Meth. Enzymol. **52**, 372-377.
18. *Legrum W., Stuehmeter G., Netter K.J.* (1979) Toxicol. Appl. Pharmacol., **48**, 195-204.
19. *Yamazaki H., Nishiguchi K., Serasinghe P., Nakanishi S.* (1990) Int. J. Biochem., **22**, 39-42.
20. *Gebhardt R., Alber J., Wegner H., Mecke D.* (1994) Biochem. Pharmacol., **48**, 761-766.
21. *Camus-Randon A.-M., Raffali F., Bereziat J.-C., McGregor D., Konstandi M., Lang M.A.* (1996) Toxicol. Appl. Pharmacol., **138**, 144-148.
22. *Howell S., Wareham K.A., Williams E.D.* (1985) Am. J. Pathol., **121**, 426-432.
23. *Reiners J.J., Cantu A.R., Thai G., Scholler A.* (1992) Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem., **20**, 360-366.
24. *Абелев Г.И.* (2000) Биохимия, **65**, 127-138.

Поступила 29.01.2002.

INDUCTION OF CYTOCHROME P450 2A5 IN TRANSPLANTED MICE HEPATOMAS

L.N. Kulikova

Institute of Cancerogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Center,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow 115478, Russia

We have studied selective induction *in vivo* isoform of cytochrome P4502A in mouse hepatomas. Activity of coumarin 7-hydroxylase was increased in hepatoma 61 following pyrazole and cobalt chloride treatment. Microsomes isolated from hepatoma 61 transplanted to mice treated with either pyrazole or cobalt chloride catalyzed oxidation of coumarin and 7-ethoxycoumarin at rates 2-2,5-fold higher than in saline controls. Western blot analysis of hepatoma microsomes showed that the increase in functional activity of coumarin 7-hydroxylase was due to induction of CYP2A5 (cytochrome P450 isoenzyme catalysing coumarin 7-hydroxylation). Pyrazole or cobalt chloride induced the enzyme activity in hepatoma 61, whereas we did not measure induction of CYP2A5 in hepatoma 60. The changes in the amount of CYP2A5 in liver were more pronounced after pyrazole treatment than that after cobalt. It is suggested that hepatomas 60 and 61 are originated through initiation of hepatocytes which are localized within different regions of liver lobule.

Key words: cytochrome P450, isoform CYP2A5, coumarin hydroxylase, hepatoma, liver