

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.1:614.875

©Коллектив авторов

БИЛИРУБИН КАК ЭНДОГЕННЫЙ ПОСРЕДНИК В АКТИВАЦИИ ЭКСПРЕССИИ *CYP1A1* ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

А.Ю. ГРИШАНОВА, Т.В. ЗУЕВА

НИИ молекулярной биологии и биофизики Сибирского отделения РАН, 630117
Новосибирск, Тимакова, 2. Факс (3832) 323-147, Эл. почта: agrish@cyber.ma.nsc.ru

Индукция ферментативной активности цитохрома P4501A1 (*CYP1A1*) является результатом лиганд-зависимого усиления транскрипционной активности соответствующего гена *CYP1A1*. Наиболее известными лигандами при индукции *CYP1A1* служат такие ксенобиотики, как полициклические и галогенированные ароматические углеводороды. Для эндогенных соединений аналогичная роль до недавнего времени была неизвестна.

В данной работе исследована способность билирубина – эндогенного метаболита гема, регулировать активность *CYP1A1*. Проведено изучение экспрессии *CYP1A1* в печени крыс на уровне мРНК, белка и функциональной активности при экспериментальном повышении уровня билирубина в крови. Исследовано также, происходит ли изменение концентрации неконъюгированного билирубина в крови крыс, подвергнутых контактному воздействию ультразвука на область печени при интенсивности 0,4 Вт/см² и длительности воздействия 10 минут, и какова при этом динамика изменения показателей, характеризующих активацию транскрипции *CYP1A1*. Обнаружено увеличение уровня неконъюгированного билирубина в крови крыс, подвергнутых контактному воздействию ультразвука на область печени. Повышение уровня билирубина в крови крыс, как после внутривенного введения, так и после воздействия ультразвуком сопровождается увеличением уровня мРНК, белка и функциональной активности *CYP1A1*. Эти данные, а также сопоставление временной зависимости изменений показателей активации транскрипции *CYP1A1* под действием ультразвука и при экспериментальном повышении уровня билирубина в крови, позволяют сделать вывод о том, что билирубин индуцирует *CYP1A1* в печени крыс и может быть посредником в активации экспрессии *CYP1A1* под действием ультразвука.

Ключевые слова: *CYP1A1*, экспрессия, ультразвук, билирубин.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохромы P450 являются ключевыми ферментами в монооксигеназных реакциях и обнаружены в разнообразных типах клеток. Термином *CYP* описывается суперсемейство генов этих ферментов [1].

Цитохром P450_{1A1} (*CYP1A1*) – продукт одного из генов семейства *CYP1A*, играет критическую роль в метаболических превращениях таких ксенобиотиков, как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [2]. Ген *CYP1A1* в большинстве тканей конститутивно не экспрессируется или экспрессируется на очень низком уровне, но значительно индуцируется под действием ПАУ, галогенированных ароматических углеводородов, среди которых наиболее известен 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*p*-диоксин (ТХДД) [3,4]. Активация гена *CYP1A1* происходит в результате взаимодействия транскрипционных факторов с определенными регуляторными элементами в 5'-фланкирующем регионе *CYP1A1*. Наиболее хорошо охарактеризованы транс-активирующие факторы AhR и ARNT [5]. AhR является лиганд-активируемым рецептором, а ARNT - ядерным переносчиком AhR, связанного с лигандом (индуктором). После связывания индуктора с Ah рецептором формируется гетеродимер с ядерным переносчиком ARNT, который связывается со специфическими распознающими последовательностями ДНК, локализованными на 5' конце от транскрипционного стартового сайта гена *CYP1A1* и известными как DRE (или XRE) [6]. В результате этих событий происходит изменение в структуре хроматина, которое облегчает связывание транскрипционных факторов с промотором *CYP1A1* [5, 7].

Несмотря на интенсивное изучение метаболизма субстратов *CYP1A1* и регуляцию транскрипции *CYP1A1* ксенобиотиками, до недавнего времени для этого фермента не были известны какие-либо эндогенные индукторы и субстраты. Предположение о существовании эндогенного индуктора для *CYP1A1* возникло при исследовании крыс линии Gunn, характеризующихся постоянной экспрессией *CYP1A1* в печени на фоне гипербилирубинемии, обусловленной генетическим дефектом гена УДФ-глюкуронозилтрансферазы - фермента, ответственного за конъюгацию продукта деградации гема - билирубина [8-10]. Кроме того, был обнаружен зависимый от индукторов *CYP1A1* путь деградации билирубина у крыс Gunn, введение которым ТХДД приводит к снижению уровня неконъюгированного билирубина в плазме [11], а также в микросомах печени эмбрионов крыс [12]. Эти данные показывают, что билирубин может быть субстратом для *CYP1A1* и может осуществлять регуляцию транскрипции гена *CYP1A1*. И, наконец, за последние два года были опубликованы результаты исследований, в которых на культурах клеток доказано, что билирубин является лигандом Ah рецептора и вызывает AhR-зависимую индукцию *CYP1A1* [13, 14].

Ранее нами было обнаружено явление индукции *CYP1A1* в микросомах печени крыс после воздействия терапевтических доз ультразвука на область печени. В печени крыс, подвергавшихся ежедневному действию ультразвука, через 5 дней иммунохимическим методом регистрируется *CYP1A1*, а его специфическая активность О-деэтилирования 7-этоксирезорфуфина возрастает в 3 раза [15].

Известно, что в результате воздействия терапевтическим ультразвуком с частотой 0,87 мегагерц на печень крыс происходит внутрисосудистый гемолиз, степень которого зависит от интенсивности и длительности экспозиции [16]. Появляющийся в результате этого в плазме крови внеэритроцитарный гемоглобин может служить источником гема, метаболизм которого в норме состоит из

ферментативного превращения в биливердин и затем в билирубин с участием гемоксигеназы и биливердинредуктазы соответственно.

В этой связи представлял интерес вопрос о том, происходит ли изменение концентрации неконъюгированного билирубина в крови крыс, подвергнутых контактному действию ультразвука на область печени при используемой нами интенсивности и длительности воздействия, и какова при этом динамика изменения показателей, характеризующих активацию транскрипции *CYP1A1*. Решение этого вопроса и было целью данного исследования. Кроме того, в работе проводилось изучение экспрессии *CYP1A1* в печени крыс на уровне мРНК, белка и функциональной активности при экспериментальном повышении уровня билирубина в крови.

МЕТОДИКА. Работа проведена на крысах самцах линии Вистар массой 180-200 г. Одну группу животных подвергали действию ультразвука интенсивностью 0,4 Вт/см² на область печени в течение 10 минут. Животных декапитировали через 1, 2, 4, 8, 16 и 24 часа после воздействия ультразвуком. Другой группе животных внутривенно вводили билирубин из расчета 0,25 мг на кг веса и декапитировали через 1, 2, 4, 8, 16 и 20 часов.

Микросомы печени выделяли методом дифференциального центрифугирования [17]. Определение белка проводили методом Лоури [18].

Определение концентрации внеэритроцитарного гемоглобина сыворотки крови крыс осуществляли модифицированным гемоглобинцианидным методом [19].

Определение общего и конъюгированного билирубина проводили реакцией диазотирования билирубина диазосульфаниловой кислотой в присутствии катализатора реакции кофеина-бензоата натрия (общий билирубин) и в отсутствие катализатора (конъюгированный билирубин) [20]. Количество свободного (неконъюгированного) билирубина рассчитывали как разницу общего и конъюгированного билирубина.

Суммарную клеточную РНК из печени крыс выделяли фенол-хлороформным методом [21]. После осаждения этанолом РНК растворяли в воде, свободной от РНКаз и обрабатывали ДНКазой свободной от РНКаз. Качество РНК оценивали в 1% агарозном геле. Количество РНК в каждом образце определяли спектрофотометрически при 260 нм. РНК хранили при -70°C [22].

Обратную транскрипцию 3 мкг РНК проводили в стандартной реакционной смеси объемом 25 мкл, которая содержала 50мМ Трис-НСl, рН 8,3, 8 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреитол, 4 мМ dNTP, РНазин (1 ед/мкл), 20 пМ oligo (dT)₂₅ d(A/G/C) и 10 ед. обратной транскриптазы (AMV). Перед добавлением в реакционную смесь РНК денатурировали при 70°C в течение 5 минут. Реакцию проводили 2 часа при 37°C [23].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси объемом 10 мкл, содержащей буфер, 0,01 % Твин, 1 мМ dNTP, по 20 нМ специфических для *CYP1A1* (или для β_2 - микроглобулина) 5' и 3' олигонуклеотидных последовательностей, 3 мкг кДНК, 1 ед. Таг ДНК-полимеразы. Режим амплификации: первый цикл - 94 - 1 мин., 59 - 1 мин., 72 - 1,2 мин.; 35 циклов - 95 - 3 мин., 59 - 3 мин., 72 - 2 мин.

Последовательности праймеров для *CYP1A1* были следующие:

5'-CTGGTTCTGGATACCCAGCTG-3' - прямой праймер;

5'-CCTAGGGTTGGTTACCAGG-3' - обратный.

Использование данных праймеров приводит к образованию продукта размером в 331 паре оснований [23].

Последовательности праймеров для β_2 -микроглобулина, при использовании которых образуется продукт размером 220 пар оснований, были следующие :

5'-ATCTTTCTGGTGCTTGTCTC -3' – прямой праймер;

5'-AGTGTGAGCCAGGATGTAGT -3' – обратный.

Определение количества мРНК CYP1A1 проводили после электрофоретического разделения продуктов ПЦР, полученных на кДНК CYP1A1 и кДНК β_2 -микроглобулина (аликвота 10 мкл) в 5% полиакриламидном геле. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали. Негативы геля сканировали, используя сканер ColorPage-HR5 PRO (Genius) и программу PhotoImpact SE. Денситометрию продуктов проводили с помощью программы Scion Image. β_2 микроглобулин был использован для определения конститутивного уровня транскрипции гена и контроля вариаций выделения общей РНК из каждого образца печени. Уровни мРНК CYP1A1 рассчитывали в относительных единицах как отношение между интенсивностью CYP1A1-специфической полосы и интенсивностью β_2 -микроглобулин-специфической полосы [23].

Электрофорез и иммуноблот-анализ проводили следующим образом. Белки микросом разделяли электрофорезом в градиентном (7 - 15%) полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [24]. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и выявляли согласно Таубин и соавт. [25], используя моноклональные антитела, полученные гибридомной технологией после иммунизации мышей CYP1A1 (клон 14H5) [26]. Данные моноклональные антитела реагируют с высокомолекулярными CYP1A1 и CYP1A2.

Активность CYP1A1 определяли флюориметрически по скорости O-деэтилирования высокоспецифичного для CYP1A1 субстрата - 7-этоксирезорфуина [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. **Определение внеэритроцитарного гемоглобина и свободного билирубина в сыворотке крови крыс.** На рисунке 1 представлены значения концентрации внеэритроцитарного гемоглобина и свободного билирубина в сыворотке крови крыс после контактного воздействия на печень ультразвуком. Концентрация внеэритроцитарного гемоглобина в сыворотке крови крыс возрастает через 1 час в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Концентрация свободного билирубина повышается в сыворотке крови крыс через 2 часа после воздействия ультразвуком в 2,2 раза по сравнению с контролем. Такое явление последовательного увеличения концентрации в сыворотке крови внеэритроцитарного гемоглобина и свободного билирубина может быть связано с тем, что в результате либо кавитационных явлений, либо активирования ультразвуком свободно-радикальных процессов мембраны эритроцитов разрушаются [16, 28], и гем освободившегося гемоглобина преобразуется ферментативно сначала в биливердин, а затем в билирубин.

На рисунке 2 показаны изменения концентрации свободного билирубина в сыворотке крови крыс после внутривенного введения этим крысам билирубина. После введения билирубина концентрация свободного билирубина в крови незначительно увеличивалась, достигая максимума через 4 часа, и через 24 часа снижалась до контрольного значения. Следует заметить, что максимальное значение концентрации свободного билирубина в этой ситуации (когда доза вводимого

билирубина была 0,25 мг на кг веса) было ниже, чем максимальное значение при воздействии ультразвуком, и максимум достигался в разное время.

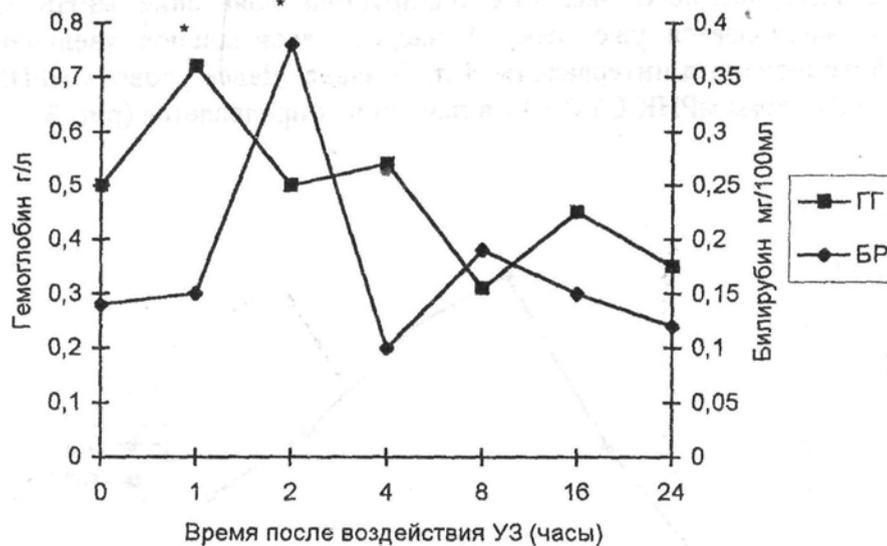


Рисунок 1.

Временная зависимость изменения концентрации внеэритроцитарного гемоглобина (ГГ) и свободного билирубина (БР) в сыворотке крови крыс после воздействия ультразвуком на печень ($0,4 \text{ Вт/см}^2$ в течение 10 минут). * - $P < 0,05$, по сравнению с исходным значением (контроль). В сериях было по 6 животных.

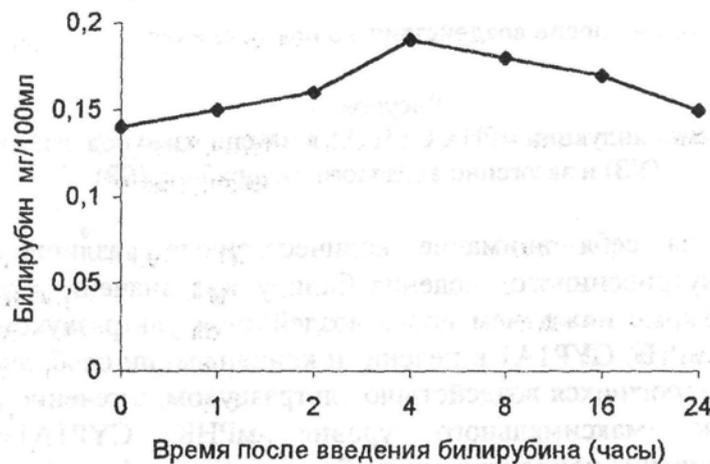


Рисунок 2.

Временная зависимость изменения концентрации свободного билирубина в сыворотке крови крыс после внутривенного введения билирубина (0,25 мг на кг веса).

Определение количества мРНК CYP 1A1.

Конститутивный уровень транскрипции гена и контроль вариаций выделения общей РНК из каждого образца печени определялся по уровню экспрессии гена β_2 -микроглобулина. Уровни мРНК CYP1A1 рассчитывали в относительных единицах как отношение между количеством CYP1A1- и β_2 -микроглобулин-специфического продукта ПЦР.

У контрольных животных мРНК СУР1А1 не определяется. После воздействия ультразвуком мРНК СУР1А1 в печени обнаруживается через 1 час, а максимальное увеличение уровня мРНК СУР1А1 наблюдается через 4 часа (рис. 3).

После внутривенного введения билирубина появление мРНК СУР1А1 в печени крыс наблюдается уже через 1 час, а максимальное увеличение мРНК СУР1А1 зафиксировано в интервале от 4 до 8 часов. Далее уровень мРНК СУР1А1 снижается и к 24 часам мРНК СУР 1А1 в печени не определяется (рис. 3).



Рисунок 3.

Временная зависимость индукции мРНК СУР1А1 в печени крыс под действием ультразвука (УЗ) и экзогенно введенного билирубина (БР).

Обращают на себя внимание количественные различия уровня мРНК СУР1А1: после внутривенного введения билирубина значения количества мРНК СУР1А1 в печени крыс ниже, чем после воздействия ультразвуком. Динамика же изменения уровня мРНК СУР1А1 в печени и концентрации свободного билирубина в крови у крыс, подвергшихся воздействию ультразвуком, в течение 24 часов такова, что установлению максимального уровня мРНК СУР1А1 предшествует максимальное увеличение концентрации свободного билирубина в крови. У крыс при внутривенном введении билирубина максимальное увеличение уровня мРНК СУР1А1 во времени совпадает с максимальным увеличением концентрации свободного билирубина в крови.

Иммунохимический анализ микросомальных белков печени.

На рисунке 4 представлены результаты иммуноблот-анализа белков микросом печени крыс с использованием моноклональных антител (клон 14Н5 [26]), распознающих антигенные детерминанты высокомолекулярных СУР1А1 и СУР1А2. В качестве образца индукции СУР1А1 и СУР1А2 представлены микросомы печени крыс, получавших классический индуктор - 3-метилхолантрен. На рисунке 4А показан

иммуноблот анализ белков микросом печени крыс после воздействия ультразвуком, на рисунке 4Б – после внутривенного введения билирубина. Видно, что CYP1A1 появляется в микросомах печени крыс через 4 часа после воздействия ультразвуком и сохраняется в течение 24 часов. После внутривенного введения билирубина CYP1A1 в микросомах печени появляется также через 4 часа, но спустя 16 часов уже не определяется.



Рисунок 4

Иммуноблотинг микросомных белков печени крыс после воздействия ультразвуком (А) и после экзогенного введения билирубина (Б). Белки микросом печени (10 мкг на дорожку) после электрофоретического разделения в градиентном (7-15%) полиакриламидном геле переносили на нитроцеллюлозную бумагу и подвергали иммунохимической обработке с использованием моноклональных антител против CYP1A1 и CYP1A2 (клон 14Н5 [26]).

(А): Дорожки 1 – контроль, 2 – через 1 час, 3 – через 2 часа, 4 – через 4 часа, 5 – через 8 часов, 6 – через 16 часов, 7 – через 24 часа, 8 – микросомы печени крыс, индуцированных 3-метилхолантреном.

(Б): Дорожки 1 – микросомы печени крыс, индуцированных 3-метилхолантреном, 2 – контроль, 3 – через 1 час, 4 – через 2 часа, 5 – через 4 часа, 6 – через 8 часов, 7 – через 16 часов, 8 – через 24 часа.

Активность CYP1A1.

На рисунке 5 показаны изменения 7-этоксирезорфин-О-деэтилазной активности, являющейся специфической для CYP1A1, в микросомах печени крыс под действием ультразвука и экзогенно введенного билирубина. Максимальная ферментативная активность наблюдается через 4 часа в микросомах печени крыс как после воздействия ультразвуком, так и при внутривенном введении билирубина. Однако при введении билирубина данный показатель снижается до контрольного значения через 24 часа, в то время как в результате действия ультразвука CYP1A1 сохраняет повышенную активность и через 24 часа.

Таким образом, в данном исследовании показано, что увеличение концентрации свободного билирубина в сыворотке крови крыс, достигаемое как в результате внутривенного введения билирубина, так и после контактного воздействия на область печени ультразвуком низкой интенсивности, сопровождается активацией экспрессии CYP1A1: увеличивается уровень мРНК CYP1A1, появляется белок CYP1A1, обладающий функциональной активностью. Сравнение временных зависимостей исследованных параметров показывает, что достижение максимальных

уровней мРНК CYP1A1 и ферментативной активности СУРА1 в печени практически совпадает по времени с максимальным увеличением концентрации свободного билирубина в крови. Эти данные позволяют утверждать, что билирубин участвует в регуляции активности CYP1A1. Принимая во внимание тот факт, что билирубин является лигандом Ah рецептора, как это было показано на клетках гепатомы мыши Нера 1c1c7 [13], можно предположить, что и в условиях *in vivo* билирубин также может регулировать экспрессию гена CYP1A1 AhR-зависимым путем.

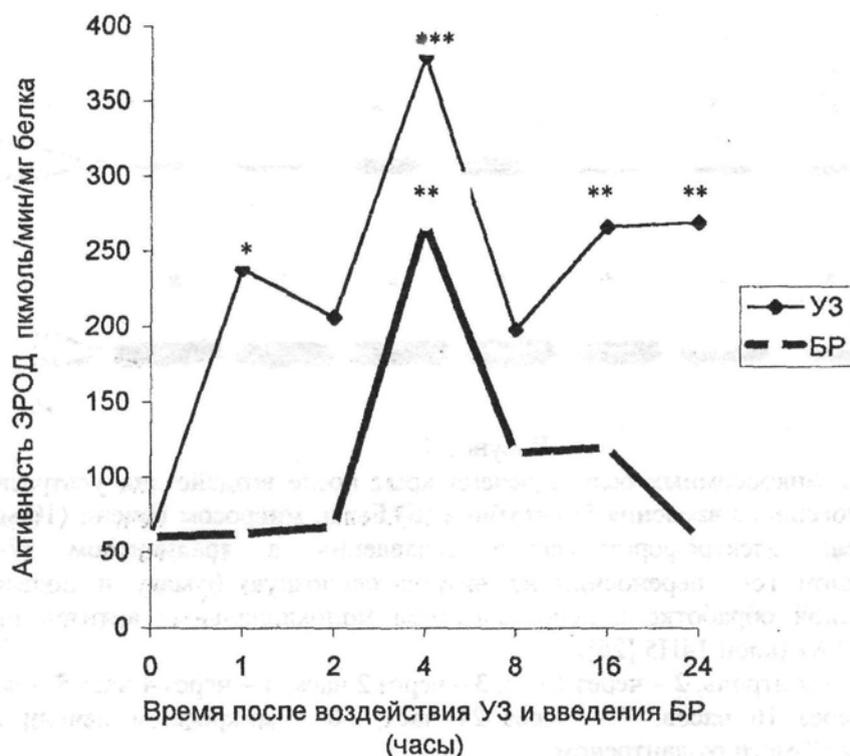


Рисунок 5.

Временная зависимость изменения 7-этоксирезорифин-О-диэтилазной активности в микросомах печени крыс под действием ультразвука (УЗ) и экзогенно введенного билирубина (БР). В сериях было по 6 животных, * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$.

Результаты данного исследования позволяют объяснить описанное нами ранее явление индукции CYP1A1 в печени крыс под действием ультразвука низкой интенсивности [15]. Эндogenous посредником в CYP1A1 при ультразвуковом воздействии может выступать билирубин. Данные, полученные при внутривенном введении билирубина, показывают что при достигнутом уровне концентрации билирубина в крови индукция CYP1A1 скоротечна. Под действием ультразвука более продолжительная индукция CYP1A1 может осуществляться либо в результате более высоких концентраций свободного билирубина в крови, либо из-за того, что помимо билирубина индуцирующее действие ультразвука на CYP1A1 опосредуют еще и другие эндогенные лиганды Ah рецептора.

В данном исследовании применялось контактное ультразвуковое воздействие на область печени с частотой 0,87 мегагерц, используемой в физиотерапевтической практике. Такое воздействие сопровождается индукцией активности одной из форм

цитохрома P450 – CYP1A1, которая осуществляет метаболическую активацию проканцерогенных полициклических ароматических углеводородов. Токсические эффекты, включая канцерогенез, тератогенез, гепатотоксичность, известны для хорошо изученного индуктора CYP1A1 ТХДД, имеющего наибольшую из всех известных индукторов сродство с Ah рецептором. В исследованиях на культурах клеток предполагается, что билирубин, являясь лигандом Ah рецептора, активирует транскрипцию гена CYP1A1 сходным, но не идентичным с ТХДД образом [13,14]. Вопрос о том, может ли ультразвуковое воздействие на область печени, в индуцирующем действии которого на CYP1A1 предполагается участие билирубина, сопровождаться аналогичными ТХДД токсическими эффектами, остается открытым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. (1996). *Pharmacogenetics*, **6**, 1-42.
2. Conney A.H. (1982). *Cancer Res.*, **42**, 4875-4917.
3. Fujii-Kuriyama Y., Imataka H., Sogawa K., Yasumoto K.-I., Kikuchi Y. (1992). *FASEB J.*, **6**, 706-710.
4. Safe S.Y. (1994). *Crit. Rev. Toxicol.*, **24**, 87-149.
5. Whitlock J.P. Jr., Okino S.T., Dong L., Ko H.P., Clarke-Katzenberg R., Ma Q., Li H. (1996). *FASEB J.*, **10**, 809-818.
6. Okey A.B., Riddick D.S., Harper P.A. (1994). *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**, 226-232.
7. Ko H.P., Okino S.T., Ma Q., Whitlock J.P., Jr. (1996). *Mol. Cell Biol.*, **16**, 430-436.
8. Iyanagi T., Watanabe T., Uchiyama Y. (1989). *J. Biol. Chem.*, **264**, 21302-21307.
9. Kapitulnik J., Hardwick J.P., Ostrow J.D., Webster C.C., Park S.S., Gelboin H.V. (1987). *Biochem. J.*, **242**, 297-300.
10. Kapitulnik J., Gonzalez F.J. (1993). *Mol. Pharmacol.*, **43**, 722-725.
11. Kapitulnik J., Ostrow J.D. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 682-685.
12. De Matties F., Dawson S.J., Boobis A.R., Comoglio A. (1991). *Mol. Pharmacol.*, **40**, 686-691.
13. Sinal C.J., Bend J.R. (1997). *Mol. Pharmacol.*, **52**, 590-599.
14. Phelan D., Winter G.M., Rogers W.J., Lam J.C., Denison M.S. (1998). *Arch. Biochem. Biophys.*, **357**, 155-163.
15. Гуляева Л.Ф., Гришанова А.Ю., Золотарева Т.А., Ляхович В.В. (1994). *Биохимия*, **59**, 804-807.
16. Saad A.H., Bahakim H.M., Helmi A., Bashaandi A.M., Lim L.K. (1986). *Ultrasound Med. Biol.*, **12**, 855-863.
17. Tata J.R. (1969) *Subcellular Components*, Eds Burnie G.D., Fox S.M., London, Butterworths, 83-107.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
19. Тонкошкурова О.А., Дмитриев А.И., Дмитриева Р.Е. (1996). *Клин. Лаб. Диагн.*, **2**, 21-22.
20. Акинчиц М.А., Павловская Н.А. (1986) *Лабораторное дело*, **2**, 727-730.

21. *Chattopadhyay N, Kher R, Godbole M.* (1993). *Biotechniques*, **15**, 24-26.
22. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. (1984) Молекулярное клонирование, Москва, Мир.
23. *Morris D.L., Davila J.C.* (1996). *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 781-792.
24. *Laemmli U.K.* (1970). *Nature*, **27**, 680-685.
25. *Towbin H., Staehelin T., Gordon G.* (1979). *Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
26. *Grishanova A.Y., Lyakhovich V.V.* (1992). *Proc. VII Int. Conf. on Cytochrome P450*, (eds/ A.I. Archakov, G.I. Bachmanova). INCO-TNC, Moscow, pp. 525-527.
27. *Burke M.D., Thompsjn S., Elcombe C.R., Halpert J., Yaaparanta T., Mayer R.T.* (1985). *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2300-2304.
28. Эльштейн И.Е. (1973). Биофизика ультразвука, Москва, Наука.

Поступила 11.01.2000

BILIRUBIN AS THE ENDOGENOUS INTERMEDIARY IN THE ACTIVATION OF CYP1A1 EXPRESSION UNDER ULTRASOUND ACTION

A.YU. GRISHANOVA, T.V. ZUEVA

Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical
Sciences, 630117 Novosibirsk, Timakova str., 2. Fax (3832) 323-147,
E-mail: agrish cyber.ma.nsc.ru

The induction of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) enzyme activity reflects the increased ligand-dependent transcriptional activity of the cognate *CYP1A1* gene. The list of ligands includes various xenobiotics such as polycyclic and halogenated aromatic hydrocarbons. Until recently, similar role for endogenous compounds was unknown.

In the present study the ability of the endogenous heme metabolite, bilirubin, to regulate CYP1A1 activity was examined. The following parameters were investigated: expression of *CYP1A1* in rat liver at a level mRNA, protein and functional activity under at the experimental rising of blood bilirubin level. The influence of local ultrasound contact treatment of rats hepatic area *in vivo* (the intensity 0,4 W/cm² and duration time of 10 minutes) on blood unconjugated bilirubin concentration and parameters of *CYP1A1* transcriptional activity was also investigated. The ultrasound contact action on rat hepatic are increased blood unconjugated bilirubin concentration. The rise of bilirubin levels of in rat blood after intravenous administration of bilirubin as well as after ultrasound treatment was accompanied by increased mRNA CYP1A1, protein and functional activity of CYP1A1. The comparison of these data with that of time-dependent changes of parameters of *CYP1A1* transcriptional activity under ultrasound action and experimental rising of blood bilirubin level suggest that induces CYP1A1 and may be an intermediate in the activation of *CYP1A1* expression under ultrasound action.

Key words: CYP1A1, expression, ultrasound, bilirubin,