

## ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА P450 2E1 В ПЕЧЕНИ НА ТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КАНЦЕРОГЕННОСТЬ ДИЭТИЛНИТРОЗАМИНА У МЫШЕЙ

© 2015 г. В.И. Каледин, С.И. Ильницкая, Е.А. Васюнина, Н.А. Попова\*,  
Л.А. Богданова\*\*, М.Л. Перепечаева\*\*\*, А.Ю. Гришанова\*\*\*

*Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10*

*E-mail: kaledin@bionet.nsc.ru*

*\*Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2*

*E-mail: nelly@bionet.nsc.ru*

*\*\*Научно-исследовательский институт региональной патологии и патоморфологии СО РАМН,  
630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2*

*E-mail: dud-lusi@yandex.ru*

*\*\*\*Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2*

*E-mail: agrish@niimb.ru*

Поступила в редакцию 03.07.14 г.

Изучены биологические эффекты диэтилнитрозамина в контролируемых условиях его метаболизма у мышей разного возраста. Полученные результаты показывают, что общетоксическое и гепатоканцерогенное действие оказывает неметаболизированный диэтилнитрозамин, тогда как токсическое повреждение печени вызывают его алкилирующие метаболиты. Результаты работы позволяют поставить вопрос о пересмотре принятых представлений об исключительной роли мутагенной активации в канцерогенном действии химических соединений.

*Ключевые слова: подсосные мыши, диэтилнитрозамин, метаболизм, канцерогенность, токсичность.*

Диэтил- и диметилнитрозамины (ДЭНА и ДМНА) широко применяются в экспериментальной онкологии как канцерогены при индукции опухолей печени, почек и других органов у экспериментальных животных. Показано, что в организме они подвергаются ферментативному деалкилированию и денитрозированию с последующим образованием высокоактивных низкомолекулярных производных, способных алкилировать клеточные макромолекулы, в том числе ДНК, и вызывать их повреждение [1–5]. При этом считалось, что бактерии, не имеющие соответствующих ферментов активации нитрозаминов, не чувствительны к их действию [2]. Одним из основных ферментов, осуществляющим метаболизм ДЭНА и ДМНА (как деэтилирование, так и денитрозирование), является цитохром P450 2E1 (CYP2E1), конститутивно экспрессирующийся в печени и в норме метаболизирующий различные низкомолекулярные

биогенные амины и спирты [6–9]. Нитрозамины в значительных количествах присутствует в табачном дыме, промышленных стоках, некоторых напитках и пищевых продуктах и могут синтезироваться в кислом содержимом желудка эндогенно. Практическая значимость их, в особенности в связи с курением и потреблением этанола, явилась причиной повышенного внимания к данным нитрозаминам со стороны биохимиков и онкологов, пытавшихся выяснить, каким образом они вызывают развитие опухолей и в какой степени это зависит от их метаболизма. В многочисленных исследованиях, проведенных в основном в конце прошлого века, было показано, что этанол индуцирует активность ферментов, метаболизирующих диалкилнитрозамины, но неоднозначно влияет на их канцерогенную активность – усиливает в одних случаях и ослабляет в других [10–13]. Разноречивость результатов, полученных в этих исследованиях, на наш взгляд, могла быть связана с множественными физиологическими эффектами, вызываемыми потреблением этанола [14,15], а также с недостаточным учетом осо-

Сокращения: ДЭНА – диэтилнитрозамин, ДМНА – диметилнитрозамин, CYP2E1 – цитохром P450 2E1.

бенностей CYP2E1 при планировании и постановке экспериментов *in vivo*. Дело в том, что в большинстве из них этанол и нитрозамины вводили хронически, причем обычно через произвольные промежутки времени между введениями. Между тем этанол является не только индуктором CYP2E1, стабилизирующим молекулы фермента (за счет чего и осуществляется индукция) [16,17], но и его субстратом, конкурентно ингибирующим метаболизм нитрозаминов. Поскольку этанол вводят обычно в количестве на один-два порядка больше, чем канцероген, последний начинает реально метаболизироваться только после выведения основной массы этанола. Однако после выведения этанола начинается деиндукция фермента, активность которого быстро возвращается к норме [16,17]. Сроки, когда этанол уже перестает действовать как ингибитор метаболизма нитрозамина и когда еще сохраняется индуцированная им активность CYP2E1, невелики (менее суток [18,19]), и поэтому при хроническом введении канцерогена – что является условием индукции опухолей печени у взрослых животных – как правило, бывает трудно решить, действовал ли этанол в данном случае как стимулятор или как ингибитор его метаболизма. В литературе имеются сведения о том, что изопропанол как индуктор CYP2E1 значительно превосходит по активности этанол [18], а голодание животных еще более увеличивает у них влияние индукторов [20]. В связи с этим в настоящей работе для индукции Cyp2e1 мы вводили мышам однократно изопропанол и подвергали их суточному голоданию. Нам представлялось, что корректно разрешить вопрос о значении метаболизма ДЭНА для его канцерогенного действия можно при использовании в экспериментах на 12–14-суточных мышках-сосунках, у которых однократного введения канцерогена оказывается достаточно для индукции опухолей печени и у которых поэтому можно разграничить стимулирующее влияние спирта на активность фермента и конкурентное ингибирование им метаболизма ксенобиотика. В этом случае имеется возможность изучать влияние метаболизма ДЭНА на его канцерогенную активность, вводя нитрозамин через определенное время после спирта, когда последний уже будет выведен, но когда еще сохраняется индуцированная им активность Cyp2e1. Недавно авторы работы [4] попытались подойти к решению этого вопроса с другой стороны, а именно выяснить, будет ли ДЭНА при однократном введении в подсосном периоде индуцировать опухоли у генетически модифицированных мышей с выключенной функцией Cyp2e1. В соответствии с при-

нятыми представлениями ожидалось, что у нокаутных мышат опухоли не должны индуцироваться. Однако в ходе эксперимента выяснилось, что у них наблюдается не отсутствие, а лишь задержка в появлении опухолей печени. Мы в настоящей работе предприняли попытку выяснить влияние на канцерогенный эффект ДЭНА контролируемой стимуляции его метаболизма, полагая, что увеличение активности Cyp2e1 в момент введения мышатам канцерогена должно усилить его, если действующим началом являются продукты метаболизма ДЭНА, или ослабить, если действует исходное соединение. Полученные результаты показали, что стимуляция метаболизма ДЭНА усиливает его повреждающее действие на печень, но ослабляет общетоксическое и гепатоканцерогенное действие.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** В опытах использованы мыши линии ICR, полученные из вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в пластиковых ванночках при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище (брикетированный корм «Чара», Сергиев Посад, Россия). Все манипуляции с ними проводили в соответствии с правилами обращения с животными (European Communities Council Directive (86/1986/EEC)).

**Изучение деэтилирования диэтилнитрозамина.** Для изучения условий стимуляции метаболизма ДЭНА у подсосных мышат их отсаживали от матерей и индуцировали активностью Cyp2e1 введением 20%-го раствора изопропанола (100 мкл на 10 г массы тела) и суточным голоданием. По истечении этого срока мышат умерщвляли декапитацией и объединенные образцы печени гомогенизировали в трех объемах холодного 1,15% KCl, 20 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,4. Из гомогенатов методом дифференциального центрифугирования получали 9S-фракцию печени (осаждаемую при 9000 g) и фракцию микросом. Концентрацию белка в них определяли с использованием красителя кумасси G250 и бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Активность Cyp2e1 определяли с использованием его специфического субстрата *p*-нитрофенола [21] и ДЭНА (Serva, Германия), деэтилирование которого изучали по методу Chau с соавт. [22], модифицированному Lee с соавт. [23]. В качестве контроля использовали препараты микросом из печени одновозрастных интактных мышат.

**Индукция и оценка канцерогенеза в печени.** При изучении гепатоканцерогенеза были по-

ставлены эксперименты на подсосных мышатах-самцах, половине из которых на 12-е сутки жизни ввели изопропанол, как указано выше, и отсадили их от матерей, а другую половину оставили интактными с матерями. Через 24 ч всем мышатам ввели внутривентриально ДЭНА по 50 мкг/г массы тела и вернули их к родительским самкам, от которых забрали (выбраковали) самочек. После отсадки в месячном возрасте контрольных и опытных мышей содержали вместе в стандартных условиях группами по шесть-семь особей в клетке размером  $36 \times 20 \times 15$  см до конца эксперимента. В возрасте 8,5 месяцев им в течение 3–5 сут давали измельченный корм, содержащий 3% сернокислого железа, после чего умерщвляли декапитацией, печень взвешивали, разделяли на доли и в течение 2–3 ч выдерживали в свежеприготовленной смеси, состоящей из равных объемов 30% формалина, 2N соляной кислоты и 5% ферроцианида калия [24,25] для выявления ионов железа. Опухоли и предопухолевые образования выявлялись при этом как железodefицитные узелки, которые подсчитывали и измеряли с помощью окуляр-микрометра под бинокулярной лупой при увеличении 10х.

**Токсикологическое изучение.** Общетоксическое и гепатотоксическое действие ДЭНА изучали на подсосных и взрослых самцах мышей. В качестве показателей общей токсичности использовали снижение массы тела и гибель мышшей, а гепатотоксичности – активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови. Чтобы дифференцировать токсическое действие метаболитов ДЭНА и исходного соединения, его вводили животным либо после индукции *Syr2e1* изопропанолом и голодом, как описано выше, либо в смеси с изопропанолом (2 г/кг массы тела). Введение смеси осуществляли внутривентриально в объеме 1 мл на 100 г массы тела. У животных определяли исходную массу тела и ее изменение в ходе эксперимента относительно исходной. Для определения гепатотоксического действия подопытных и контрольных мышшей умерщвляли декапитацией и в сыворотке их крови с помощью набора реактивов фирмы VECTOR BEST (Новосибирск, Россия) определяли активность аланинаминотрансферазы, которую выражали в мкмоль продукта на 1 мл сыворотки в час.

**SOS-хромотест.** Для оценки генотоксичности в SOS-хромотесте использовали штамм *E. coli* PQ37, в котором структурный ген  $\beta$ -галактозидазы *lacZ* введен под контроль промотора *din*-индуцибельного гена *sfiA*, так что  $\beta$ -галактозидазная активность зависит от экспрессии гена *sfiA* и индуцируется при действии на

клетки бактерий многих генотоксикантов. Анализ проводили по методике, описанной в работах [26,27]. Для этого 0,1 мл ночной культуры штамма разбавляли 5 мл LA-среды и инкубировали при 37°C на качалке в течение 2–3 ч до достижения концентрации  $2 \cdot 10^8$  бактерий/мл. Затем по 1 мл культуры добавляли к 9 мл свежей среды (для анализа без метаболической активации, серия X) и к 9 мл активационной среды, содержащей 0,2 М трис (pH 7,4), 330 мМ KCl, 80 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ глюкозо-6-фосфата, 150 мМ NADP и 1 мл 9S-фракции из печени мышшей (для анализа с метаболической активацией, серия Y). По 0,6 мл из каждой серии переносили в закрывающиеся стеклянные пробирки, содержащие по 10 мкл либо воды, либо раствора ДЭНА, и инкубировали их при встряхивании в течение 2 ч при 37°C. После инкубации по 30 мкл смеси из каждой пробирки переносили в две новые пробирки, одну из которых использовали для определения активности  $\beta$ -галактозидазы, а другую – щелочной фосфатазы. Для лизиса клеток в пробирку вносили по 270 мкл 0,2 М Na-фосфатного буфера, pH 7,75, содержащего 0,1 М KCl, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,3 мМ дитиотрептола и 0,1% додецилсульфата натрия, и термостатировали в течение 10–15 мин при 37°C.  $\beta$ -Галактозидазную реакцию инициировали добавлением 60 мкл раствора *o*-нитрофенил- $\beta$ -галактозида (4 мг/мл), а останавливали через 30 мин добавлением 200 мкл 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 405 нм против контроля, не содержащего клеток. При определении активности щелочной фосфатазы использовали 1 М трис-HCl, pH 8,05, буфер, содержащий 0,1% додецилсульфата натрия, и *n*-нитрофенилфосфат (4 мг/мл) в качестве субстрата, а реакцию останавливали добавлением 200 мкл 1,5 М NaOH. О влиянии препарата на жизнеспособность бактерий судили по отношению активности щелочной фосфатазы в опыте и в контроле, а генотоксичность определяли как фактор индукции (*FI*) по формуле  $FI = R_o/R_c$ , где  $R_o$  – отношение активности  $\beta$ -галактозидазы к активности щелочной фосфатазы в опыте, а  $R_c$  – то же в контроле (в отсутствие ДЭНА).

**Статистика.** Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием программы MS Excel 7.0; достоверность различий между средними определяли по *t*-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Индукция цитохрома P450 2e1.** Как следует из табл. 1, метаболизирующая активность мик-

**Таблица 1.** Влияние изопропанола и суточного голодания на активность ферментов, метаболизирующих диэтилнитрозамин в печени подсосных мышат линии ICR

Ферментативная активность	Число опытов	Контроль	Индукция изопропанолом и голоданием	Фактор индукции
<i>n</i> -Нитрофенолгидроксилаза, нмоль <i>n</i> -нитрокатехола/мин/мг белка	4	1,96 ± 0,31	4,78 ± 0,97*	2,44
N-диэтилнитрозаминдеэтилаза, нмоль ацетальдегида/мин/мг белка	2	2,19 0,91	5,42 2,40	2,47 2,64

Примечание. Указано число опытов с использованием объединенных микросом печени от четырех мышат в каждом опыте. Данные представлены как  $M \pm m$ . \*Достоверное отличие от контроля ( $p < 0,5$ ).

**Таблица 2.** Частота и множественность опухолевых поражений печени у самцов мышей линии ICR, получавших ДЭНА в контроле или через сутки после внутрибрюшинного введения изопропанола и пищевой депривации

	Контроль (только ДЭНА)	Опыт (изопропанол + суточное голодание + ДЭНА)
Число мышей всего	18	20
из них с опухолевыми узелками в печени (%)	18 (100)	20 (100)
Продолжительность жизни, сут	259,0 ± 4,1	253,0 ± 3,3
Масса тела, г	36,7 ± 1,2	38,6 ± 0,9
Относительная масса печени, %	5,89 ± 0,34	4,84 ± 0,18*
Общее число узелков в печени	79,0 ± 7,3	43,0 ± 6,2**
из них диаметром 2 мм и более	19,0 ± 4,0	4,0 ± 1,1**
Средний диаметр самого большого узелка, мм	5,2 ± 0,61	2,50 ± 0,27**

Примечание. Изопропанол в виде 20%-го водного раствора вводили мышатам по 0,1 мл на 10 г массы тела внутрибрюшинно на 12-е сутки жизни и в течение 24 ч лишали их пищи. ДЭНА в дозе 50 мкг/г массы тела вводили на 13-е сутки жизни. Опухолевые поражения печени учитывали как железodefицитные узелки после окраски по Перлсу [25]. Данные представлены как  $M \pm m$ . Звездочками отмечено достоверное отличие от контроля (\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ).

росом в отношении *para*-нитрофенола у получавших изопропанол и голодавших мышат была в 2,5 раза выше по сравнению с контрольными ( $p < 0,05$ ). Прямое определение скорости метаболизма ДЭНА по образованию ацетальдегида также показало в 2,5 раза большую ее величину у преиндуцированных животных по сравнению с контролем (табл. 1). Полученные результаты показали, что примененный нами относительно щадящий способ воздействия на животных обеспечивает достаточно высокую степень индукции у них активности Cyp2e1 в печени и может быть использован при выяснении вопроса о роли метаболизма ДЭНА в его канцерогенном действии на печень.

**Метаболизм снижает канцерогенность диэтилнитрозамин.** Из табл. 2 видно, что как в контрольной, так и в опытной группах опухолевые узелки в печени развились у 100% животных, однако в опытной группе среднее число их на мышь было почти в два (в 1,8) раза меньше, а крупных (диаметром 2 мм и более) –

почти в пять раз меньше, чем в контрольной ( $p < 0,001$ ). Полученные результаты были подтверждены нами в другом эксперименте на несколько переросших (семнадцати 15–16-суточных) мышатах, у которых ДЭНА вызвал развитие в печени в среднем по  $34,0 \pm 5,5$  опухолевых узелков в контроле и лишь по  $14,0 \pm 3,9$  узелков в опыте у мышей, получавших изопропанол и голодавших перед введением ДЭНА. Дозы препаратов и способ воздействия в этом эксперименте были такими же, как в предыдущем, поэтому на общем уровне числа узелков в нем сказался, очевидно, бóльший возраст мышат в момент воздействия. Тем не менее различие между опытом и контролем в этом случае также было достоверным ( $p < 0,01$ ).

**Ингибирование метаболизма уменьшает гепатотоксичность и увеличивает общую токсичность диэтилнитрозамин.** Чтобы убедиться, что снижение канцерогенного эффекта ДЭНА в наших экспериментах действительно связано со стимуляцией его метаболизма, мы попытались

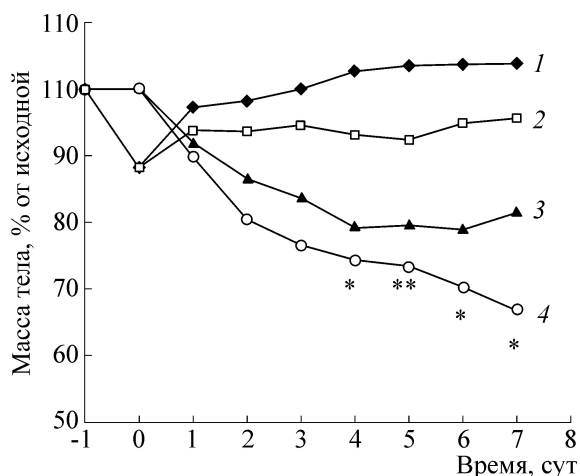
**Таблица 3.** Влияние изопропанола как индуктора активности Cyp2e1 в печени (изопропанол + голод) и как ингибитора метаболизма ДЭНА (в смеси с ДЭНА) на его гепатотоксическое действие у мышей

Группа и воздействие	Активность аланинаминотрансферазы в крови (мкмоль/мл/ч) после введения ДЭНА	
	Через 24 ч	Через 48 ч
1. ДЭНА в нулевые сутки	12,0 ± 1,1 (6)	35,0 ± 8,0** (3)
2. Изопропанол + голод за сутки до введения ДЭНА, ДЭНА в нулевые сутки	29,0 ± 7,5* (6)	64,0 ± 12,2** (3)
3. Изопропанол + ДЭНА в смеси в нулевые сутки	7,0 ± 2,0 (7)	7,7 ± 3,7 (3)
4. Изопропанол за сутки до введения ДЭНА	–	5,4 ± 0,9 (3)
5. Контроль (без воздействия)	–	5,3 ± 0,7 (4)

Примечание. В опытах использованы самцы мышей линии ICR в возрасте 2,5 месяцев. Изопропанол (2 мл/кг в виде 20%-го раствора) вводили внутривентриально и лишали животных пищи в течение 24 ч. ДЭНА вводили внутривентриально в дозе 150 мг/кг. Мышей умерщвляли декапитацией через 24 и 48 ч после введения ДЭНА или через 48 и 72 ч после введения изопропанола. В скобках указано число животных. Данные представлены как  $M \pm m$ . \* – Достоверное отличие от групп 1 и 3 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достоверное отличие от групп 3, 4 и 5 ( $p < 0,05-0,001$ ).

применить противоположное воздействие, а именно ингибировать его метаболизм. Для этого использовали конкурентный ингибитор метаболизма ДЭНА изопропанол, который ввели 12-суточным мышатам в смеси с ДЭНА. Дозы препаратов были при этом использованы такие же, как в предыдущих экспериментах, в которых они при раздельном применении хорошо пере-

носились животными (изопропанол – 2 г/кг, ДЭНА – 50 мг/кг). Однако при совместном введении они вызвали гибель всех мышат в среднем через  $120 \pm 15,7$  ч после воздействия, что не позволило нам оценить влияние ингибирования метаболизма ДЭНА на его канцерогенное действие. Для повторения же экспериментов с более низкими дозами ДЭНА, требующих обеспечения их всеми необходимыми для этого контролями, мы в тот момент не имели возможности. Поэтому, имея намерение изучить токсические последствия совместного применения изопропанола и ДЭНА, мы провели несколько опытов на взрослых мышах, в которых в качестве критерия токсичности использовали повреждение клеток печени, оцениваемое, как это принято, по увеличению активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови. При той же дозе изопропанола (2 г/кг) мы увеличили дозу ДЭНА до 150 мг/кг. Результаты представлены в табл. 3. Вопреки ожидаемому, оказалось, что изопропанол при введении за сутки до ДЭНА увеличивает, а при одновременном с ДЭНА введении уменьшает его повреждающее действие на печень (сам по себе – без ДЭНА – изопропанол не влиял на активность аланинаминотрансферазы в крови мышей). Чтобы сопоставить эти результаты с теми, которые были получены на подсосных мышатах, в следующей серии экспериментов на взрослых мышах мы в качестве показателя общетоксического действия использовали уменьшение массы тела животных. Как следует из рисунка, после введения ДЭНА (в этом опыте – 200 мг/кг) масса тела мышей линейно снижалась в течение 4 сут, после чего стабилизировалась на уровне 80% от исходной и в дальнейшем



ДЭНА вводили внутривентриально в дозе 200 мг/кг массы тела в нулевые сутки. Для индукции активности Cyp2e1 мышам сутками ранее вводили внутривентриально изопропанол в дозе 2 мл/кг массы тела и на 24 ч лишали их пищи (группа 1). Группа 2 – индукция Cyp2e1, как в группе 1 плюс ДЭНА в нулевые сутки. Группа 3 – только ДЭНА в нулевые сутки. Группа 4 – ДЭНА в смеси с изопропанолом в тех же дозах внутривентриально в нулевые сутки. На оси абсцисс – время относительно момента введения ДЭНА, сутки; на оси ординат – масса тела в процентах от исходной (за сутки до введения ДЭНА). В группах 1–3 – по четыре мыши; в группе 4 – пять мышей. Звездочками отмечены моменты их гибели.

**Таблица 4.** Общетоксическое и ДНК-повреждающее действие ДЭНА в SOS-хромостесте на бактериях штамма PQ37 *E. coli* в отсутствие (над чертой) и в присутствии (под чертой) цитозоля и микросом (9S-фракции) из печени мышей

Образец	Доза ДЭНА, мкг/пробу	Живые бактерии, %	Фактор индукции
1	0,19	67	1,99
		95	1,18
2	0,24	63	1,70
		78	1,44
3	0,24	57	2,42
		73	0,92
4–8	0,32	47,6 ± 2,0	3,30 ± 0,24
		71,2 ± 2,50*	1,42 ± 0,07*

Примечание. Методика исследования описана в разделе «Материалы и методы». 9S-фракцию получали центрифугированием 25%-х гомогенатов печени интактных подсосных мышат линии ICR. Величину фактора индукции определяли по формуле  $FI = R_o/R_c$ , где  $R_o$  – отношение активности β-галактозидазы к активности щелочной фосфатазы в опыте, а  $R_c$  – в контроле (в отсутствие ДЭНА). В качестве положительного контроля в опытах использовали 3,4-бензпирен (2,5 мкг на анализ). В условиях наших экспериментов фактор индукции 3,4-бензпирена был равен  $3,0 \pm 0,2$  (без 9S-фракции – 1,0). \* – Достоверное отличие от значений над чертой,  $p < 0,001$ .

начала медленно повышаться (кривая 3). После совместного введения ДЭНА с изопропанолом (кривая 4) за те же 4 сут она упала ниже 75% от исходного значения и в течение последующих 4 сут все животные погибли. В отличие от этого, предварительное введение изопропанола и суточное голодание мышей существенно защищало их от токсического действия ДЭНА (кривая 2). Сам по себе изопропанол и последующее голодание вызывали примерно 10%-ю потерю массы тела, которая полностью восстановилась в течение 3 сут после возобновления кормления (кривая 1).

Таким образом, повреждающее действие ДЭНА на печень не совпадает с его общетоксическим и гепатоканцерогенным действием. Повреждение гепатоцитов осуществляется, по-видимому, алкилирующими продуктами его метаболизма, тогда как общая токсичность, оцениваемая по снижению массы тела и гибели животных, и гепатоканцерогенность обуславливаются преимущественно исходным соединением.

Прямое токсическое действие неметаболизированного ДЭНА на бактерии *S. typhimurium* было зарегистрировано нами недавно при работе с тестом Эймса [27]. Подобное наблюдение было сделано ранее на собаках, у которых вдыхание паров диметилнитрозамина вызывало острую летальность при незначительном повреждении печени [1]. Чем конкретно вызывается

эта общая токсичность и является ли она результатом органического поражения или каким-то регуляторным нарушением, неизвестно. Важно, однако, иметь в виду, что она положительно связана с канцерогенным действием ДЭНА на печень. В работе [28] приведены многочисленные примеры того, что канцерогенная активность нитрозаминов не совпадает с их ДНК-повреждающей активностью, т.е. что они могут индуцировать опухоли не через посредство алкилирующих метаболитов. Механизм, посредством которого неметаболизированные (не-мутагенные) соединения могут инициировать образование опухолей, мы в общих чертах рассматривали ранее [29–33] и в данной работе обсуждать не будем. Здесь же уместно привести результаты, полученные нами в SOS-хромостесте.

**SOS-хромостест.** Как следует из табл. 4, ДЭНА дозозависимо снижает жизнеспособность тестовых бактерий *E. coli* и оказывает генотоксическое действие, однако добавление в инкубационную среду 9S-фракции из печени мышей защищает бактерий от его как токсического, так и «мутагенного» действия. Кавычки здесь поставлены потому, что в этом тесте о мутагенности судят по активности ферментов, коэкспрессирующихся с некоторыми генами, участвующими в репарации бактериальной ДНК после вызванного повреждением нарушения ее репликации. Однако генотоксический

эффект в этом тесте может имитироваться веществами, активирующими данные ферменты не через посредство повреждения ДНК. Такое возможно, например, при их действии непосредственно на молекулы фермента или на промежуточные механизмы, передающие информацию о повреждении ДНК на системы ее репарации. И эффект в этом случае может достигаться не только за счет химического, но и за счет физико-химического взаимодействия агента с белковой молекулой, как это было показано нами для темпола, стимулирующего активность альдегиддегидрогеназы в печени мышей [34]. Далее, ДЭНА может оказывать действие на экспрессию тех или иных генов, влияя на активность факторов транскрипции, как это имеет место в печени мышей и крыс [35,36]. Более того, было сообщено [37], что через 6 ч после введения ДЭНА в гепатоцитах мышей наблюдалась массивная экспрессия транскрипционного фактора *Ost4*, характерного для эмбриональных клеток и не экспрессирующегося в дифференцированных клетках печени. Нам представляется, что с этим и подобными эффектами ДЭНА и следует связывать его канцерогенные свойства.

Как уже было сказано во введении, в экспериментах Канга с соавторами [4] на нокаутных по *Cyp2e1* мышатах было получено лишь замедление появления индуцированных ДЭНА опухолей печени, а не полное их отсутствие. В соответствии с традиционными представлениями об инициации опухолей генотоксическими продуктами метаболизма ДЭНА авторы пишут, что метаболическая активация ДЭНА в их опытах могла осуществляться другими изоформами цитохрома P450, в частности 2A6. Однако в работах [38] и [39], на которые ссылаются Канг с соавторами, речь идет о взрослых мышах и человеческих цитохромах. Канг же вводил ДЭНА мышатам в 14-суточном возрасте, тогда как *Cyp2a5*, мышинный аналог человеческого *CYP2A6*, начинает экспрессироваться в их печени только к самому концу 3-й недели жизни [42].

**В заключение** несколько слов о возможной причине кажущегося несоответствия между результатами, полученными нами (ослабление канцерогенного действия ДЭНА при стимуляции его метаболизма), с одной стороны, и Кангом с соавторами (ослабление канцерогенного действия ДЭНА при подавлении его метаболизма у нокаутных по гену *Cyp2e1* мышей) [4] – с другой. В наших экспериментах различия между опытной и контрольной группами мышей имели место только на стадии инициации канцерогенеза, а именно в первые часы или сутки после введения ДЭНА, когда у них еще разли-

чалась активность *Cyp2e1* в печени. Все остальное время до конца опыта энзиматический статус подопытных и контрольных животных был одинаковым, что исключает различия в прохождении у них прогрессии опухолей. В отличие от этого, в опытах Канга и соавт. [4] нокаутные мыши отличались от контрольных не только на стадии инициации, но и в течение всей последующей жизни, когда осуществляется промоция канцерогенеза и прогрессия опухолей. При этом у нормальных животных *CYP2E1*, метаболизируя эндогенные субстраты, вызывает оксидативный стресс, провоцирующий воспалительную реакцию непаренхиматозных клеток печени, которые секретируют цитокины и ростовые факторы, стимулирующие компенсаторную пролиферацию иницированных гепатоцитов и промотирующие развитие предопухолевых узелков и опухолей [41–43]. У нокаутных по *Cyp2e1* мышей этого не происходит, что означает, что не замедленное по сравнению с контролем развитие опухолей печени, а сам факт их инициации у мышат с выключенным метаболизмом ДЭНА следует принимать во внимание при интерпретации результатов опытов Канга с соавторами [4] – результатов, находящихся не в противоречии, а в согласии с нашими данными.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. N. Magee and J. M. Barnes, *Adv. Cancer Res.* **10**, 164 (1967).
2. R. Preussmann and B. W. Stewart, in: *Chemical carcinogens. ACS Monograph 182*, ed. by C. T. Searle (Washington, 1984), pp. 643–828.
3. В. С. Турусов, Г. А. Белицкий, Л. Н. Пылев и В. А. Кобляков, в кн. *Канцерогенез*, под ред. Д. Г. Заридзе (Медицина, М., 2004), сс. 204–225.
4. J. S. Kang, H. Wanibuchi, K. Morimura, et al., *Cancer Res.* **67**, 11141 (2007).
5. R. Daoust and R. Morais. *Chem.-Biol. Interact.* **57**, 55 (1986).
6. J-S. H. Yoo, H. Ishizaki, and C. S. Yang, *Carcinogenesis* **11**, 2239 (1990).
7. F. P. Guengerich, D. H. Kim, and M. Iwasaki. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 168 (1991).
8. R. A. McKinnon and D. W. Nebert. *Clin. Expt. Pharmacol. Physiol.* **25**, 783 (1998).
9. F. J. Gonzalez, *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1 (2007).
10. A. Takada, J. Nei, S. Takase, and Y. Matsuda, *Hepatology* **6**, 65 (1986).
11. M. Schwars, A. Buchmann, G. Wiesbeck, and W. Kunz, *Cancer Lett.* **20**, 305 (1983).
12. D. Schmahl, C. Thomas, W. Sattler, and G. F. Scheld, *Z. Krebsforsch.* **66**, 526, (1965).
13. M. Habs and D. Schmahl, *Hepato-Gastroenterol.* **28**, 242 (1981).

14. E. A. Porta, N. Markell, and R. D. Dorado, *Hepatology* **6**, 1120 (1985).
15. F. Stickler, D. Schuppan, E. G. Hahn, and H. K. Seitz, *Gut* **51**, 132 (2002).
16. R. Peng, Y.-Y. Tu, and C. Yang, *Carcinogenesis* **3**, 1457 (1982).
17. B. J. Song, R. L. Veech, S. S. Park, et al., *J. Biol. Chem.* **264**, 3568 (1989).
18. N. Kurata, H. E. Hurst, F. W. Benz, et al., *Drug Metabol. Dispos.* **9**, 388 (1991).
19. B. J. Roberts, S. E. Shoaf, and B. J. Song, *Biochem. Pharmacol.* **49**, 665 (1995).
20. Y. Hu, M. Ingelman-Sundberg, and K. O. Lindros, *Biochem. Pharmacol.* **50**, 155 (1995).
21. T. K. Chang, C. L. Crespi, and D. J. Waxman, *Methods Mol. Biol.* **320**, 127 (2006).
22. I. Y. Chau, D. Dagani, M. C. Archer, *J. Nat. Cancer Inst.* **61**, 517 (1978).
23. Y. J. Lee, A. R. Aroor, and S. D. Shukla, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 908 (2002).
24. G. M. Williams, M. Klaibe, S. E. Parker, and E. Farber, *J. Nat. Cancer Inst.* **56**, 196 (1976).
25. В. И. Каледин, С. И. Ильницкая, Н. И. Багинская и др., *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **91**, 1481 (2005).
26. P. Quillardet and M. Hofnung, *Mutation Res.* **147**, 65 (1985).
27. Л. П. Овчинникова, Л. А. Богданова и В. И. Каледин, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **154**, 623 (2012).
28. W. Lijinsky, *Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds* (Cambridge Univ. Press, 1992).
29. В. И. Каледин, Е. А. Васюнина, Л. П. Овчинникова и др., *Вестн. ВОГИС*, **21–22**, 11 (2002).
30. Т. И. Merkulova, К. У. Kropachev, О. А. Timofeeva, et al., *Mol. Carcinog.* **44**, 223 (2005).
31. О. А. Timofeeva, А. В. Ereemeev, А. Goloschapov, et al., *Toxicology* **254**, 91 (2008).
32. В. И. Каледин, С. И. Ильницкая, Л. П. Овчинникова и др., *Биофизика* **59**, 527 (2014).
33. В. И. Каледин, С. И. Ильницкая, Н. А. Попова и др., *Биофизика* **59**, (776) (2014).
34. V. I. Kaledin, N. A. Popova, V. P. Nikolin, et al., *Free Radic. Res.* **43**, 685 (2009).
35. T. Suzuki, M. Imagava, R. Yamada, et al., *Carcinogenesis* **15**, 1759 (1994).
36. V. I. Kaledin, M. Y. Pakharukova, E. N. Pivovarova, et al., *Biophysics* **55**, 275 (2010).
37. J. S. Kang, *J. Biomed. Res.* **13**, 339 (2012).
38. H. Yamasaki, Y. Inui, C. H. Yun, et al., *Carcinogenesis* **13**, 1789 (1992).
39. A. M. Camus, O. Geneste, P. Honkakoski, et al., *Mol. Carcinog.* **7**, 268 (1993).
40. J. Y. Cui, H. J. Renand, and K. D. Klaassen, *Drug Metab. Dispos.* **40**, 1226 (2012).
41. E. Albano, A. Tomaai, J.-O. Persson, et al., *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1895 (1991).
42. N. Nieto, S. L. Friedman, P. Greenwel, and A. J. Cederbaum, *Hepatology* **30**, 987 (1999).
43. H. Liu, B. F. Jones, C. Bradham, and M. J. Cizaia, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **282**, 257 (2002).

## Effect of Hepatic P450 2e1 Activity Modulation on the Toxicity and Carcinogenicity of Diethylnitrosamine in Mice

**V.I. Kaledin\***, **S.I. Ilitskaya\***, **E.A. Vasyunina\***, **N.A. Popova\*\***, **L.A. Bogdanova\*\*\***,  
**M.L. Perepechaeva\*\*\*\***, and **A.Y. Grishanova\*\*\*\***

*\*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,  
prosp. Akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

*\*\*Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

*\*\*\*Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology, Siberian Branch, Russian Academy  
of Medical Sciences, ul. Akademika Timakova 2, Novosibirsk 630117 Russia*

*\*\*\*\*Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences,  
ul. Akademika Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia*

In this paper, the biological effects of diethylnitrosamine have been studied under controlled conditions of its metabolism in mice of different ages. The data presented indicate that diethylnitrosamine in a non-metabolized form exerts general toxic and hepatocarcinogenic effects while alkylating agents of this compound produce toxic liver injury. To our knowledge, the data presented impel to revise the general notion of an exceptional role of mutagenic activation in the carcinogenic effect of chemicals.

*Key words: suckling mice, diethylnitrosamine, metabolism, carcinogenicity, toxicity*