

О.Р. Мельников, В.Я. Момот, Т.В. П'ятчаніна , Є.П. Сидорик

## Співвідношення низькоспінового та високоспінового цитохрому Р-450 у мікросомах гепатом, індукованих N-нітрозодіетиламіном

*Определено содержание высоко- и низкоспинового окисленного цитохрома Р-450 (СУР) в микросомах печени и гепатом, индуцированных N-нитрозодиэтиламином методом оптической спектрофотометрии. Показано, что в гепатомах величина отношений спиновых форм больше, чем в печени и возрастает в результате действия индукторов, вызывающих синтез изоформ СУР в высокоспиновой конфигурации. Результаты исследования изоформного состава и метаболического фенотипа гепатомы позволили сделать вывод, что сдвиг равновесия спиновых состояний в гепатомах вызван снижением количества изоформ ПСII и ПЕI, а также высоким уровнем экспрессии изоформы IAI.*

### ВСТУП

Канцерогенна дія гепатотропних нітрозосполук навколишнього середовища проявляється внаслідок утворення їх активних канцерогенних метаболітів у монооксигеназній системі, основною ланкою якої виступає суперродина ізоформ високо- та низькоспінового цитохрому Р-450 (СУР). Монооксигеназний цикл запускається зв'язуванням субстрату з фериформою СУР, яка існує в функціонально рівноважній суміші високоспінового ( $S=5/2$ ) і низькоспінового ( $S=1/2$ ) станів. Подальше відновлення високоспінової фериформи СУР здійснюється значно швидше, ніж відновлення загального фонду ферменту [7]. Взаємодія СУР з деякими субстратами, іншими білками мембран (цитохром  $b_5$ , НАДФН – СУР редуктаза), індукція індивідуальних високоспінових ізоформ зсувають спінову рівновагу в бік високоспінової конфігурації, внаслідок чого монооксигеназна система стає спроможною до більш інтенсивного функціонування. Отже, зсув рівноваги спинових станів окисненого

СУР можна розглядати як контрольний механізм функції ферменту. В стаціонарній фазі монооксигеназного циклу в печінці більша частина загального СУР знаходиться в окисненій низькоспіновій конфігурації [5]. Виявлене раніше [4] зниження вмісту загального СУР у гепатомі, а також кількісний і якісний перерозподіл його ізоформного складу, ймовірно, може бути причиною зміни рівноваги спинових станів фериформи СУР у гепатомі.

Мета нашої роботи – з'ясування характеру рівноваги високо- і низькоспінових форм окисненого СУР і його взаємозв'язок з фенотипічним складом ізоформ СУР гепатом, індукованих N-нітрозодіетиламіном (НДЕА).

### МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 140 білих безпородних щурах-самцях, з яких 60 тварин були інтактними, 80 – з індукованими гепатомами. Канцерогенез печінки індукували 0,01%-м розчином НДЕА в питній воді упродовж 8 тиж. Досліджували мікросоми

© О.Р. Мельников, В.Я. Момот, Т.В. П'ятчаніна , Є.П. Сидорик

з гепатоми та печінки, які виділяли за методом диференційного центрифугування [2]. Вміст загального цитохрому Р-450 визначали за методом Omiga та співавт. [10]. Кількість його низькоспінової та високоспінової форми реєстрували за методом Jefcoate та співавт. [7]. Мікросомальні білки розділяли методом градієнтного електрофорезу (5–15%) [8]. Ідентифікацію ізоформ проводили з урахуванням їх індукції фенобарбіталом (ФБ), 3-метилхолантреном (МХ) і етанолом [11], а також у субстратних реакціях з бензфетаміном, аніліном [1], тестостероном [9], бенз(а)піреном [12]. Вміст білка визначали за методом Dorsey та співавт. [6]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження рівноваги високо- і низькоспінових форм окисненого СУР у мікросомах із гепатом і печінки інтактних тварин, а також в умовах його модуляції ФБ, МХ і етанолом представлено в табл. 1. У гепатомах рівновага спінових форм зсунута в бік високоспінової форми на фоні зменшення вмісту загального СУР у пухлині в 1,7 раза. Зниження фонду СУР

у гепатомах може бути результатом рівномірного зменшення вмісту кожної ізоформи під дією гем-оксигенази, або наслідком незалежної зміни експресії індивідуальних ізоформ. Оскільки вміст окремих ізоформ СУР у гепатомах змінюється по-різному відносно їх вмісту в печінці (табл. 2), то гем-оксигеназа може виступати неспецифічним регулятором вмісту СУР [3], а зареєстровані кількісні й якісні зміни ізоформного складу СУР у гепатомах визначають розходження метаболічного фенотипу пухлини та печінки.

Фенотипічний склад ізоформ СУР у мікросомах гепатом представлений ізоформами СУР ІА1/2, СУР ІВ1/2, СУР ІС6/7/11, СУР ІЕ1, СУР ІІА1/2. Ізоформи СУР 2А1/2 і СУР ІС 13 виявляються в слідових кількостях. Зменшення вмісту ІС7/11 (51 кДа) удвічі відносно контролю (див. табл. 2) призводить до зменшення окиснення тестостерону за 16 $\alpha$ -позицією в 3,3 раза. В гепатомах тварин, яким вводили ФБ, кількість утвореного 16 $\alpha$ -окситестостерону зменшилася в 3,6 раза при збільшенні загального СУР удвічі в порівнянні з тваринами без індукції (табл.1). У зв'язку з тим, що ФБ не індукує ізоформи СУР ІС7 і СУР ІС11 [3], можна зробити висновок,

**Таблиця 1. Відношення спінових форм окисненого цитохрому Р-450 в гепатомах, індукованих N-нітрозодіетиламіном і в печінці інтактних тварин (M $\pm$ m).**

Умова досліджу	Вміст цитохрому Р-450, нмоль/мг	Високоспіновий (а), нмоль/мг, %		Низькоспіновий (в), нмоль/мг, %		Відношення а/в
Гепатома						
Без індукції	0,58+0,06	0,157 + 0,03	27	0,423 + 0,05	73	0,37
Введення						
фенобарбіталу	1,17+ 0,05*	0,316 +0,05*	27	0,854 + 0,05*	73	0,37
3-метил-холантрону	0,95+ 0,04*	0,431 + 0,06*	45	0,519 + 0,06*	55	0,83
етанолу	0,76+ 0,05*	0,236 + 0,06*	31	0,524 + 0,07*	69	0,45
Печінка інтактних тварин						
Без індукції	0,85 + 0,04	0,179+ 0,05	21	0,671+ 0,07	79	0,27
Введення						
фенобарбіталу	2,01 +0,06*	0,382+ 0,05*	19	1,628 +0,08*	81	0,23
3-метил-холантрону	1,56 +0,05*	0,749 +0,06*	48	0,811+ 0,07*	52	0,92
етанолу	1,45+ 0,03*	0,420 +0,04*	29	1,030+ 0,07*	71	0,41

\* P < 0,05 порівняно з контролем

що вони конститутивно експресовані в гепатомах і зменшення їх вмісту не впливає на рівновагу спінових станів окисненого СҮР. Сумарний вміст ізоформ СҮР ІА2, СҮР ІВ1/2, СҮР ІІА1/2 (52 кДа) у мікросомах гепатом майже в 2 рази більше, ніж у контролі, що зумовлює інший характер метаболізму відповідних субстратів: зменшується активність 6 $\beta$ -гідроксилази тестостерону в 1,5 рази, підвищується активність N-деметилази бензфетаміну і пара-гідроксилази аніліну в 1,4 рази, бенз(а)пірен-гідроксилази в 2,2 рази. Така направленість змін активності розглядається як наслідок зменшення кількості ізоформ підродини СҮР ІІА і збільшення експресії ізоформ підродини СҮР ІВ. У мікросомах гепатом тварин, яким вводили ФБ, збільшувалася швидкість N-деметилювання бензфетаміну і 6 $\beta$ -гідроксилювання тестостерону внаслідок зміни експресії ізоформ підродини СҮР ІВ і СҮР

ІІА. Враховуючи те, що ФБ стимулює експресію ізоформ у високо- і низькоспінових станах практично в рівних кількостях, можна вважати, що в гепатомах ізоформи підродини СҮР ІІА і СҮР ІВ не впливають на рівновагу спінових станів окисненого СҮР. У мікросомах гепатом МХ-індукованих тварин активність бенз(а)пірен-гідроксилази опосередкована ізоформами ІА1 і ІА2, зростає в 9,5 рази при збільшенні кількості гемопротейду з молекулярною масою 52 кДа в 1,1 рази і кількості ізоформи ІА1 (56 кДа) в 4,7 рази в порівнянні з тваринами без індукції. Дія 3-МХ стимулює експресію ізоформи в високоспіновому стані, що зсуває спінову рівновагу в бік високоспінової конфігурації окисненого СҮР. Тому в мікросомах гепатом активність бенз(а)пірен-гідроксилази в основному опосередкована ізоформою ІА1 (56 кДа), вміст якої в гепатомах вищий у 3 рази, ніж у печінці. Отже, ізоформа ІА1, яка

**Таблиця 2. Вміст (% від загального) ізоформ цитохрому Р-450 в гепатомах, індукованих N-нітрозодіетиламіном і в печінці інтактних тварин.**

Ізоформи	Молекулярна маса, кДа	Без індукції	Фенобарбітал	3-Метилхолантрен	Етанол
Гепатома					
ІА1/ІА2	48		2	3	2
ІС13	50				3
ІС7/ІС11	51	24	17	12	23
ІВ1/ІВ2					
ІІА1/ІІА2	52	36	63	38	31
ІА2					
ІЕ1	53	34	16	19	37
ІС6					
ІА1	56	6	2	28	4
Печінка інтактних тварин					
ІА1/ІА2	48	4	3	4	3
ІС13	50	9	4	3	10
ІС7/ІС11	51	48	19	23	26
ІВ1/ІВ2					
ІІА1/ІІА2	52	17	48	23	28
ІА2					
ІЕ1	53	20	24	9	31
ІС6					
ІА1	56	2	2	38	2

експресується у високоспіновому стані [11], суттєво впливає на зсув рівноваги спінових форм окисненого СҮР.

Вміст СҮР ІЕ1 і СҮР ІС6 (53 кДа) в гепатомах індукованих етанолом тварин вищий у 1,1 раза, ніж у тварин без індукції і в 1,2 раза в порівнянні з контролем, при близьких значеннях активності НДЕА-діетилази і парагідроксилази аніліну, опосередкованих ізоформою СҮР ІЕ1. Згідно з даними літератури [9], підвищення цієї активності в гепатомі не є результатом зміни вмісту мРНК ізоформи ІЕ1 і може бути зумовлене рівнем трансляції, або зменшенням швидкості деградації білка в результаті специфічної стабілізації ізоформи ІЕ1 субстратом. Тому зсув рівноваги спінових станів окисненого СҮР у гепатомах і контрольній печінці тварин, яким вводили етанол (див. табл.1), в напрямку високоспінової конфігурації вказує на те, що ізоформа СҮР ІЕ1 наявна в гепатомах і нормальних клітинах в основному в формі високоспінового окисненого СҮР.

## ВИСНОВКИ

У гепатомах, індукованих НДЕА, величина відношення вмісту окисненого СҮР у високоспіновому стані до низькоспінового більше, ніж у печінці інтактних тварин, що вказує на зсув спінової рівноваги в напрямку високоспінової конфігурації. Зсув рівноваги спінових станів окисненого СҮР у гепатомах зумовлений зменшенням кількості ізоформ ІС11 і ІЕ1, а також високим рівнем експресії ізоформ підродина ІА1 і ІВ. Такий метаболічний фенотип гепатом, можливо, забезпечує їх резистентність відносно різних цитотоксичних чинників.

**O.R. Melnikov, V.Ya.Momot,  
T.V. Pyatchanina, E.P.Sidorik**

### **RATIO OF LOW- AND HIGH SPIN CYTOCHROME P-450 IN MICROSOMES OF NDEA-INDUCED HEPATOMAS**

Content of high- and low-spin oxidized CYP was determined

in liver microsomes and NDEA-induced hepatomas by method of optic spectrophotometry. Value of spin states ratio in hepatoma was shown to be greater than in liver. It increased under the action of inductors, which caused the synthesis of isoforms in high-spin configuration. Data obtained as a result of investigation of CYP isoform composition and metabolite phenotype of hepatoma have suggested that shift in balance of spin states in hepatoma was due to the decrease in the quantities of IC11 and IE1 isoforms as well as to the high level of IA1 isoform expression.

*R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Герасимов К.Е., Гуляева Л.Ф., Мишин В.М., Цырлов И.Б. Множественные формы цитохрома P-450. Характеристика изолированной амидопирин-N-деметилазы // Биохимия. – 1988. – **53**, №1. – С. 3–10.
2. Де Пьер Ж., Дальнер Г. Выделение, субфракционирование и характеристика эндоплазматической сети. – В кн.: Биохимическое исследование мембран. – М.: Наука, 1979. – С. 76–123.
3. Кобляков В.А. Цитохром P-450 в опухолях и в процессе канцерогенеза // Биохимия. – 1995. – **60**, №11. – С. 1043–1058.
4. Мельников О.Р., Момот В.Я., Пятчанина Т.В., Сидорик Е.П. Изменение соотношения ферро- и феррицитохрома P-450 в печени животных как условие трансформации гепатоцитов под действием N-нитрозодиаэтиламина // Эксперим. онкология. – 2000. – **22**, №3. – С. 141–143.
5. Davydov R., Makris T.M., Kofman V. Hydroxylation of camphor by reduced oxy-cytochrome P450cam: mechanistic implications of EPR and ENDOR studies of catalytic intermediates in native and mutant enzymes // J. Amer. Chem. Soc. – 2001. – **123**, №7. – P. 1403–1415.
6. Dorsey T., McDonald P.W., Roels O.A. A heated biuret - Folin protein assay which gives equal absorbance with different proteins // Anal. Biochem. – 1977. – **78**. – P. 156–164.
7. Jefcoate C.R.E., Calabrese R.L., Gatlor J.I. The use of n-oktylamine and ethyl isocyanide difference spectroscopy in the quantitative determination of high- and low- spin P-450 // Mol. Pharmacol. – 1970. – №6. – P. 391–401.
8. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**. – P. 680–685.
9. Lange R., Ducloux N., Perin F. Particular cytochrome P-450-dependent steroid metabolism: A new class of mouse liver tumor markers // Carcinogenesis. – 1989. – **10**, №5. – P. 1871–1877.
10. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pig-

- ment of liver microsomes // J.Biol. Chem. – 1964. – **239**, №7. – P. 2370–2378.
11. Sakai H., Park S.S., Kikkawa Y. Differential oxidase activity of hepatic and pulmonary microsomal cytochrome P-450 isozymes after treatment with cytochrome P-450 inducers // Biochim. and Biophys. Res. Commun. – 1992. – **187**, № 3. – P. 1262–1269.
12. Wiebel F.J., Park S.S., Kiefer F., Gelboin H.V. Analysis by monoclonal antibodies specific for cytochrome P-450 from rat liver induced by 3-methylcholanthrene or phenobarbital // Eur. J. Biochem. – 1984. – **145**. – P. 455–462.

*Ін-т експерим. патології, онкології і радіобіології  
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ*