

Борис СЕРГЕЕВ, Валерий КОБЛЯКОВ,
Юрий ТОЛЧЕЕВ

УЧАСТИЕ ИЗОФОРМ ЦИТОХРОМА Р-450 В МЕТАБОЛИЗМЕ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Достижения в области исследования канцерогенной активности (КА) полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) показали, что многие ПАУ проявляют КА только в процессе метаболизма. Так, в частности при микросомальном окислении бенз(а)пирена (БП), образуется 7,8-дигидродиол 9,10-эпоксид БП, ответственный за канцерогенный эффект БП (Sims и др., 1974). Окисление БП катализируется микросомальным гемопротеином — цитохромом Р-450 (рис. 1) (Grover,

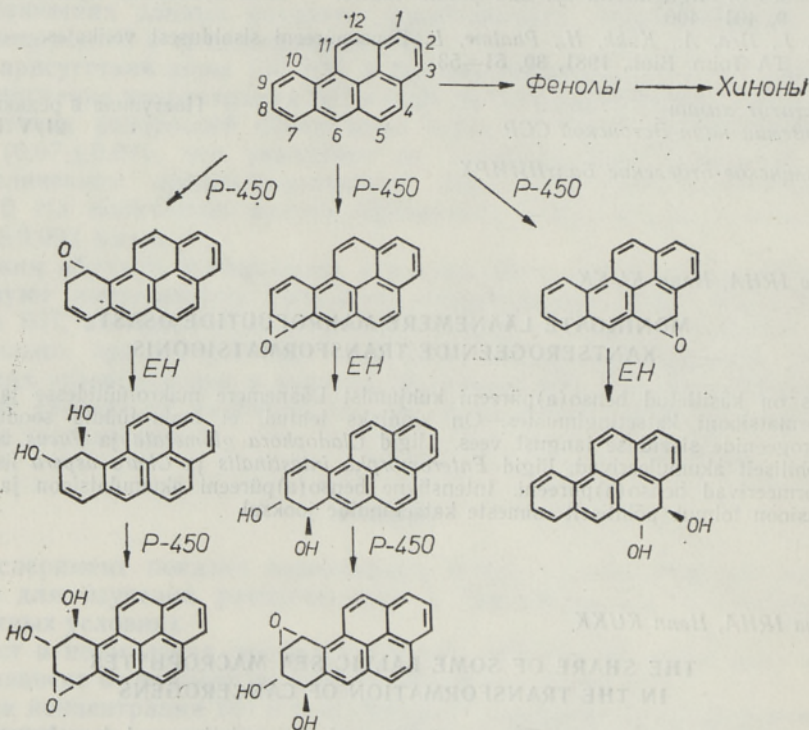


Рис. 1. Метаболизм бенз(а)пирена в эпоксиды, дигидродиолы и диол-эпоксиды; EH — эпоксидгидратаза.

1980). В настоящее время есть все основания считать, что это общее наименование группы ферментов, имеющих одинаковые простетические группы, но обладающих не только различной субстратной, но и региональной селективностью (Nilsen и др., 1981). Можно предположить, что в окислении БП участвуют сразу несколько форм цитохрома

P-450, одна из которых и катализирует образование конечного канцерогена. В данной статье рассмотрена эта возможность на примере конкурентного ингибирования окисления дигидродиолов БП.

Методы исследования

Выделение микросом, инкубационная среда и определение продуктов окисления БП, меченого по ^{14}C (^{14}C -БП), — 4,5-дигидродиола (4,5-ДДО), 7,8-дигидродиола (7,8-ДДО) и 9,10-дигидродиола (9,10-ДДО) — описаны ранее (Сергеев и др., 1982). Ингибировали окисление ^{14}C -БП немечеными 4,5-ДДО или 7,8-ДДО, водные растворы которых по 0,1 мл (концентрацией $2 \cdot 10^{-4}$ М) вводили в инкубационную среду до начала реакции. Реакции начинали добавлением НАДФН. 4,5-ДДО был синтезирован О. Паншиным по методике, описанной ранее (Raha, 1972); 7,8-ДДО БП был получен из США (Midwest Research Institute); 7,10- ^{14}C ВР (^{14}C -БП) — из Англии (RCL Amersham), 60 мКи/мМ.

Определение мутагенной активности немеченых дигидродиолов БП проводили на штаммах *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 методом Эймса. Для метаболической активации тестируемых веществ использовали постмитохондриальный супернатант гомогената печени (фракция S_9).

Результаты и их обсуждение

Участие изоформ цитохрома P-450 в образовании конечного канцерогена можно оценить по результатам конкурентного ингибирования окисления дигидродиолов БП. Наиболее подходящими ингибиторами в этом случае являются сами дигидродиолы БП. В таблице приведены результаты влияния немеченых дигидродиолов БП на накопление в ферментной системе дигидродиолов, образующихся при окислении меченого БП. Ингибирование метаболизма ^{14}C -БП эквимоллярными концентрациями немеченого 4,5-ДДО БП увеличивает выход соответствующего меченого дигидродиола почти в три раза по сравнению с выходом 4,5-ДДО ^{14}C -БП в контрольном опыте. Выход остальных меченых дигидродиолов существенно не отличается от контрольного (табл., 1—2).

При введении в инкубационную среду вместе с ^{14}C -БП в эквимоллярной концентрации немеченого 7,8-ДДО БП наблюдалось почти двукратное увеличение выхода соответствующего меченого дигидродиола по сравнению с контрольным (табл., 3—4).

Проверка на мутагенную активность немеченых дигидродиолов БП показала, что по сравнению с контрольным числом (109) количество гистидинположительных (his⁺) ривертантных колоний при тестирова-

Выход дигидродиолов ^{14}C -БП, образующихся при микросомальном окислении ^{14}C -БП, в контрольном опыте и после прибавления в инкубационную среду 4,5- или 7,8-ДДО БП (результаты представлены со среднеквадратичной ошибкой)

Номер опыта	Ингибитор	Дигидродиолы ^{14}C -БП		
		4,5-	7,8-	9,10-
нМ/мг белка · мин				
1	Отсутствие ингибитора	8,03±1,31	7,43±2,01	8,66±2,27
2	4,5-дигидродиол БП	25,03±1,31	7,00±1,75	10,85±3,23
3	Отсутствие ингибитора	14,00±1,31	12,25±2,01	13,48±2,80
4	7,8-дигидродиол БП	11,90±1,75	26,25±1,75	10,32±2,19

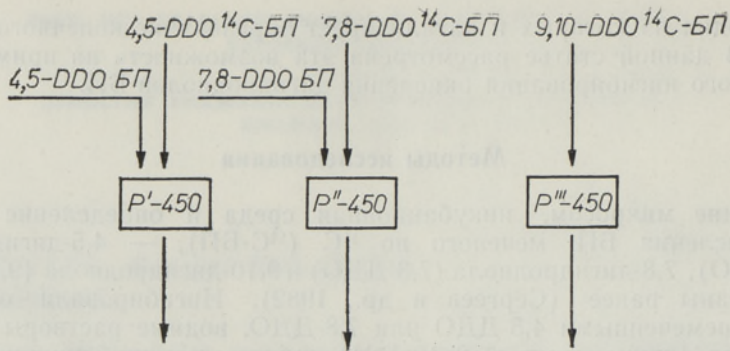


Рис. 2. Участие изоформ в окислении дигидродиолов БП.

нии 7,8-ДДО БП возросло на порядок (2234). При испытании же на мутагенность 4,5-ДДО БП число ривертантов (115) практически не отличалось от контрольного. Конкурентное ингибирование окисления одного дигидродиола (7,8-ДДО) другим (4,5-ДДО) не снизило числа ривертантов (2059).

Ввиду того, что немеченые 4,5- и 7,8-ДДО БП являются конкурентными субстратами по отношению к дигидродиолам ^{14}C -БП, по результатам проведенного исследования можно судить об участии изоформ цитохрома P-450 в окислении дигидродиолов БП исходя из следующих рассуждений. Так, если в окислении всех дигидродиолов БП участвует только одна форма цитохрома P-450, то немеченые дигидродиолы БП должны конкурентно ингибировать окисление сразу всех меченых дигидродиолов БП, что, естественно, должно привести к их накоплению в ферментной системе. Однако результаты эксперимента свидетельствуют о накоплении в ферментной системе только одного из дигидродиолов (4,5-ДДО или 7,8-ДДО) в присутствии конкурентного субстрата. Это возможно лишь в случае участия на стадии окисления дигидродиолов сразу трех изоформ цитохрома P-450 (рис. 2), различающихся региональной селективностью.

Эти выводы подтверждаются результатами тестирования на мутагенную активность предшественника конечного канцерогена — 7,8-ДДО БП и объясняют неизменность числа ривертантов при тестировании на мутагенную активность одновременно двух дигидродиолов БП (мутагенного и немутагенного).

ЛИТЕРАТУРА

- Сергеев Б., Губергриц М., Кобляков В. Окисление бенз(а)пирена гидроперекисью кумила в ферментных системах с участием цитохромов P-450 и P-448. — Изв. АН ЭССР. Хим., 1982, 31, 253—257.
- Grover, P. L. The metabolic activation of the polycyclic aromatic hydrocarbons. — VDI-Berichte, 1980, 358, 257—271.
- Nilsen, G., Toftgard, R., Eng, L., Gustafsson, J. A. Regio-selectivity of purified forms of rabbit liver microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of benzo(a)pyrene, *n*-hexane and ethoxyresorufin. — Acta pharmacol. et toxicol., 1981, 43, 369—376.
- Sims, P., Grover, P. L., Swaisland, A., Pal, K., Hewer, A. Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. — Nature, 1974, 252, 326—328.
- Raha, C. R. Metabolism of benzo(a)pyrene at the 4,5-position. — Ind. Biochem. Biophys., 1972, 9, 105—110.

Институт экспериментальной
и клинической медицины Эстонской ССР

Всесоюзный онкологический
научный центр АМН СССР

Поступила в редакцию
3/IX 1982

Boriss SERGĖJEV, Valeri KŌBLJAKOV,
Juri TOLTSEJEV

TSÜTOKROOMI P-450 ISOVORMIDE OSA POLÜTSÜKLILISTE SÜSIVESINIKE METABOLISMIS

Artiklis on käsitletud inhibiitorite toimet ^{14}C -ga märgistatud benzo(a)püreeni (BP) mikrosomaalsele oksüdatsioonile. Katsetes kasutati inhibiitorina märgistamata 4,5- ja 7,8-dihüdriooli (DHD). Inhibeerimine kutsus esile vastava DHD hulga tunduva suurenemise. 4,5- ja 7,8-DHD testimisel *Salmonella typhimurium* TA 98 ja TA 100 tüvedel Ames'i meetodil selgus, et mutageenset aktiivsust omab ainult 7,8-DHD ja see ei vähene 4,5-DHD samaaegsel oksüdeerimisel.

Eeltoodust on järeldatud, et roti maksast eraldatud mikrosoomides leiduvad tsütokroomi P-450 isovormid, millel on regionaalne selektiivsus BP dihidrioolide suhtes.

Boris SERGEYEV, Valeri KOBLYAKOV,
Yuri TOLCHEYEV

THE SHARE OF THE ISOFORMS OF CYTOCHROME P-450 IN THE METABOLISM OF POLYCYCLIC AROMATIC COMPOUNDS

Inhibition of microsomal oxidation of [^{14}C] benzo(a)pyrene (BP) by unlabelled BP metabolites — 4,5-dihydrodiol (4,5-DHD) or 7,8-dihydrodiol (7,8-DHD) considerably increases the amounts of corresponding dihydrodiols. 4,5-DHD and 7,8-DHD have been tested in the *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 by the method of Ames. Only 7,8-DHD showed mutagenic activity, which did not decrease when both 7,8-DHD and 4,5-DHD were tested together.

The presence of cytochrome P-450 isoforms in rat liver cell microsomes, which are regionally selective to BP dihydrodiols, is supposed.