

Российская академия наук. Сибирское отделение  
Российская академия медицинских наук. Сибирское отделение  
Государственная публичная научно-техническая библиотека  
Институт молекулярной патологии и экологической биохимии

**Серия "Экология"**

Издается с 1989 г.

**Выпуск 32**

**Л.Ф. Гуляева, А.Ю. Гришанова, О.А. Громова,  
Н.Н. Слынько, В.А. Вавилин, В.В. Ляхович**

**МИКРОСОМНАЯ МОНООКСИГЕНАЗНАЯ  
СИСТЕМА ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ  
В БИОМОНИТОРИНГЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Аналитический обзор

Новосибирск, 1994

ББК Е081.4

**Микросомная** монооксигеназная система живых организмов в биомониторинге окружающей среды = *Microsomal Monooxygenase System of Living Beings in Environment Bio-monitoring*: Аналит. обзор / Л.Ф. Гуляева, А.Ю. Гришанова, О.А. Громова, Н.Н. Слынько, В.А. Вавилин, В.В. Ляхович; Ин-т молекуляр. патологии и экол. биохимии СО РАМН; ГПНТБ СО РАН; Отв. ред. д-р хим. наук О.И. Лаврик. - Новосибирск, 1994. - 100 с. - (Сер. Экология. Вып. 32).

В обзоре впервые представлены данные (1988 - 1993 гг.) о биомониторинге окружающей среды (ОС) с использованием методов, оценивающих микросомную монооксигеназную систему (МОС) животных и человека. Описаны методы оценки воздействия неблагоприятной ОС на животных: измерение ферментативных активностей цитохрома Р450 у грызунов, выявление аддуктов токсичных химических соединений с биомакромолекулами. Особое место в обзоре отводится изучению воздействия ОС на человека. Приведены данные об использовании тестовых лекарств, современных методов генной инженерии в оценке состояния МОС. Комплексный подход в изучении воздействия ОС на живые организмы позволит оценить негативные последствия, наносимые загрязнением, в том числе раковые заболевания.

Обсуждаемый материал может быть полезным для специалистов, работающих в области токсикологии.

Ответственный редактор д.х.н., проф., чл.-кор. РАЕН О.И. Лаврик

Рецензент д-р хим. наук, проф. Г.А. Невинский

Обзор подготовлен к печати: к.п.н. О.Л. Лаврик,  
Н.И. Коноваловой,  
Т.А. Калюжной

ISBN 5-7623-0867-7

© Государственная публичная научно-техническая библиотека  
Сибирского отделения Российской академии наук  
(ГПНТБ СО РАН), 1994

## ВВЕДЕНИЕ

Химическое загрязнение окружающей среды является одной из самых опасных форм антропогенного воздействия на биосферу. Прогресс современной химической науки способствует расширению производства химических веществ, их модификаций и внедрению во все сферы деятельности человека - в различные отрасли промышленности, сельского хозяйства, бытовой химии.

По данным ВОЗ, в списках коммерчески распространяемых препаратов к началу 80-х годов насчитывалось около 70 тыс. химических веществ, ежегодно это число увеличивается более, чем на 1 тыс. По некоторым прогнозам, производство химических препаратов к 2000 г. возрастет в 2 - 3 раза, что, естественно, еще больше осложнит экологическую обстановку.

Сравнительно полные экологические и токсикологические испытания проведены лишь для нескольких тысяч веществ. Многие из них обладают биологической активностью, проявляют мутагенные, канцерогенные, тератогенные свойства, нарушают те или иные структурно-функциональные системы клетки. По некоторым оценкам, доля химических факторов среди причин возникновения онкологических заболеваний достигает 80%. Об этом свидетельствует также состояние здоровья населения экологически неблагополучных районов. Эпидемиологические исследования выявили более частую встречаемость некоторых видов патологии в зонах с повышенной концентрацией химических загрязнителей окружающей среды.

В большинстве своем токсичные и канцерогенные химические вещества не оказывают вредного биологического действия сами по себе, кроме случаев острых отравлений. Обычно для проявления их негативного эффекта необходима метаболическая активация до реакционноспособных электрофильных продуктов, которые реагируют необратимо с нуклеофильными биологическими макромолекулами - нуклеиновыми кислотами, белками. Такая биоактивация катализируется почти всеми ферментами биотрансформации чужеродных химических веществ (ксенобиотиков).

Необходимость системных знаний по изложенным выше аспектам исследований очевидна, между тем большинство литературных сведений посвящено преимущественно описанию токсических эффектов. Биохимическая основа этих процессов часто остается за рамками исследований. В то же время, именно биохимические и биологические показатели являются наиболее адекватными маркерами потенциально опасного воздействия загрязнений окружающей среды на живые организмы. Они позволяют определить уровень проникновения ксенобиотиков в организм, их активные дозы и создают возможность предвидеть риск развития соответствующей патологии. В этой связи, значительное внимание уделяется поиску биохимических показателей для биоиндикации и биомониторинга воздействий потенциально опасных химических соединений на организм человека и животных.

Интенсивное развитие экологической биохимии дает возможность использовать фундаментальные и прикладные знания этой науки о системах биотрансформации чужеродных соединений для решения возникающих экологических проблем и охраны здоровья человека.

Печень - основное место биоаккумуляции липофильных загрязнителей окружающей среды. В мембранах эндоплазматического ретикулума гепатоцитов функционирует семейство гемопротеинов, называемых цитохромами P450, которые катализируют окисление множества разнообразных чужеродных химических веществ, попадающих в организм с воздухом,

водой, пищевыми продуктами. Длительное воздействие на организм таких широко распространенных загрязнителей окружающей среды, как галогенсодержащие пестициды, полициклические ароматические углеводороды, полихлорированные бифенилы, 2,3,7,8-тетрахлордибензо-п-диоксин, приводит к значительному и избирательному увеличению количества и каталитической активности определенных цитохромов Р450 в некоторых органах и тканях, прежде всего в печени. Факт индукции специфичных для этих или других субстратов цитохромов Р450 может быть легко определен с помощью ферментативных, иммуноферментных и молекулярно-биологических методов исследования и использован как маркер экспозиции животных или человека загрязнителями окружающей среды.

Таким образом, комплексная фено- и генотипическая характеристика систем биотрансформации ксенобиотиков в популяциях животных и человека может оказаться перспективной, с одной стороны, для биоиндикации и биомониторинга химического загрязнения окружающей среды в определенном регионе, с другой - она абсолютно необходима для прогнозирования риска, разработки рациональной терапии и профилактики заболеваний, обусловленных химическими факторами окружающей среды.

В обзоре приняты следующие сокращения:

AFB1 - афлатоксин В1

ELISA - иммуносорбентный анализ

ppm - part per million - концентрация 0,00001%

RIA - радиоиммунный анализ

SFSS - синхронное флуоресцентное спектрофотометрическое сканирование

USERIA - ультрачувствительный радиоиммунный анализ

ААФ - 2-ацетиламинофлуорен

АБФ - 4-аминобифенил

БКТ - белые кровяные тельца

БПГ - бензо[а]пиренгидроксилаза

БПДЭ - бензо[а]пирендиолэпоксид

БРОД - бензилоксирезорифин-О-деалкилаза (деалкилазная)

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГСТ - глутатион S-трансфераза

ГХ/МС - тандем газовой хроматографии с масс-спектрометрией

ДБГ - дебризохингидроксилаза

ИИ - индекс индуцибельности

МРОД - метоксирезорифин-О-деалкилаза (деалкилазная)

МХ - 3-метилхолантрен

ПАУ - полициклические ароматические углеводороды

ПББ - полибромированные бифенилы

ПГБ - полигалогенированные бифенилы

ПГДД - полигалогенированные дибензодиоксины

ПГДФ - полигалогенированные дибензофураны

ПРОД - пентоксирезорифин-О-деалкилаза (деалкилазная)

ПХБ - полихлорированные бифенилы

ПХДД - полихлорированные дибензодиоксины

ПХДФ - полихлорированные дибензофураны

Р450 - цитохром Р450

ТСХ - тонкослойная хроматография

ТХДД - 2,3,7,8-тетрахлордибензо-п-диоксин

ФБ - фенобарбитал

ЭРОД - этоксирезорифин-О-деалкилаза (деалкилазная)

## Глава 1. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

Взаимодействуя с окружающей средой, люди и животные подвергаются продолжительному воздействию различных химических компонентов биологического или антропогенного происхождения, содержащихся в воде, воздухе, почве, пищевых продуктах. Большинство ксенобиотиков, которые попадают в организм, липофильны. Они легко адсорбируются элементами крови, проникают через мембраны, достигая активных мест внутриклеточных ферментов, легко реабсорбируются из экскреторных жидкостей и диффундируют в клеточные мембраны. Их дальнейшая судьба зависит от систем биотрансформации и элиминации.

В процессах биотрансформации чужеродных соединений принято выделять 1-ю и 2-ю фазы [1]. Ферменты 1-й фазы катализируют реакции окисления, восстановления или гидролиза молекул ксенобиотика. В результате этих реакций образуются более водорастворимые и часто более реакционноспособные продукты. В зависимости от скорости их образования, химической стабильности молекул и доступности для ферментов 2-й фазы, представляется два возможных пути превращения интермедиатов [2]. Во-первых, они могут подвергаться конъюгации с эндогенными лигандами, восстановлению или гидролизу в системе ферментов 2-й фазы и далее экскреции как безвредные полярные продукты. Во-вторых, может произойти ковалентное связывание реакционноспособных метаболитов с биологически активными макромолекулами - белками, включая сами ферменты биотрансформации, и нуклеиновыми кислотами. Второй путь, как показано во многих лабораториях, коррелирует с химическим канцеро- и мутагенезом, токсичностью и тератогенезом [3 - 7].

Итак, метаболизм ксенобиотиков ферментами 1-й и 2-й фаз не всегда сопровождается детоксикацией, но во многих случаях биологической активацией и возрастанием вредных эффектов исходных компонентов.

К ферментам 1-й фазы относят флавиносодержащую монооксигеназу и цитохромы P450, а также гидролитические ферменты - эстеразы и амидазы [1, 8]. Цитохромы P450 занимают особое место среди этих ферментов. Они являются ключевыми компонентами монооксигеназы и катализируют окисление сотен ксенобиотиков, а также важнейших для жизнедеятельности эндогенных соединений - стероидных гормонов, витаминов, жирных и желчных кислот, простагландинов и кетонов [9, 10]. Флавиносодержащая монооксигеназа конкурирует с цитохромом P450 за окисление аминов. Ряд неспецифических эстераз и амидаз гидролизуют эфирные и амидные связи в чужеродных компонентах [1].

2-я фаза биотрансформации включает ферменты конъюгации УДФ-глюкуронозилтрансферазы, катализирующие реакции конъюгации молекул ксенобиотиков или их метаболитов с глюкуроновой кислотой, глутатионтрансферазы (GST), которые конъюгируют, главным образом, гидрофобные электрофилы с глутатионом, N-ацетил-, сульфо-, метилтрансферазы и др. Кроме того, к ферментам 2-й фазы относят хинонредуктазы, которые катализируют восстановление хинонов, предотвращая их участие в окислительных циклах и истощении внутриклеточного глутатиона и эпоксидгидразы, которые гидролизуют эпоксиды и ареноксиды, превращая их в менее активные диолы [1].

Цитохром P450-зависимые монооксигеназы - мультиферментная электрон-транспортная система, состоящая из двух типов встроенных в мембраны эндоплазматического ретикула белков: одной или более изоформ гемопротейна P450, ответственных за каталитическую активность, и одной формы флавопротеина NADPH-P450 оксидоредуктазы, который переносит

сит электроны на цитохром P450. Одна молекула редуктазы может поставлять электроны на несколько различных молекул P450 [9, 10].

Метаболизм субстрата включает перенос двух электронов на гемовую группу цитохрома P450 в присутствии молекулярного кислорода, в результате чего один атом кислорода восстанавливается до воды, другой - может встраиваться в молекулу субстрата [11, 12].

Основные типы P450-зависимых реакций биотрансформации [13]:

### Основные типы P450-зависимых реакций биотрансформации [13]:

Тип реакции	Типичные субстраты
Ароматическое гидроксилирование	Бензо[а]пирен, кумарин.
Алифатическое гидроксилирование	Жирные кислоты, алканы, тестостерон
Эпоксидирование алкенов	Бензо[а]пирен-7,8-дигидродиол, афлатоксин В1
N-, S- и Hlg-окисление	Замещенные амины и галобензолы, феноксиэфиры
N-, O- и S-деалкилирование	Аминопирин, фенацетин, кодеин, бензфетамин, эритромицин
Дезаминирование и денитрозирование	Амфетамин, N-нитрозодиакиламины
Десульфирование и дегалогенирование	Паратион, дибромметан
Окислительное денасыщение и дезтерификация	Вальпроиновая кислота, Эфиры 3,5-пиридиндикарбоновой кислоты
Окислительное деформилирование	Разветвленные алифатические альдегиды
Окисление спиртов и альдегидов	Этанол, бутанол, ацетальдегид, каннабидиол
Дегидрогенирование	1,4-дигидропиридины
Восстановление аренов, аминоксидов	Бензо[а]пирен 4,5-оксид, диметилантлин N-оксид

Наибольшие количества цитохром P450-содержащих монооксигеназ содержатся в печени. Эти ферменты обнаруживаются также в легких, почках, кишечнике, мозге, стероидогенных органах и др. [9, 14].

Широкое распространение цитохром P450-содержащих монооксигеназ среди живых организмов, межорганные и межвидовые различия набора изоформ цитохрома P450, наряду с разнообразием катализируемого внедрения атома кислорода в чужеродные компоненты различной структуры, без сомнения, делает ее наиболее важной группой ферментов, осуществляющих биотрансформацию ксенобиотиков.

#### 1.1. Множественные формы цитохрома P450 – основные ферменты метаболизма чужеродных химических веществ

Цитохром P450 определяется во всех живущих организмах, включая бактерии. Предполагают, что в процессе эволюции этот фермент появился как механизм конверсии инертных углеводородов окружающей среды до продуктов, используемых с энергетической или пластической целью [15]. Альтернативной первоначальной функцией цитохрома P450 могло быть

удаление токсичных гидроперекисей у примитивных организмов, использующих кислород в клеточном дыхании. В результате длительного и рационального процесса дупликации, конверсии, мутаций генов образовалось большое число изоформ цитохрома P450, активных в метаболизме чужеродных компонентов, организмы приобрели способность инактивировать растительные яды, токсины и выживать в окружающей среде [8, 15, 16].

В настоящее время известно, что цитохромы P450 млекопитающих представляют собой структурно и функционально различные изоферменты. Они кодируются большим и сложным суперсемейством генов. В 1987 г. была разработана и теперь широко используется номенклатура изоферментов P450, основанная на дивергентной эволюции и нуклеотид / аминокислотной гомологии [2, 17]. Суперсемейство генов цитохрома P450 разделено на семейства, подсемейства и индивидуальные гены. Цитохромы P450, имеющие 40 % и более процентов гомологии аминокислотных последовательностей, представляют одно семейство генов; проявляющие более 59% подобия, входят в одно подсемейство.

Согласно номенклатуре название гена состоит из префикса CYP от английского "cytochrome P450" (Сур для мышей), номера семейства, далее буквой указывается подсемейство и обозначается номер гена [17]. При составлении номенклатуры не учитывались каталитическая активность или функции, поэтому не исключается, что цитохромы P450 различных подсемейств могут иметь одинаковые каталитические активности, либо перекрывающуюся субстратную специфичность. В настоящее время описано 36 семейств генов P450, из них 12 обнаружено у млекопитающих [17].

В некоторых случаях, наряду с номенклатурой по структурной гомологии или хромосомной локализации, цитохромы P450 рассматривают по более широки подразделениям на конститутивные и индуцибельные. Конститутивные изоформы P450 постоянно продуцируются клеткой, независимо от условий роста, и находятся под гомеостатическим контролем. В низких количествах они обнаруживаются в микросомах печени и внепеченочных тканях интактных животных. В отличие от конститутивных изоформ, экспрессия индуцибельных ферментов может контролироваться субстратами - ксенобиотиками. Многие формы P450, в частности, принадлежащие 4-му семейству, экспрессируются конститутивно и, кроме того, индуцируются некоторыми ксенобиотиками, в данном случае - гипополидеммическими лекарственными [18].

Специфическая индукция определенных форм цитохрома P450 при экспозиции организмов тем или иным химическим веществом - одно из важнейших свойств цитохрома P450, приобретенных в процессе эволюции.

Изначально ксенобиотики - индукторы монооксигеназ - разделяли на два типа [19]. Фенобарбитал (ФБ) и полициклический ароматический углеводород 3-метилхолантрен (МХ), соответственно, представляют эти типы индукторов и до сих пор используются как эталонные [14, 19 - 22]. Картины индукции P450 при введении животным ФБ или МХ существенно различаются. У крыс введение ФБ индуцирует преимущественно цитохромы P450 2B1 и 2B2, МХ активирует экспрессию P450 1A1 и 1A2. Мощным селективным индуктором P450 1A1 является 2,3,7,8-тетра- хлордibenзо-п-диоксин (ТХДД), P450 1A2 (преимущественно) индуцируется изосафролом. Известны и другие типы индукторов. Так, органические растворители такие, как ацетон, этанол индуцируют P450 2E1; стероиды (дексаметазон, прегненолон 16а-карбонитрил) - цитохромы P450 подсемейства 3А; клофибрат - P450 семейства 4.

Полигалогенированные бифенилы, в зависимости от количества атомов галогена и их положения в молекуле, индуцируют цитохромы P450 подсемейства 2В, как ФБ, или - 1А, как ПАУ. Коммерческие смеси этих соединений - индукторы смешанного типа, то есть индуцируют подсемейства 2В и 1А [23, 24]. Интересно, что индукторами семейства CYP2В у грызунов являются многие хлорсодержащие пестициды, например, ДДТ, кепон, метоксихлор [25, 26].

Способы влияния различных химических субстратов на экспрессию специфических форм P450, в целом, остаются не понятными. Выделяют три основных механизма адапта-

бильности к воздействиям ксенобиотиков для изоформ, принадлежащих генным семействам 1 - 4. Это экспрессия, опосредованная цитозольными (Ah-рецептор для P450 1A, цитозольный рецептор подобный семейству стероидных рецепторов для 4-го семейства P450) или ядерными рецепторами (гипотетический рецептор для P450 2B1 и 2B2), посттранскрипционными (CYP2E1) и посттрансляционными механизмами экспрессии (P450 1A2) [8, 27, 28].

Цитохром P450 наиболее хорошо изучен у экспериментальных животных - крыс, мышей, кроликов. Грызуны широко используются при испытании лекарств, пестицидов, пищевых добавок и других бытовых химических препаратов на токсичность, мутагенность, канцерогенность, а также при оценке вредных эффектов загрязнителей окружающей среды. Межвидовые различия в активности монооксигеназ известны много лет, но лишь в самые последние годы удалось достичь некоторого понимания молекулярных основ этих различий. Они могут иметь место в силу ряда причин: различного набора генов у разных видов, различий в механизмах регуляции отдельных изоформ P450, а также в субстратной специфичности или специфичности образуемых продуктов. Изоформы P450 у одного вида могут иметь каталитические активности, отличные от их аналогов у другого вида. Характерным примером межвидовых различий, для которого справедливы все вышеперечисленные механизмы, является подсемейство CYP2C [4]. В этой связи, при экстраполяции данных по метаболизму ксенобиотиков от грызунов на человека должна быть соблюдена необходимая осторожность. На основании исследований на грызунах нельзя с достаточной степенью надежности предсказать, как химическое вещество будет метаболизировано человеком, даже если речь идет об ортологичных цитохромах. Так, например, цитохром P450 1A1 в печени мышей практически неспособен активировать канцероген 2-ацетиламинофлуорен, но аналогичные изоферменты крыс и человека активируют этот компонент, катализируя реакцию N-гидроксилирования [6].

Среди важных находок последних лет генетические межиндивидуальные различия в экспрессии P450 у человека. Полиморфная экспрессия цитохромов P450 может быть вызвана прямыми мутациями P450 генов или дефектами регуляторных факторов, которые запускают транскрипцию. Несколько типов генетического полиморфизма экспрессии P450 было выявлено у крыс и мышей [15]. В человеческих популяциях это наиболее отчетливо можно видеть на примере полиморфизма в активности метаболизировать лекарства. Наиболее хорошо изучен дебризохин/спартеиновый полиморфизм, обусловленный присутствием в популяции мутантных аллелей CYP2D6 [30]. Известны S-мефенитоиновый полиморфизм, полиморфизм бензо[a]пиренгидроксилазы и N-ацетилтрансферазы - фермента 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков [31-33]. У быстрых и медленных метаболизаторов последствия определенных химических воздействий, включая производственные вредности, будут различны. Установлена различная подверженность быстрых и медленных метаболизаторов развитию рака гортани, мочевого пузыря и колоректального рака, лекарственной системной красной волчанки (полиморфизм N-ацетилтрансферазы) [31, 34], рака легких (полиморфизм бензо[a]пиренгидроксилазы, дебризохин/спартеиновый полиморфизм) [32, 35].

В популяционных исследованиях при выявлении межиндивидуальных различий в уровне экспрессии и каталитической активности изоформ цитохрома P450 важно установить являются ли эти различия наследственными или вызваны экологически обусловленными болезнями, специфической индукцией или ингибированием цитохромов P450. Множественность молекулярных форм цитохрома P450, их субстратная специфичность и индуцибельность различными ксенобиотиками, требуют при оценке активности монооксигеназ у животных или человека определять каталитическую активность индивидуальных форм цитохрома P450, подбирая специфичные тестовые субстраты.

У человека идентифицированы и в значительной степени охарактеризованы более 20 форм цитохрома P450 [36]. В табл. 1.1 представлены 4 семейства цитохромов P450 (CYP1,

Т а б л и ц а 1.1

Цитохромы P450 человека, метаболизирующие ксенобиотики  
[16, 38, 39]

СУР	Место экспрессии	Типичные субстраты	Индуктор
1	2	3	4
1A1	Во многих тканях вне печени	Полициклические ароматические углеводороды, (бензо[а]-пирен)	Полициклические ароматические углеводороды, курение
1A2	Печень	Гетероциклические ариламины, ароматические амины, пищевые мутагены, афлатоксин В1	Курение
2A6	Печень, легкие	Афлатоксин В1, Кумарин	
2A7	Печень ?		
2B6	Печень, другие?	?	Барбитураты?
В7Р	Псевдоген		
2С8	Печень	Бензо[а]пирен, толбутамид, R-мефенитоин	Барбитураты
2С9	Печень	Толбутамид R- и S-мефенитоин, варфарин	Барбитураты
2С18	Печень	R-мефенитоин	
2С19	Печень	R- и S-мефенитоин	
2D6	Печень, почки	Дебризохин, буфуралол	
2D7, 2D8Р	Псевдогены		
2E1	Печень, другие	Хлорзоксазон, N-нитрозодиметилламин, этанол	Этанол
2F1	Легкие, другие	Тестостерон, нафтиламин	
3A3	Тонкий кишечник, печень, другие	Нифедипин	
3A4	Печень, другие	Нифедипин, Тестостерон (6 β) циклоспорин	Барбитураты
3A5	Печень	Нифедипин	
3A7	Печень фетальная	Тестостерон (6 β)	
4A9	Печень	?	
4A11	?		
4B1	Легкие, другие	?	
4F2	?		
4F3	?		

\* Уровень эндогенной экспрессии очень низкий (без индуктора).

CYP2, CYP3 и CYP4) наиболее важные в метаболизме чужеродных веществ. Цитохромы других семейств не играют существенной роли в метаболизме ксенобиотиков, но активны в метаболизме стероидов или других физиологически активных соединений. Они экспресси-

руются главным образом в специализированных тканях - надпочечниках, гонадах, плаценте [15]. Ряд цитохромов из первых 4 семейств тоже катализируют некоторые реакции окисления стероидных гормонов, но считается, что это минорные катаболические пути, физиологическая значимость которых пока не вполне ясна [15]. Наряду с окислением ксенобиотиков, цитохромы P450 подсемейства 4 окисляют простагландины, лейкотриены, эйкозаноиды и катализируют гидроксילирование некоторых жирных кислот, причем полагают [18, 37], что это их основная функция.

### 1.1.1. CYP1 семейство генов (подсемейство 1A)

У большинства видов млекопитающих CYP1 семейство цитохромов P450 состоит из 2 членов - 1A1 и 1A2 [17]. Эти формы P450 имеют особое значение в химическом канцерогенезе, так как метаболизируют два наиболее распространенных класса канцерогенов - ПАУ (P450 1A1) и ариламины (P450 1A2) [6, 40, 41].

В табл. 1.2 представлены основные группы ксенобиотиков, подвергающихся метаболической активации цитохромами P450 подсемейства 1A [42].

Важно отметить, что P450 1A1 обычно не определяется в нормальных тканях, он экспрессируется лишь при воздействии ксенобиотиков - индукторов типа МХ (ПАУ, ПХБ или диоксины) [4, 43]. Общепринято считать, что необходимым звеном индукции CYP1A1 является взаимодействие индуктора с цитоплазматическим Ah-рецептором [2]. У человека CYP1A1 индуцируется компонентами табачного дыма в плаценте, легких, лимфоцитах периферической крови [44]. В отличие от грызунов эта форма P450 не экспрессируется в печени человека. CYP1A1 катализирует все реакции окисления бензо[а]пирена с образованием фенолов, хинонов, дигидродиолов и эпоксидов. Среди этих метаболитов - нестабильные электрофильные интермедиаты, способные связываться с клеточными макромолекулами [41, 45, 46].

В человеческой популяции обнаружены большие межиндивидуальные различия в индуцибельности бензо[а]пиренгидроксилазы во внепеченочных тканях, связанные с ДНК-полиморфизмом CYP1A1, которые в свою очередь, связывают с различной предрасположенностью к развитию рака легкого [32, 47].

В отличие от цитохрома P450 1A1, P450 1A2 конститутивно экспрессируется в печени человека и животных, кроме того эта форма может быть индуцирована МХ и ТХДД [3]. В отличие от P450 1A1, цитохром P450 1A2 не обнаружен во внепеченочных тканях грызунов и человека [15].

Т а б л и ц а 1.2

#### Метаболическая активация субстратов цитохромами P450 1A

Группа	Пример
ПАУ	Бензо[а]пирен
ПГБ	3,4,3',4'-Тетрахлорбифенил
Ароматические амины	2-Аминофлуорен
Гетероциклические амины	2-Амино-6-метилдипиридо-[1,2-α:3',2'-d]имидазол
Азосоединения	Диметиламиноазобензол
Микотоксины	Афлатоксин В1
Флавоноиды	α-Нафтофлавон
Лекарства	Парацетамол

P450 1A2 катализирует активацию обнаруженных в сигаретном дыме канцерогенных ариламинов таких, как 4-аминобифенил и 2-нафтиламин [48], активирует гетероциклические амины - промутагены, образующиеся при пиролизе пищевых белков [29]. В микросомах печени крыс цитохром P450 1A2 метаболически активирует 4-аминобифенил, 2-аминофлуорен и 2-ацетиламинофлуорен до высоко активных мутагенных продуктов [49]. Имеются данные о положительной корреляции активности P450 1A2 и химического канцерогенеза у крыс [50]. С другой стороны, известна реакция метаболической конверсии мощного канцерогена - афлатоксина В1 в нетоксичную форму - афлатоксин М1, которую катализирует P450 1A2 [51].

### 1.1.2. CYP2 семейство генов (подсемейства 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G)

Это наиболее сложное семейство генов, кодирующих различные изоформы P450. У млекопитающих выделено 7 подсемейств генов P450. Среди них большее токсикологическое значение имеют подсемейства 2B и 2E.

**P450 2A подсемейство.** У грызунов более хорошо известны реакции окисления стероидов, катализируемые этой группой цитохромов, чем реакции метаболизма ксенобиотиков. У крыс идентифицированы гены CYP2A1, CYP2A2 и CYP2A3, 2a-4 и 2a-5 - у мышей, CYP2A10 и CYP2A11 - у кроликов. У человека обнаружены 2 гена этого подсемейства CYP2A6 и CYP2A7 [17]. CYP2A1 и CYP2A2 экспрессируются лишь в печени, причем P450 2A2 - только у самцов крыс. CYP2A3 - в легких [15]. У мышей гены CYP2a (Cyp2a-4 у самцов и Cyp2a-5 у самок) экспрессируются в печени и в почках. Известно, что они катализируют гидроксилирование молекул стероидных гормонов [52, 53]. У крыс P450 2A1 и 2A2 тоже метаболизируют стероиды [53]. Несмотря на высокую степень гомологии (88%) с формой 2A1, P450 2A2 образует 6 - 8 различных метаболитов тестостерона, в то время как 2A1 - всего два [54]. P450 2A2 более активен и в метаболизме ксенобиотиков. В этой связи предполагают [54], что P450 2A2 имеет более гибкий субстрат-связывающий центр.

В печени, почках, легких человека экспрессируется CYP2A6 и, возможно, CYP2A7. Обнаружены большие (до 40 раз) межиндивидуальные различия в экспрессии P450 2A6 в печени человека [16]. Однако самый высокий уровень этого цитохрома не превышает 1% от общего содержания цитохрома P450 [36]. Также как цитохромы P450 2A у грызунов, P450 2A6 метаболически активирует проканцерогены афлатоксин В1 и N-нитрозодиэтиламин, причем последний с большей эффективностью, чем P450 2E1, катализирует 7-гидроксилирование кумарина и O-деэтилирование 7-этоксикумарина [36].

Механизмы регуляции цитохромов P450 подсемейства 2A различны. Они секспецифичны и изменяются в процессе развития [15, 27].

**P450 2B подсемейство.** Изоформы P450 2B катализируют метаболизм лекарственных препаратов и других ксенобиотиков с самой разнообразной химической структурой. У этих цитохромов гибкий субстратсвязывающий центр [55]. У крыс идентифицированы гены CYP2B1, CYP2B2, CYP2B3, CYP2B8, CYP2B14, CYP2B14P, у кроликов - CYP2B4, CYP2B4P, CYP2B5, у мышей - Cyp2b-9, Cyp2b-10, Cyp2b-13, у человека - CYP2B6 и CYP2B7P гены [17].

Подробно изучены P450 2B1 и 2B2 у крыс. Эти ферменты имеют очень похожую субстратную специфичность. Среди субстратов цитохромов P450 2B1 и 2B2 циклогексан, п-ксилол, 1-нитропропан, хлорэтилнитрозомочевина, афлатоксин В1 и хлорорганические пестициды такие, как ДДТ, хлордан, альдрин, хлордекон, линдан [22, 55 - 57]. На реконструированных системах из очищенных белков показано, что 2B1 форма P450 характеризуется более высокой активностью (в 2 - 10 раз в зависимости от субстрата) [58]. Введение крысам ФБ вызывает быструю активацию транскрипции CYP2B1 и CYP2B2 [59]. 3-й член подсемейства 2B (CYP2B3) экспрессируется конститутивно и не индуцируется ФБ [60]. Механизмы регуляции генов P450 2B широко исследуются на животных. Обнаружены отчетливые

тканеспецифичные различия в экспрессии цитохромов P450 2B1 и 2B2 [61], несмотря на то, что эти формы имеют очень высокую степень гомологии и отличаются всего по 12 аминокислотам. Более того, показана независимая индукция P450 2B2 мРНК хлордеконом [25]. До сих пор не удается идентифицировать гипотетический ядерный рецептор для ФБ [8].

Роль изоформ P450 2B в токсикологии человека не определена, так как уровень экспрессии P450 2B6 низок и каталитическая специфичность мало изучена [62]. CYP2B7P - псевдоген и, следовательно, не экспрессируется.

**P450 2C подсемейство.** Эта группа ферментов особенно активна в гидроксировании стероидов. Все цитохромы подсемейства 2C экспрессируются в печени конститутивно, CYP2C1, CYP2C2, CYP2C3, CYP2C4, CYP2C5 - у кроликов, CYP2C6, CYP2C7, CYP2C11, CYP2C12, CYP2C13 - у крыс. У мышей обнаружен лишь один фрагмент Cyp2c. В печени человека идентифицированы 4 формы цитохрома P450 подсемейства 2C: 2C8, 2C9, 2C18 и 2C19 [17]. Наиболее подробно исследованы секс-специфичные P450 2C11 и 2C12, соответственно, у самцов и самок крыс [63, 64].

Интересно, что в отличие от крыс экспрессия CYP2C генов у кроликов не является секс-специфичной, нет доказательств секс-специфичности P450 2C также и у человека, более того у человека они проявляют лишь незначительную активность в метаболизме стероидов [4]. Цитохромы подсемейства 2C у грызунов и человека имеют перекрывающуюся субстратную специфичность и метаболизируют ряд лекарственных препаратов: R- и S-мефенитоин, варфарин, толбутамид, S-нирванол, гексобарбитал [55, 58, 63 - 65]. Обнаружено, что цитохромы P450 2C метаболизируют бензо[а]пирен [38]. В человеческой популяции обнаружен генетический S-мефенитоиновый полиморфизм, который связывают с полиморфизмом экспрессии CYP2C19 [66].

**P450 2D подсемейство.** 4 цитохрома P450 (2D1, 2D2, 2D3 и 2D4) обнаруживаются в печени и почках крыс [15]. У человека, тоже в печени и почках, экспрессируется одна форма цитохрома - P450 2D6 [67]. Cyp2d-9, Cyp2d-10, Cyp2d-11, Cyp2d-12, Cyp2d-13 гены идентифицированы у мышей [17]. У кроликов гены этого подсемейства цитохромов P450 неизвестны [17].

Цитохромы P450 подсемейства 2D у грызунов и человека катализируют окисление ряда лекарственных препаратов, среди которых дебризохин, буфуралол, пропранолол, декстрометорфан [53, 67 - 69]. У мышей подсемейству 2D принадлежит специфичная для самцов тестостерон 16 $\alpha$ -гидроксилаза [70].

В популяционных исследованиях был выявлен генетический дебризохин/спартеиновый полиморфизм. Было показано, что около 7% европеоидов не способны метаболизировать дебризохин и свыше 25 других лекарств - субстратов специфичных для цитохрома P450 2D6 [67, 68]. Для медленных метаболизеров эти лекарства могут оказаться клинически неэффективными или токсичными [68]. Этот дефект - результат мутации гена CYP2D6 и отсутствия экспрессии P450 2D6 белка. Экспрессию этой формы P450 связывают с повышением риска возникновения рака легкого (у курильщиков) [35, 71] и других тканей [34, 72]. Биохимическая основа такой взаимосвязи пока не выяснена.

**P450 2E подсемейство.** В печени крыс, мышей и человека конститутивно экспрессируется P450 2E1, два цитохрома (P450 2E1 и 2E2) обнаружены в печени кроликов [17, 73]. Ряд особенностей отличает P450 2E1 от других молекулярных форм P450. Этот цитохром имеет высокую эндогенную NADPH-оксидазную активность, которая проявляется в генерации супероксида и перекиси водорода [74]. P450 2E1 совершенно неактивен в метаболизме стероидов, бензо[а]пирена и многих других субстратов P450 [75]. P450 2E1 селективно катализирует реакции окисления низкомолекулярных ксенобиотиков. Эта форма является главным катализатором окисления многих первичных спиртов до соответствующих альдегидов, катализирует N-деметилирование N-нитрозодиметиламина при низкой концентрации этого проканцерогена. Среди субстратов P450 2E1 этанол, бензол, фенол, хлороформ, метилхлорид, тетрахлорметан, уретан, акрилонитрил, стирол и др. [36, 76]. Многие субстраты имеют ток-

психологическое значение. В табл. 1.3 приведены примеры токсических эффектов, связанных с метаболизмом некоторых типичных субстратов P450 2E1 [76].

Также известны катализируемые CYP2E1 реакции метаболической инактивации проканцерогенов - трихлорэтилена, этилендибромида [36]. Такие эталонные индукторы, как ФБ, МХ и прегненолон ба-карбонитрил не индуцируют P450 2E1, напротив, супрессируют эту форму [38]. Индукторы P450 2E1 - многие его субстраты (этанол, ацетон, пиридин и др.) [77]. Повышенное содержание P450 2E1 обнаруживается в печени алкоголиков [78].

Не выявлено существенных различий в межвидовой субстратной специфичности P450 2E1 [36], но зарегистрированы большие межиндивидуальные различия в количестве и активности P450 2E1 у человека [33].

**P450 2F подсемейство.** В легких и незначительно в печени человека экспрессируется CYP2F1. Известно, что этот фермент участвует в метаболизме тестостерона и активирует нафтиламин до токсических метаболитов [39]. Cypf-2 - другой ген этого подсемейства, экспрессируется у мышей [17].

**P450 2G подсемейство.** Гены, принадлежащие этому подсемейству, у человека не обнаружены. CYP2G1 экспрессируется в назальном эпителии у кроликов и крыс [17], P450 2G1 катализирует метаболизм диэтилнитрозамина и гексаметилфосфамида (гексаметапола) [79].

### 1.1.3. CYP3 семейство генов

Известно односложное 3A подсемейство генов. 4 гена (CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7) обнаружено у человека, 3 - у крыс (CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9), 1 - у кроликов (CYP3A6), 2 - у мышей (Cyp3a-11 и Cyp3a-13) [17].

В печени человека P450 3 - количественно преобладающее семейство. Экспрессия CYP3A3 и CYP3A4 показана в большинстве образцов человеческой печени и тонкого кишечника. Лишь в 20 - 30% образцов печени обнаруживается P450 3A5 [16]. CYP3A7 экспрессируется преимущественно в фетальной печени [80].

Все цитохромы P450 подсемейства 3A с различной скоростью метаболизируют одни и те же субстраты. В их числе многие лекарственные препараты: нифедипин и другие производные дигидропиридина, циклоспорин, эритромицин и тролеандомицин, кокаин и лидокаин и др., а также стероидные гормоны - кортизол, тестостерон, прогестерон [15, 81]. Предполагается, что активный центр цитохромов P450 3A отличается более значительными размерами, в сравнении с другими формами, особенно с P450 2E1, так как P450 3A способны окислять такие большие молекулы, как молекулы циклоспорина и макролидных антибиотиков [36].

Т а б л и ц а 1.3

Метаболическая активация субстратов P450 2E1 [76]

Субстрат	Продукт	Токсичность
Бензол/фенол	Фенол/Гидрохинон	Лейкемия
N-Нитрозо-диметиламин	Метил карбониевый ион	Опухоли печени
Ацетаминофен	Бензохинонимин	Печеночная токсичность
Тетрахлорметан	Трихлорметил-радикал	То же
Этанол	Ацетальдегид	Повреждение печени в результате связывания с белками

Показано, что P450 3A4 играет основную роль в биоактивации афлатоксинов В1 и G1, известного пестицида альдрина, 6-аминохризена, 1-нитропирена [36, 82]. Интересно отметить, что в печени человека P450 3A4 катализирует конверсию 7,8-дигидрокси-7,8-дигидробензо[а]пирена до 9,10-эпоксида [41]. 7,8-дигидрокси-9,10-эпокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирен общепринято считается наиболее значительным канцерогенным производным - это главный ДНК-аддукт [3].

Известен ряд реакций детоксикации, катализируемых этими ферментами, например, образование N-оксида алкалоида сенеционина и гидроксилирование того же афлатоксина В1 с образованием афлатоксина Q1, который не так легко образует активные эпоксиды [36]. Различны способы регуляции этих ферментов. P450 3A регулируются гормоном роста, глюкокортикоидами, индуцируются ФБ, макролидными антибиотиками [15].

#### 1.1.4. CYP4 семейство генов

Цитохромы P450 семейства 4 катализируют окисление лауриновой и арахидоновой [83] кислот, простагландинов, лейкотриенов [37].

P450 4 метаболизируют гипополидемические лекарственные препараты и, как показано на экспериментальных животных, те же гипополидемические препараты индуцируют пролиферацию пероксисом и являются индукторами цитохромов P450 семейства 4. Среди этих препаратов клофибрат, ципрофибрат и другие [84]. Известно, что на экспрессию цитохромов этой группы влияют также эфиры фталевой кислоты, использующиеся как пластификаторы [85], хлорированные феноксикислоты, применяемые как гербициды [18, 86].

У человека это семейство представляют 5 генов: CYP4A9, CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2 и CYP4F3 [17]. Каталитическая специфичность кодируемых ими белков мало изучена. 6 генов, принадлежащих этому семейству, обнаружено у крыс (CYP4A1, CYP4A2, CYP4A3, CYP4A8, CYP4B1, CYP4F1), 2 - у мышей (Cyp4a-10, Cyp4a-12), 5 - у кроликов (CYP4A4, CYP4A5, CYP4A6, CYP4A7, CYP4B1) [17].

CYP4A семейство генов экспрессируется в печени, почках, кишечнике, сердце, легких и головном мозге [37].

CYP4B1 конститутивно экспрессируется в легких человека и не обнаруживается в печени. Интересно, что цитохром P450 4B1 кроликов способен метаболизировать и активировать 2-аминофлуорен до мутагенного метаболита [87], тогда как человеческий аналог не катализирует эту реакцию [39]. Эти результаты свидетельствуют о потенциально важных видовых различиях в метаболизме канцерогена.

\* \* \*

Закljučая вводную главу, представляется целесообразным отметить несколько положений, касающихся рассматриваемого в последующих главах аспекта проблемы биотрансформации ксенобиотиков.

Качественный и количественный состав изоформ цитохрома P450 может изменяться в ответ на воздействие чужеродных веществ на организм. Спектр изоформ P450 печени определяет фенотипическую характеристику микросомных монооксигеназ, метаболические пути биотрансформации ксенобиотиков и спектр образуемых метаболитов. В зависимости от относительной биологической активности исходного вещества и образуемых метаболитов будет происходить биоактивация, возможно увеличение токсичности, либо детоксикация ксенобиотика.

В результате дефицита или необычно высокой активности отдельных изоформ P450 могут иметь место нежелательные для организма последствия - снижение терапевтической эффективности лекарств, появление побочных эффектов их действия или развитие определенных патологий при экспозиции организмов в среде, содержащей химические загрязнители.

Два основных свойства цитохрома P450 - множественность субстратспецифичных изоформ и их избирательная индукция ксенобиотиками являются важными для адаптации человека и животных к быстро изменяющейся химической компоненте окружающей среды.

Селективная индукция изоформ цитохрома P450 может быть полезной для биоиндикации определенных химических воздействий на человека или животных. Увеличение скорости метаболизма тестовых субстратов или специфические изменения в профиле их метаболитов могут быть рекомендованы в качестве биохимических маркеров, свидетельствующих о воздействии на организм определенных химических веществ. Такого рода каталитический мониторинг вместе с иммуноферментными методами определения спектра изоформ в микросомах печени животных и молекулярно-биологическими методами генотипирования может быть успешно использован для комплексной оценки химического воздействия на организм человека и животных в экологически неблагоприятных районах.

## **Глава 2. ИНДУКЦИЯ ФЕРМЕНТОВ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ ПАРАМЕТР ДЛЯ БИОМОНИТОРИНГА ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Экологические последствия загрязнения окружающей среды антропогенными факторами, достигшие в настоящее время критического уровня, и связанные с этим проблемы широко изучаются во всех развитых странах. Для прогнозирования и предупреждения возможных угрожающих последствий загрязнения биосферы химическими соединениями необходима информация как об уровнях загрязнения, так и биологических эффектах загрязнителей. Поэтому в общем комплексе исследований, связанных с проблемой загрязнения окружающей среды, и включающем ее химическое и эпидемиологическое обследование, важная роль принадлежит биологическим исследованиям влияния вредных химических факторов на организм человека и животных.

Основными источниками загрязнения окружающей среды являются промышленные выбросы, токсичные выхлопы автомобильного транспорта, пестициды, гербициды и удобрения, применяемые в сельском хозяйстве и лесоводстве. Попадая в воздух, химические соединения переносятся на большие расстояния и могут загрязнить большие территории. Большая часть поллютантов попадает в воду. Загрязнение воды также может быть проблемой многих стран, так как реки протекают по многим территориям, прежде чем впадают в моря. Химические соединения, попавшие в почву, также в конечном итоге поступают в воду.

Наиболее широко распространенный класс загрязнителей окружающей среды - полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [88]. ПАУ генерируются в результате процессов неполного сгорания каменного угля, газа, нефти, горючих сланцев и других органических материалов, и содержание некоторых из них в составе биосферы достаточно велико, особенно в развитых промышленных регионах.

Одно из основных мест среди токсических компонентов загрязнения окружающей среды занимают также полихлорированные дибензо-*п*-диоксины (ПХДД), полихлорированные дибензофураны (ПХДФ). Типичный представитель ПХДД - 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*п*-диоксин (ТХДД). Источниками поступления ТХДД в биосферу служат технические продукты - хлорфеноксикислоты и хлорфенолы, сжигание муниципальных отходов, технологические высокотемпературные процессы плавления меди, моторные масла с хлорированными добавками и этилированное топливо автомобилей, процессы отбеливания бумаги. В мире известно более 200 аварий и инцидентов, связанных с выбросом ТХДД [89]. В этот перечень следует включить применение во время вьетнамской войны Agent Orange, содержащего ТХДД.

Полигалогенированные бифенилы (ПГБ) используются в промышленности как жидкие диэлектрики, теплоносители, смазочные вещества и пластификаторы, и в сельском хозяйстве как пестициды. ПГБ обладают свойством накапливаться в различных тканях организма и детектируются во многих диких видах животных [90 - 92]. Прослежены пищевые цепи накопления этих ксенобиотиков [93, 94 ].

Наиболее распространенные химические компоненты загрязнения окружающей среды:

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ):	бензо [a] пирен хризен 7,12-диметилбензо [a] антрацен 3-метилхслантрен
Полихлорированные дибензо-п-диоксины (ПХДД) и дибензофураны (ПХДФ):	Тетра-ХДД      Тетра-ХДФ Пента-ХДД      Пента-ХДФ Гекса-ХДД      Гекса-ХДФ Гепта-ХДД      Гепта-ХДФ Окта-ХДД      Окта-ХДФ
Полигалогенированные бифенилы (полихлорированные - ПХБ, полибромированные - ПББ):	Три- Тетра- Пента- Гекса- Гепта- Окта- Нона- Дека-
Пестициды:	Р,Р'ДДЭ (дихлордифенилтрихлорэтилен) Р,Р'ДДТ (дихлордифенилтрихлорметилметан) Мирекс Диэлдрин Гексахлорбензол
Летучие органические растворители:	Хлороформ Бромдихлорэтан 1,1,1-трихлорэтан Бензол Тетрахлорэтилен Дибромхлорметан 1,1,2-трихлорэтан Толуол Хлорбензол Этилбензол Бромформ 1,1,2,2-тетрахлорэтан 1,2-дихлорбензол 1,4-дихлорбензол  Этилированный фенол Ксилол
Полулетучие органические соединения:	1,2,4-трихлорбензол Трифенил фосфат Трибутил фосфат Трис(2-хлорэтил)фосфат Диэтил фталат Ди-н-бутил фталат Бутил бензил фталат Нафталин Фенантрен

Мониторинг химического загрязнения окружающей среды может быть выполнен с помощью химического анализа, хотя определение комплекса органических соединений - это не очень быстрые методы, требующие сложного оборудования [95]. Кроме того, загрязнение обычно представляет смесь различных химических соединений, и анализ одного из них не даст представления о возможной опасности смеси соединений. Биологический ответ - это

комплексный результат генетического состояния организма и экологии. Выявление симптомов болезней у популяций, хотя и необходимо, дает лишь позднее предупреждение о возможной опасности для человека. Поэтому необходима ранняя, быстрая, наиболее интегральная информация о химическом загрязнении окружающей среды.

Живые организмы имеют свойство адаптироваться к изменениям в окружающей среде через метаболизм. Биотрансформация химических факторов окружающей среды является для большинства, если не для всех видов, наиболее быстро адаптивной метаболической системой. И хотя другие ферментные системы также могут значительно изменять активность, активность ферментов биотрансформации может изменяться от едва заметной до 2-кратной и более высоких уровней. Цитохромы P450 и монооксигеназные активности увеличиваются у позвоночных в течение нескольких часов после попадания в организм ксенобиотиков. Эти ферменты часто имеют отношение к токсичности, так как поллютанты инертны, в то время как их метаболиты могут становиться реактивными к макромолекулам (белкам, ДНК).

Многочисленные химические компоненты загрязнения окружающей среды, являясь гидрофобными ксенобиотиками, при попадании в организм сталкиваются в первую очередь с ферментами монооксигеназной системы. В результате их взаимодействия эта ферментная система может индуцироваться различными загрязнителями окружающей среды и вовлекаться в метаболизм различных токсикантов из окружающей среды. Индукция может значительно изменять восприимчивость организма к повторному воздействию многих этих агентов. Известно, что биологическими последствиями взаимодействия многих химических соединений с ферментативной системой биотрансформации могут быть канцерогенные, мутагенные, тератогенные и токсические эффекты [96].

Обширный экспериментальный материал, полученный на лабораторных животных, свидетельствует, что из всех возможных биологических эффектов, которые можно использовать в качестве маркеров воздействия разнообразных химических загрязнителей на организм (например, токсичность, изменения иммунной и репродуктивной функций, дефекты новорожденных, развитие опухолей [97 - 101]), индукция монооксигеназы является, видимо, наиболее чувствительной [93, 94, 100, 102, 103].

Прежде, чем изложить доказательства этого положения, следует упомянуть о проблеме, которая возникла и была преодолена в процессе познания особенностей функционирования цитохром P450-зависимой системы. Эта проблема - широкая субстратная специфичность ферментов этой системы. Многие из модельных субстратов, использовавшихся для измерения индукции цитохрома P450, оказались неадекватными для индивидуальных форм цитохрома P450, так как многие субстраты могут метаболизироваться одновременно несколькими формами цитохрома P450 [55]. Так, субстраты, обычно применявшиеся для детекции индукции CYP2B, а именно, аминопирин, бензфетамин, этилморфин, п-нитроанизол, не имеют достаточно строгой специфичности. Показано, что к субстратам, обладающим высокой специфичностью для CYP лабораторных млекопитающих, относятся некоторые алкоксирезорифины [104, 105]. В частности, реакция о-деэтилирования 7 этоксирезорифина является строго специфичной для цитохрома P450 семейства 1A CYP1A1, реакция О-деметилирования 7 метоксирезорифина - для другого цитохрома P450 семейства 1A - CYP1A2, реакции О-депентилирования 7-пентоксирезорифина и О-бензилирования 7-бензилоксирезорифина - для цитохрома P450 семейства 2B - CYP2B1 [104, 106]. В исследованиях на лабораторных животных показан высокий уровень индукции активностей метаболизма алкоксирезорифинов в ответ на химическое воздействие [105, 107].

Прогресс в препаративной ксенобиохимии открыл путь для получения другого уникального высокоспецифичного инструмента в изучении ферментов монооксигеназной системы - полиии моноклональных антител против индивидуальных форм P450. Многочисленные исследования продемонстрировали возможность использования антител против индивидуальных форм P450 для различных целей: фенотипирования реакций иммуноингибированием,

детекции антигена иммунодиффузией, иммуноэлектрофорезом, количественными иммунохимическими, иммуногистохимическими

ими методами [108, 109]. Антитела, полученные при иммунизации чистыми индивидуальными белками Р450, выделенными из печени (или других органов) одних видов животных, могут быть использованы для детекции ортологичных Р450 у других видов млекопитающих и рыб [26, 108 - 112].

Развитие молекулярно-биологических аспектов в изучении цитохромов Р450 дало в руки исследователей новые более чувствительные методы регистрации индукции определенных форм Р450 по уровню экспрессии их генов [17, 113].

Идея использования феномена индукции ферментов метаболизма ксенобиотиков печени как потенциальных маркеров загрязнения окружающей среды, появившаяся в середине 70-х годов и во многом подтвержденная, основывается на следующих положениях: во-первых, печень служит основным органом биоаккумуляции липофильных веществ, загрязняющих окружающую среду, хотя и в других органах и тканях возможно их накопление; во-вторых, определенные формы цитохрома Р450 индуцируются многими компонентами загрязнения среды; в-третьих, их индукция может быть легко зарегистрирована с использованием методов определения специфических ферментативных активностей, иммунохимии и рекомбинантных ДНК. Первое из этих положений показано в работах на экспериментальных животных [93, 100, 102, 103] и подтверждено в исследованиях, выполненных на диких животных, пойманных на загрязненных территориях, и рыбах, выловленных в загрязненных акваториях [114 - 116]. Два других положения подкрепляются многочисленными исследованиями, изложение которых будет проведено ниже.

## **2.1. Индукция Р450 химическими компонентами загрязнения окружающей среды у лабораторных животных**

Анализ научной литературы, посвященной исследованиям индукции Р450 в печени и внепеченочных тканях экспериментальных животных химическими соединениями, загрязняющими окружающую среду, показывает, что они представляют, в основном, два типа цитохром Р450-индуцирующих агентов - индукторы типов МХ и ФБ, приводящие к синтезу СYP1A и СYP2B соответственно, а также индукторы смешанного типа, в результате влияния которых синтезируются СYP1A и СYP2B одновременно.

Доказано, что ПАУ, некоторые ПХБ, ПББ, ПГДД, ПГДФ, действуя на организм, индуцируют СYP1A [107, 117 - 120]. Индуцирующая активность типа МХ у ПГБ и ПГДД коррелирует с конфигурацией, размерами молекулы, сродством к Ah-рецептору, природой галогенированных заместителей и их локализацией, поляризуемостью молекул [94, 119]. Оптимальная форма индукторов типа МХ - копланарная [119], которая определяется заместителями в латеральных положениях молекулы. Оптимальные размеры молекулы -  $10 \cdot 3$  А, оптимальная поляризуемость - 113. Сама по себе индукция ПГБ и ПГДД монооксигеназ не вызывает острой токсичности. В частности, при исследовании токсичности четырех хлорированных дибензо-*n*-диоксинов (тетра-, пента-, гекса-, гепта-ХДД) получены результаты, говорящие об индукции ЭРОД активности в печени крыс Sprague-Dawley после обработки различными дозами (ЛД<sub>20</sub>, ЛД<sub>50</sub>, ЛД<sub>80</sub>) диоксинов, хотя и не зависимой от дозы любого из диоксинов, также как и на острую токсичность не влияла степень индукции монооксигеназной активности [120].

СYP2B может увеличивать активность под действием определенных токсикантов из окружающей среды, включающих ДДТ и другие галогенированные пестициды, некоторые изомеры ПГБ. Так, О-деалкилирование ПР и БР индуцируется более чем в 20 раз у крыс а-гексахлорциклогексаном, 2,4,5,2',4',5'-гексабромбифенилом, ДДТ и Арохлором 1254 [107]. Структурные требования для индукторов типа ФБ - наличие галогеновых заместителей в по-

ложении орто в обоих фенильных кольцах и в несмежных с 2,2'-латеральных положениях молекулы бифенила, некопланарная форма, индекс поляризуемости - 153 [94].

Среди липофильных загрязнителей некоторые вызывают смешанный тип индукции. В основном это ПГБ (2,3,4,3',4'-ПХБ, 2,3,4,3',4',5'ГХБ, 2,3,4,2',3',4'-ГХБ), смеси ПХБ (Ароклор 1254) и ПГДФ [94, 121]. Выяснилось при этом, что из двух семейств СYP1A у животных - наиболее чувствительный и важный маркер для мониторинга индуцируемых эффектов. Фактически активность СYP1A изменяется при низких дозах, когда другие печеночные и непеченочные биомаркеры не показывают никаких изменений [93, 94, 100, 102, 103]. Важно, что из всех ПГБ наиболее сильные индукторы СYP1A, как правило, наиболее токсичные [93, 94, 119].

Третье семейство цитохромов P450, которое может индуцироваться некоторыми летучими органическими растворителями, - это СYP2E [17].

Индукцию СYP1A и СYP2B различными химическими загрязнителями окружающей среды зарегистрировали у нескольких видов лабораторных животных (крыс, мышей, хомяков), хотя они и отличались как по активности в печени и внепеченочных тканях, так и по чувствительности к индукторам [110, 118, 122, 123]. Индукция СYP1A, регистрируемая по арилгидрокарбонгидроксилазной и ЭРОД активностям, под действием ПХБ, ПАУ выявлена и у многих видов позвоночных и хордовых рыб в печени и многих внепеченочных органах и тканях [110, 112, 117, 124 - 127]. В то же время, в отличие от млекопитающих, у рыб индукции СYP2B не наблюдается [125, 128 - 133].

## 2.2. Индукция P450 у диких животных

Наряду с исследованиями на лабораторных животных изучались в лабораторных условиях эффекты индукторов различного типа на монооксигеназные активности у дикоживущих видов грызунов и рыб. При этом следует заметить, что от правильного выбора вида животного, который предполагается использовать в качестве "мишени" воздействия химических загрязнителей окружающей среды, зависит эффективность использования индукции специфических активностей цитохромов P450 в качестве маркеров загрязнения окружающей среды [134]. Важно найти подходящий вид диких животных, живущих близко с человеком, чтобы использовать в качестве биоиндикатора загрязнения территории. Одними из таких животных являются мелкие грызуны. Во-первых, они живут во всех географических зонах, населенных людьми, и их можно без особого труда отлавливать. Во-вторых, грызуны - всеядные хищники, и они могут подвергаться воздействию поллютантов через потребление загрязненной воды, растений и поедание других животных, находящихся в пищевой цепи. И, наконец, они обычно гнездятся в норах в пахотном слое почвы, поэтому потенциально могут подвергаться воздействию загрязнителей, находящихся в почве.

СYP1A и СYP2B и их активности индуцируются ПХБ и ПХДД у дикоживущих видов грызунов: крыс F344/NCr (*Rattus norvegicus*), мышей B6C3F1 (*Mus musculus*), мышей (*Reithrodontomus fulvescens*) [105, 118, 135], белопалых мышовок (*Peromyscus leucopus*) [136], хлопковых крыс (*Sigmodon hispidus*) [123, 137 - 139], горных полевков (*Microtus montanus*) [140].

Группа исследователей продемонстрировала, что реакции O-деалкилирования различных резорфуринов микросомальной фракцией из печени диких хлопковых крыс (*Sigmodon hispidus*) и мышей (*Reithrodontomus fulvescens*) индуцируются 3-метилхолантеном (классическим индуктором СYP1A) и Ароклором 1254 (индуктором СYP1A и СYP2B) также, как у лабораторных крыс (Sprague-Dawley) [105, 123]. Сравнивая индуцируемость СYP1A (ЭРОД активность в зависимости от содержания ПХБ в печени) у диких животных, подвергавшихся воздействию Ароклором 1254, получили такой ряд чувствительности к индуцирующему

агенту: крысы F344/NCr (*Rattus norvegicus*) мыши B6C3F1 (*Mus musculus*) мыши (*R. fulvescens*) [118].

При воздействии на крыс F344/NCr и мышей B6C3F1 ТХДД или 3,4, 5,3',4',5'-гексахлорбифенила и использовании алкоксирезорудинов в качестве субстратов и моноклональных антител к CYP1A1, CYP1A1/A2, CYP1A2 и CYP2B в качестве специфических ингибиторов было показано, что, во-первых, у этих животных индуцируются как CYP1A, так и CYP2B, и во-вторых, что МР является специфическим субстратом для CYP1A2 у диких грызунов, а БР - для CYP2B [106].

Широко распространенные дикие белопалые мышовки (*Peromyscus leucopus*) аккумулируют в теле до 22 мг/кг веса ПХБ [114] и потому могут быть использованы для измерения экспонирования и эффектов ПХБ [116]. G.J. Simmons с соавт. [136] продемонстрировали у этих мышей смешанный тип индукции Ароклором 1254 (индукцию ЭРОД, ПРОД и БПГ активностей), причем наиболее чувствительным индикатором экспозиции ПХБ является ЭРОД.

Таким образом, индукция цитохромов P450 в печени крыс и мышей, подвергавшихся воздействию загрязнителей окружающей среды, может быть диагностическим индикатором присутствия различных поллютантов, включая ПАУ, полихлорированные пестициды, ПГБ и ТХДД.

Об индукции P450 в микросомах печени пресноводных и морских, костистых и хордовых рыб ПАУ, ПХБ и ПХДФ говорят многочисленные исследования [112, 116, 117, 133, 141, 142]. Индукция детектировалась измерением активностей ЭРОД или БПГ, и иммунохимическим определением специфических P450 белков с помощью как гомологичных, так и гетерологичных антител к ПАУ-индуцируемым формам P450 рыб и крыс [16, 26, 110, 143 - 145]. Таким белком являются P450E скапа (*Stenotomus chrysops*), P450 LM4B форели (*Oncorhynchus mykiss*), которые имеют функциональные, структурные и регуляторные черты, указывающие на его идентичность с CYP1A1 [112, 127].

Индукция активностей ЭРОД и БПГ и белка CYP1A под действием потенциальных загрязнителей окружающей среды показана также и во внепеченочных тканях рыб [112, 133, 142]. В частности описана клеточная локализация CYP1A1, индуцированного в 10 органах или органных системах скапов (*Stenotomus chrysops*), обработанных 3,3',4,4'-тетрахлорбифенилом или 2,3,7,8-тетрахлордибензофураном [101].

Реальная ситуация, однако, может оказаться сложнее. Ограничения и перспективы использования индукции монооксигеназ для биомониторинга воды рассмотрены, например, в работах А. Arillo с соавт. [146] и А. Oikari с соавт. [147]. В первой из этих работ [146] приведены данные о том, что у форели (*Oncorhynchus mykiss*) базальные уровни CYP1A и таких специфических активностей, как БПГ и ЭРОД, сильно подвержены влиянию диеты. Индукция ферментов в печени  $\beta$ -нафтафлавоном также зависит от диеты, которую поэтому нужно тщательно контролировать в лабораторных исследованиях. В другой работе [147] показано, что гепатотоксические вещества (четырёххлористый углерод и аллилформат) уменьшают у рыб степень индукции CYP1A1  $\beta$ -нафтафлавоном и бензо[а]пиреном. Кроме того, существуют зависимые от пола рыб различия в содержании и активности CYP1A, экспрессия которого регулируется эндогенно половыми гормонами [148].

В общем же, данные об индукции цитохромов P450 у диких видов свидетельствуют о том, что крысы - один из наиболее чувствительных видов для индукции цитохромов P450. К индукции МХ типа, основанной на индукции CYP1A и соответствующих активностей ЭРОД, МРОД и БПГ, чувствительны крысы, мыши, хомяки, песчанки, кролики, и обезьяны [118]. Однако, что касается индукции ПРОД и БРОД после воздействия индукторов ФБ типа, то крысы и кролики более чувствительны, чем мыши и обезьяны, в то время, как рыбы [128, 149], хомяки [150], песчанки [118] резистентны к их воздействию.

### 2.3. Влияние низких доз индукторов на цитохром P450

Во всех перечисленных выше исследованиях индукцию цитохромов P450 вызывали внутрибрюшинным введением интересующих веществ в довольно больших дозах. Однако в природе (воздухе, почве, воде) такие высокие концентрации химических загрязнителей достигаются, видимо, лишь при неординарных аварийных ситуациях. Поэтому для доказательства потенциальной возможности использования индукции цитохромов P450 для мониторинга химического загрязнения окружающей среды в условиях относительно невысоких уровней загрязнения показателны следующие исследования, в которых изучались эффекты низких концентраций химических соединений, более соответствующих экспозиции в окружающей среде.

У крыс F344/NCr, получавших с пищей очень малые количества ДДТ (12 ppm), наблюдалась более чем 5-кратная индукция БРОД [118]. После изучения дозозависимых характеристик индукции монооксигеназной системы у самок крыс F344/NCr, получавших Ароклор 1254 [107], аналогичное исследование было проведено на самцах крыс F344/NCr [151]. Были определены индукция CYP2B и CYP1A посредством иммунодетекции и измерением общей клеточной РНК, кодирующей CYP1A1 и CYP1A2, и с помощью измерения каталитической активности *in vitro* и фармакокинетики *in vivo*. ЭРОД увеличивалась в 1,5, 3, 8 и 37 раз через 7 дней после экспозиции 1,0, 3,3, 10 и 33 ppm Ароклора 1254 соответственно.

Напротив, БРОД - маркерная активность CYP2B, увеличивалась в 4 раза при 33 ppm. Индукция CYP1A *in vivo* была показана измерением концентрации зоксазоламина в сыворотке крови через 150 мин после внутрибрюшинного введения дозы 100 мг/кг веса тела. Этот показатель снижался незначительно при 1 ppm Ароклора, и очень сильно - при 10 ppm. Иммунодетектируемый белок CYP1A1 увеличивался в 2,9 раза при 1 ppm, и 10, 44 раза при 3,3 и 10 ppm. Увеличение РНК, кодирующей CYP1A1 и CYP1A2, определенное с помощью гибридизации со специфическими олигонуклеотидами, соответствовало увеличению О-деалкилазных активностей ЭР и МР соответственно. Таким образом, выводом этой работы является то, что из всех измеренных активностей различных цитохромов (2B, 1A), индукция CYP1A наиболее чувствительна для ПХБ экспозиции. Интенсивность индукции CYP1A коррелирует с уровнем Ароклор 1254 в печени, и каждый из методов мониторинга индукции достаточно чувствителен, так как детектировалась индукция при 1 ppm Ароклор 1254 в диете.

В исследовании на мышах B6C3F1 (*Mus musculus*) показано, что Ароклор 1254, попадая в организм с пищей в малых количествах, значительно индуцирует активности ЭРОД, МРОД и БРОД в печени, однако активность МРОД индуцируется при концентрациях ниже, чем те, которые требуются для индукции активностей ЭРОД или БРОД [106].

Аналогичные результаты, доказывающие возможность использования индукции цитохрома P450 в качестве биомаркера загрязнения окружающей среды, получены и на рыбах [152]. На радужную форель (*Oncorhynchus mykiss*) воздействовали в проточных условиях б-нафтофлавоном, известным индуктором CYP1A1 у рыб. Только при очень низких концентрациях индуктора (10 мкг/л и менее) через 1 день активность ЭРОД увеличивалась в концентрационной зависимости. При концентрации от 0,05 до 0,5 мг/л активность ЭРОД увеличивалась, но не зависела от концентрации, а мРНК CYP1A1 увеличивалась в 40 раз на 1, 3, 7 дни. Концентрация 0,05 мг/л приводила к увеличению активности ЭРОД в 45 и 167 раз через 18 и 48 ч соответственно, количества иммунореактивного белка CYP1A1 в 46 раз и мРНК CYP1A1 в 29 раз уже через 48 ч, что отличается от экспериментов, когда б-нафтофлавоном вводился внутрибрюшинно. При высокой концентрации же 1 мг/л активность ЭРОД и иммунореактивный белок CYP1A1 снижаются, в то время как уровень мРНК поднимается и продолжает оставаться высоким во все время экспозиции.

Таким образом, индукция CYP1A представляет высокочувствительный биомаркер экспозиции низкими дозами индукторов МХ типа у крыс, мышей и рыб, а индукция CYP2B - высокочувствительный маркер действия низких доз индукторов ФБ типа у крыс и мышей.

#### **2.4. Использование дикоживущих животных и рыб для экологического биомониторинга**

Приведенная информация об индукции различных форм P450 в печени и внепеченочных органах экспериментальных и дикоживущих млекопитающих и рыб и о связи такой индукции с действием многих химических загрязнителей окружающей среды позволяет перейти к примерам использования феномена индукции цитохрома P450 для экологического биомониторинга различных территорий, прибрежных вод морей, рек и озер во всем мире.

В многочисленных публикациях сообщается об индукции P450 у рыб, выловленных в различных акваториях, загрязненных ПАУ, ПХБ, ПГДД и ПГДФ. При этом использовались методы регистрации активностей ЭРОД или БПГ, содержания специфических белков P450, детектируемых иммунохимическим анализом с применением антител к ПАУ-индуцируемым формам CYP1A рыб и крыс [16, 115, 145, 153].

У скапов (*Stenotomus chrysops*), выловленных в загрязненной ПАУ, ПХБ и ПХДФ гавани Нью Бедфорд (шт. Массачусеттс), показано присутствие и локализация CYP1A1 [153]. В печени, почках, жабрах и сердце иммунохимически был зарегистрирован индуцируемый уровень CYP1A1, а иммуногистохимическим методом обнаружено, что локализован CYP1A1 во многих типах клеток этих и других органов: в гепатоцитах, клетках поджелудочной железы, эпителиальных и эндотелиальных клетках. То есть белок CYP1A индуцируется во многих органах рыб, подвергшихся воздействию химических веществ из окружающей среды, причем локализация его была аналогична той, которая была показана при экспериментальной индукции известными соединениями ТХБ и ТХДФ [154]. Кроме того результаты этого исследования показали, что иммуногистохимия является полезным методом выявления индукции P450 для определения загрязнения окружающей среды.

Проанализировали уровень нескольких загрязнителей (ПАУ, хлорорганических соединений, 15 ПХБ, а также ПХДФ и ПХДД) в мышцах и печени трех видов рыб - ершовка (*Limanda limanda*), мелкая камбала (*Platichthys flesus*) и камбала (*Pleuronectes platessa*), пойманных сетями в различных частях архипелага Хвалер в Норвегии. Значительно были повышены лишь уровни ПХБ у рыб из внутреннего участка архипелага. Увеличение активности ЭРОД и количество CYP1A1 коррелировало с градиентом загрязнения ПХБ в дельте реки Гломма во внутренней части архипелага. В противоположность этому, у рыбы из мест возле Идефйоген, несмотря на повышенное содержание загрязнений, активность ЭРОД не увеличена, хотя уровень белка CYP1A1 был относительно высок. Эти данные могут отражать историю загрязнения участков. Вообще же интегральный химико-биохимический подход может быть применен для получения полезной информации о причинно-следственных взаимоотношениях в других ситуациях загрязнения окружающей среды.

Активности монооксигеназ (ЭРОД и БПГ) были значительно повышены в печени морских рыб (*Diplodus annularis*), пойманных в загрязненной части гавани, в сравнении с тем же видом, пойманным из незагрязненных площадей [146]. У окуней (*Perca fluviatilis*), выловленных в Балтийском море у берегов Швеции в месте сброса отработанных вод с целлюлозно-бумажного завода, активность ЭРОД была в 3 - 10 раз, а количество иммунохимически определенного CYP1A в 20 раз выше, чем в других районах [110].

Индукцию ЭРОД и БПГ активностей наблюдали у форели (*Salmo gairdneri*) и муксуна (*Coregonus muksun*), которые были выловлены ниже по течению от целлюлозно-бумажного завода на озере Саимаа в Финляндии [110], причем активность фермента была выше у рыб, пойманных на более далеком расстоянии от завода.

Исследование микросом печени лещей (*Abramis brama*) из различных мест Рыбинского водохранилища, показало, что у лещей, пойманных в районе Череповецка, где сбрасываются отработанные воды Череповецким металлургическим заводом (ЧМЗ), ЭРОД активность повышена в 3 раза, по сравнению с таким показателем у лещей, пойманных в водах, далеких от Череповецка [16]. Это служит доказательством индукции СYP1A загрязнителями сточных вод ЧМЗ.

В мировой литературе представлены также примеры использования феномена индукции цитохром Р450-зависимой системы у животных как способа экологического биомониторинга загрязнений окружающей среды [118, 135, 155]. При помощи реакции О-деэтилирования 7-этоксирезорифина у диких крыс и мышей проводился экологический биомониторинг различных территорий штата Оклахома [118] и Австрии [156].

Так, мыши (*Reithrodontomys fulvescens*), отловленные на полях Оклахомы (США), загрязненных ПХБ, имели ЭРОД активность в печени и содержание иммунореактивного белка СYP1A в 2 - 3 раза выше, чем животные того же вида, отловленные в местах, не загрязненных ПХБ. Относительные уровни ЭРОД активности у *R. fulvescens* хорошо коррелировали с содержанием ПХБ в печени (коэффициент корреляции 0,819; P,01) [118].

В июле-сентябре 1992 г. в трех районах вокруг Вены и в четырех местностях на окраинах страны, где мало промышленных объектов, отлавливали наиболее часто встречаемых в Австрии диких мышей (*Apodemus flavicolis*) [156]. Алкоксирезорифин-О-деалкилазные активности (ЭРОД, БРОД, ПРОД) были увеличены во всех трех городских группах (и у самцов и у самок), хотя различия были статистически недостоверны среди каждой из них. Это предполагает индукцию СYP1A и СYP2B семейств, которая указывает на возможное загрязнение галогенированными диоксинами и фуранами, ПХБ, ПАУ и т.д., то есть теми соединениями, которые выбрасываются в окружающую среду главным образом при неполном сгорании в промышленности, автомобилями, при сжигании угля и газа на электростанциях.

В июне-сентябре 1992 и 1993 гг. в Институте молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН проведены исследования характера влияния окружающей среды некоторых районов Алтая на монооксигеназную систему печени мышевидных грызунов, обладающих слабой миграционной активностью [157]. Уровни СYP1A1 и СYP1A2 у мыши домовая (*Mus musculus*) и мыши лесной (*Apodemus sylvaticus*) определяли по активности ЭРОД и МРОД, а также иммунохимически с использованием моноклональных антител. Из-за большой изменчивости в активности систем метаболизма в течение репродуктивного цикла самок для выделения микросомальной фракции использовалась печень только самцов (табл. 2.1).

Анализ результатов приводит к выводу, что главным условием, определяющим различия у групп мышей по активности микросомальных монооксигеназных систем, является время отлова - июнь (первый отлов) или июль-сентябрь (второй отлов). Средние значения активностей метаболизма МР и ЭР в большинстве регионов были выше для микросомальных фракций мышей, отловленных в июне. Так, активность МРОД у мышей (*Apodemus sylvaticus*), отловленных в июне в с. Ключи Тюменцевского района (в регионе, считающемся условно контрольным), в 3,6 раза превышает активность ферментов у мышей, отловленных в том же районе в конце августа. Для домашних мышей (*Mus musculus*), отловленных в июне в с. Топольное, такое превышение в активности того же фермента составило 150%. В то же время активность ЭРОД у мышей практически не зависела от сезона, хотя значение моды для мышей второго отлова снизилось в 2,5 раза. Частотные гистограммы этих микросомальных активностей показывают, что у мышей второго отлова резко увеличилось число особей с низкой активностью фермента (0-20 пкмоль/(минрмг белка) за счет уменьшения относительного числа особей во всех остальных выбранных диапазонах.

Только активность СYP1A1, метаболизирующего ЭР для летнего отлова в с. Новинское, незначительно увеличилась как по среднему значению, так и по моде для лесных мышей (*Apodemus sylvaticus*); для домашних мышей из с. Новинского это увеличение более заметно.

Активность ЭРОД и БРОД в микросомах печени мышей,  
обитающих в различных районах Алтая, (пкмоль/(мин·мг белка))

Район	Первый отлов		Второй отлов	
	M+m	Мода	M+m	Мода
Активность ЭРОД у <i>Mus musculus</i>				
Тюменцевский (с. Ключи)	31,12±5,55 (n = 15)	20,0	15,42±5,19 (n = 5)	9,5
Угловский (с. Топольное)	33,51±5,35 (n = 15)	30,6	30,66±14,91 (n = 9)	12,2
Локтевский (с. Новинское)	23,86±4,82 (n = 16)	15,3	35,53±9,31 (n = 17)	22,4
Активность ЭРОД у <i>Apodemus silvaticu</i>				
Тюменцевский (с. Ключи)	55,94±18,73 (n = 7)	24,3	22,81±4,01 (n = 21)	12,8
Угловский (с. Топольное)	40,50±7,7 (n = 22)	26,9	34,28±8,19 (n = 42)	8,19
Локтевский (с. Новинское)	39,95±19,6 (n = 16)	19,6	45,65±7,90 (n = 40)	21,5
Активность МРОД у <i>Mus musculus</i>				
Тюменцевский (с. Ключи)	67,45±16,38 (n = 15)	39,1	13,48±6,4 (n = 5)	1,3
Угловский (с. Топольное)	53,57±7,57 (n = 15)	50,0	21,20±9,61 (n = 5)	8,5
Локтевский (с. Новинское)	33,25±6,46 (n = 14)	27,5	19,92±4,19 (n = 13)	11,6
Активность МРОД у <i>Apodemus silvaticus</i>				
Тюменцевский (с. Ключи)	79,89±23,2 (n = 7)	29,7	19,36±4,69 (n = 18)	10,2
Угловский (с. Топольное)	46,85±6,65 (n = 22)	40,2	48,46±14,71 (n = 18)	25,2
Локтевский (с. Новинское)	52,71±12,9 (n = 15)	27,2	42,20±10,39 (n = 34)	22,6

В любом случае, объединить для межвидовых и региональных сравнений данные, полученные на первом и втором отлове, не представляется возможным.

Активность МРОД и ЭРОД у мышей первого отлова максимальна для животных, собранных в районе с. Ключи; только домовые мыши из с. Топольное имеют сравнимую с мышами из Тюменцевского района активность ЭРОД. При этом значение моды тех же активностей у мышей из с. Ключи всегда ниже, чем у животных из с. Топольного, а превышение моды у последних мышей над животными из Локтевского района незначительно. Сравнение частотных гистограмм дает любопытную картину: в группе с самой слабой активностью во всех случаях больше всего особей из Локтевского района, в той же группе доля мышей из Тюменцевского района всегда выше, чем животных из Угловского района, в

то время как это соответствие сохраняется и для диапазона, включающего особей с максимальной активностью ферментов.

Для мышей второго отлова картина совершенно иная - мыши из Тюменцевского района обладают самой низкой активностью по обоим ферментам. Активность ЭРОД выше у животных из с. Новинского, чем у отловленных в с. Топольное; прочие активности у животных из этих двух регионов вполне подобны как по среднему значению, так и по моде. При этом в группе особей с самой высокой активностью этих двух ферментов всегда преобладают особи из Угловского района.

Качественная иммунохимическая характеристика образцов микросом печени грызунов с применением моноклональных антител против CYP1A1/A2 показывает, что доля особей (*Mus musculus*) с регистрируемым наличием формы CYP1A1, отловленных в с. Топольное, составила 46% в июне и 75% в августе, в с. Новинское повысилась с 69 до 85%, а в с. Ключи - снизилась с 61 до 40 %. Такая же картина для мышей (*Apodemus sylvaticus*) (в Топольном - с 50 до 78%, в Новинском - с 67 до 95%, а в Ключах доля особей с этой изоформой осталась постоянной).

Работа позволяет сделать вывод о наличии достоверных сезонных, региональных и видовых различий в активностях различных изоформ цитохрома P450. Для экологического биомониторинга особенное значение имеет интерпретация региональных и сезонных различий. В литературе нет данных о сезонных изменениях в активности ферментов, метаболизирующих ксенобиотики, у диких животных. Влияние окружающей среды на активность этих ферментов может проявляться в индуцирующем действии таких компонентов загрязнения среды, как галогенированные пестициды, ПХБ, 2,3,7,8-тетрахлор-п-диоксин, а также в смешанном влиянии аллелохемиков, связанным с сезонной переменой питания. Однако последний фактор не может объяснить выраженных региональных различий в изменениях активности ферментов. Для надежной интерпретации данных необходимо также иметь сведения об активности этих ферментов в безусловно контрольной зоне. Скорее всего, эти изменения связаны с процессами накопления и выведения из среды веществ техногенного происхождения, так что продуктивный анализ можно провести при наличии данных о динамике содержания потенциальных индукторов и ингибиторов в почве, воде и продуктах питания.

## **2.5. Экологический биомониторинг с использованием лабораторных животных**

Для мониторинга загрязнений окружающей среды, основанном на использовании методологии индукции цитохромов P450 поллютантами, помимо исследования монооксигеназной системы отловленных диких животных или рыб могут быть применены некоторые альтернативные подходы. Один из таких подходов - это взятие образцов почвы и воды из района потенциального загрязнения, транспортировка образцов в лабораторию, где образцы могут быть введены лабораторным животным либо прямо, либо после экстракции. Ранее такие процедуры были применены на различных видах млекопитающих [158 - 161] и рыб [16, 162].

В лабораторных условиях в течение 5 - 9 месяцев на рыб (*Muoxocephalus quadricornis*) воздействовали отработанной водой из стоков целлюлозно-бумажного завода [162], что приводило к индукции ЭРОД активности.

Исследовали эффект обработки водой, загрязненной сточными водами Байкальского целлюлозно-бумажного комбината (БЦБК), на монооксигеназную активность и изоферменты P450 в микросомах печени рыб из оз. Байкал: Байкальского хариуса (*Thymalus arcticus baikalensis* D.) и подкаменщика (*Cottoco mephorusgreminski*), пойманных в южной и центральных частях озера в августе-сентябре [16]. У рыб, содержавшихся в аквариуме с бай-

кальской водой, загрязненной БЦБК, ЭРОД активность повышается в 4 раза у подкаменщика и в 2 раза у хариуса через месяц экспозиции.

Активности монооксигеназ (ЭРОД и БПГ) были значительно повышены в печени форели (*Oncorhynchus mykiss*), содержащейся в загрязненной речной воде [146].

Примером использования лабораторных животных для биомониторинга окружающей среды на основе индукции монооксигеназной системы может быть исследование, проведенное Институтом молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН совместно с Институтом экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН в Пермской области [16]. В данном случае для мониторинга экспериментальные крысы Вистар в течение 2,5 месяцев (июль-сентябрь) содержались в различных зонах наивысшей активности выбросов пяти промышленных предприятий г. Березники, а также в с. Усолье, расположенном в нескольких километрах от Березников. В группах животных, содержащихся в зонах предприятий "Азот", "Сода" и титаномагниевого комбината, из всех измеренных монооксигеназных активностей увеличивались активность диметилнитрозамин-N-деметилазы и *p*-нирофенолгидроксилазы - маркерных активностей CYP2E, так же, как и иммунохимически определяемый белок CYP2E.

## **2.6. Индукция P450 химическими компонентами загрязнения окружающей среды у человека**

Эффективность мониторинга окружающей среды с использованием индукции цитохромов P450 установлена различными исследователями на разных видах животных и рыб. Помимо них объектами подобных исследований могли бы быть также птицы, различные растения, морские водоросли, микрофлора почвы, водные организмы (моллюски, раки), однако для этих видов пока нет достаточной информации о ферментах и механизмах детоксикации ксенобиотиков. В общем же, факты о том, что индукция цитохромов P450 у наземных и водных животных, подвергавшихся воздействию загрязнителей окружающей среды, может быть диагностическим индикатором присутствия различных поллютантов, открывают возможность для выявления потенциальных загрязнителей окружающей среды и прогнозирования возможных вариантов опасных последствий их воздействия на человека. Монооксигеназная система у человека обладает теми же свойствами и функциями, что и у животных. Подобным же образом ферменты этой системы в различных органах и тканях реагируют на воздействие ксенобиотиков, в том числе поллютантов.

Для изучения цитохромов у человека и оценки роли монооксигеназной системы в детоксикации и метаболической активации ксенобиотиков необходима доступная для анализа ткань и возможность получения ее неинвазивным способом. Такой тканью, как показано в настоящее время, являются мононуклеарные клетки периферической крови, в первую очередь, лимфоциты и моноциты, первичные культуры из других органов и тканей, различные линии перевиваемых человеческих клеточных культур, а также плацента человека.

В последние годы получили распространение исследования на лимфоцитах периферической крови людей благодаря возможности регистрировать в бласттрансформированных лимфоцитах и моноцитах монооксигеназные активности CYP1A1 [163]. Используется так называемый лимфоцитарный тест, позволяющий оценивать индекс индуцибельности (ИИ) CYP1A1, определяя базальный и МХ-индуцированный уровни ферментативной активности (в частности, БПГ) в митогенстимулированной культуре лимфоцитов периферической крови людей [164].

В Институте молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН с помощью этого метода оценки индукции CYP1A1 проведены исследования по определению ИИ лимфоцитов периферической крови людей, проживающих на территории Южного Вьетнама, попавшей в зону обработки в годы американской агрессии хлорфеноксигербицидами [165].

Известно, что Agent Orange, использовавшийся в качестве дефолианта, состоял из равных частей 2,4-дихлорфеноксиацетиловой и 2,4,5-трихлорфеноксиацетиловой кислот, и последняя была загрязнена 2,3,7,8-ТХДД, известного своими токсическими эффектами у людей, а также способностью индуцировать активность БПГ у млекопитающих [166]. В качестве контроля была взята группа людей, проживающих на необработанной территории и не имевших контакта с хлорфеноксигербицидами. Хотя средние значения ИИ у исследованных двух групп людей отличались незначительно, но у людей, подвергавшихся воздействию диоксином, увеличивается частота встречаемости ИИ с высокими значениями и отсутствует ИИ с низкими значениями. Эти данные демонстрируют взаимосвязь индукции CYP1A1 у людей и воздействия на них потенциального загрязнителя-индуктора ТХДД.

Индукция CYP1A1 в лимфоцитах крови показана также у людей, работающих во вредных условиях производства [16, 167]. В Институте комплексных проблем гигиены и профпатологий СО РАМН совместно с Институтом молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН проведены работы по определению ИИ бензо[а]пиренгидроксилазы в контрольной группе и у рабочих алюминиевого производства в г. Новокузнецке, подвергающихся воздействию бензо[а]пиреном [16]. Значение ИИ у рабочих выше, чем в контрольной группе, а внутри группы рабочих ИИ был выше у курящих, чем у некурящих.

Предприняты также исследования по определению в периферических лимфоцитах человека уровней экспрессии гена CYP1A1 [167]. В этой работе базальный и МХ-индуцируемый уровни экспрессии гена измеряли стандартным слот-блот анализом мРНК в митогенстимулированной культуре периферических лимфоцитов дорожных рабочих, подвергающихся воздействию креозота (смесь крезолов, ПАУ), и контрольной группы. Кожная и ингаляционная экспозиция рабочих креозотом существенно зависит от условий и особенно от температуры. Поэтому кровь собирали у различных групп рабочих в течение осени, зимы, лета (времени, когда острая экспозиция наибольшая). Базальный и индуцируемый уровни экспрессии гена CYP1A1 не увеличиваются ни в одном из сезонов, однако отношение индуцируемого/базального уровней мРНК (индуцибельность) у летних рабочих была значительно выше, чем в контроле (P,01).

Эти исследования демонстрируют, что ИИ как ферментативной активности, так и специфической генной экспрессии CYP1A1 в периферических лимфоцитах может служить в качестве молекулярного биомаркера экспозиции ПАУ, а также быть полезным для оценки экспозиции человеческой популяции потенциальными канцерогенами.

Другим подходящим источником монооксигеназ у человека является плацента. Известно, что цитохром P450 плаценты имеет широкую субстратную специфичность [44], которая определяется несколькими формами P450, участвующими в метаболизме половых гормонов и ксенобиотиков [95]. Курение беременных женщин приводит к индукции CYP1A, регистрируемой по активностям БПГ и ЭРОД [168]. Монооксигеназная система плаценты человека, видимо, гомологична монооксигеназной системе печени животных, индуцируемой ПАУ [169]. Индукцию монооксигеназ в плаценте вызывают некоторые поллютанты. В частности, эти ферменты имеют повышенную активность в плаценте женщин, подвергавшихся воздействию различными галогенированными ароматическими углеводородами (дибензофуранами), даже через пять лет после воздействия [121, 170].

В исследовании, проведенном на заводе "Химконцентрат" г. Новосибирска, были получены данные о индукции CYP1A в плаценте женщин, подвергавшихся воздействию вредных химических факторов (неопубликованные данные: Н.Е. Козловская, Е.В. Пак, Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН). В плаценте женщин, работающих на этом химическом производстве, активность метаболизма 7-этоксирезорурфина была повышена по сравнению с таким показателем в контрольной группе, подобно тому, как это наблюдается у курящих матерей. Иммунохимический анализ с использованием моноклональных антител против некоторых форм P450 крыс выявил индукцию только CYP1A. Таким образом, индукция CYP1A в плаценте женщин свидетельствует о загрязнении окру-

жающей среды на данном химическом производстве поллютантами типа ПАУ, ПГБ или ПГДД, и о том, что повышается риск патологии репродуктивной функции женщин и неблагоприятного влияния на эмбриогенез.

Таким образом, химическое загрязнение окружающей среды является одной из наиболее серьезных современных проблем сохранения здоровья как человека, так и разнообразных популяций живой природы. Биохимический мониторинг играет роль в определении уровней химического загрязнения и проверке неблагоприятных последствий экологической обстановки для популяций и эпидемиологии болезней. Биохимический мониторинг может дать первый предупредительный сигнал до того, как станут видимыми такие отдаленные последствия, как заболеваемость и смертность. Он также может дать информацию о механизмах биологического действия поллютантов и их совместных эффектах.

Метаболизм ксенобиотиков - это более или менее универсальное свойство всех организмов, что является отправной точкой для биохимического мониторинга. Цитохром P450 и монооксигеназные активности в тканях, увеличивающиеся в ответ на химическое воздействие - более чувствительные биохимические параметры, чем многие другие, и поэтому индукция монооксигеназных активностей у водных и наземных животных - подходящий параметр для мониторинга загрязнения окружающей среды.

### Глава 3. БИОМОНИТОРИНГ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТОВЫХ ЛЕКАРСТВ

Изучение и накопление данных о межвидовых различиях в организации и регуляции системы биотрансформации ксенобиотиков у экспериментальных животных обусловили необходимость ее изучения у человека. Было показано, что метаболизм одних и тех же субстратов может осуществляться у грызунов и человека различными формами цитохрома P450. Например, бензо[а]пирен в микросомах печени грызунов окисляется преимущественно цитохромом P450 1A1, а в микросомах печени человека - P450 3A4 [41]. Наблюдаются межвидовые различия в эффектах индукторов и ингибиторов на монооксигеназную систему человека и грызунов [171]. Генетический полиморфизм ряда ферментов биотрансформации у человека может либо встречаться, либо отсутствовать у разных видов экспериментальных животных. Сексуальный диморфизм в метаболизме лекарств у грызунов, у человека во многих случаях почти не выражен [172].

Таким образом, стало очевидным отсутствие возможности воспроизвести в экспериментальных моделях многие особенности, присущие человеку. Кроме приведенных выше, были и еще аргументы, даже более весомые, для изучения систем биотрансформации у человека. Они базировались на очевидной взаимосвязи человека и окружающей его среды и данных об увеличении заболеваемости в связи с ростом загрязнения окружающей среды. Поскольку человечество стоит перед неизбежной перспективой увеличения производства различных химических соединений и дальнейшего ухудшения экологической ситуации, возникает необходимость точного прогнозирования определенных видов заболеваемости в популяциях, сформированных по определенным признакам группам и у конкретных индивидов в сложившихся условиях окружающей среды. Как и во многих других случаях, когда мы говорим о взаимосвязях человека и какого-либо другого объекта (явления и т.д.), человек, в силу ряда причин, оказался менее изученным и в сравнении с окружающей средой. Это касается и качественных, и количественных оценок. Поэтому, именно достижения дисциплин, изучающих закономерности превращений чужеродных химических соединений в человеческом организме, должны составить современную научную базу наук, имеющих отношение к здоровью человека.

Исследования монооксигеназной системы человека начались в середине 70-х годов, тенденция к увеличению их объема сохраняется. Методология исследований с самого начала развивается с учетом этических и других ограничений, присущих человеку как объекту исследования и включает следующие основные подходы: 1) определение *in vitro* активности ферментов биотрансформации в доступных образцах биоматериала (лимфоциты крови, микросомы, изолированные из биоптатов органов, смывы и соскобы клеток слизистых и кожи), анализ структуры генов, кодирующих ферменты биотрансформации методом цепной полимеразной реакции в сочетании с рестрикционным анализом; 2) изучение *in vivo* - фармакокинетическая оценка с помощью тестовых лекарств.

Исторически исследования *in vivo* предшествовали исследованиям *in vitro* и начались с наблюдений различий в клинической эффективности и развития побочных реакций от применения лекарств. Эти наблюдения привели к открытию генетического полиморфизма ферментов биотрансформации, сначала N-ацетилтрансферазы [173 - 175], затем дебризохингидроксилазы [176], S-мефенитоингидроксилазы [177] и др. Тот факт, что в клинических и фармакологических исследованиях к этому времени уже был отработан метод количественной

оценки этапов превращения лекарств в организме и метаболизма в частности, очень способствовал таким исследованиям. Подробно этот вопрос изложен в обзоре [178]. Суть такой оценки составляет понятие клиренса, или очищения. Лекарство или другой ксенобиотик, попавший в организм, по завершении процессов абсорбции и распределения достигает некой концентрации в его водной среде. Снижение этой концентрации будет происходить в результате выведения из организма как продуктов метаболизма так и исходного соединения с мочой, выдыхаемым воздухом, желчью и потом. (Попутно отметим, что способность к распределению в водной фазе в несвязанном с белком состоянии и преимущественное выведение из организма через почки в основном в виде метаболитов являются важными критериями в выборе тестовых лекарств.) Измерение динамики снижения концентрации лекарства в водной фазе позволяет рассчитать период полувыведения ( $T_{1/2}$ ). Иначе этот процесс можно представить как полное очищение части объема водной фазы в единицу времени, это и есть клиренс.

$$CL_{total} = D/AUC,$$

где  $D$  - доза лекарства, а  $AUC$  - площадь под кривой (area under the curve) концентрация/время.

Если в последовательности процессов, составляющих судьбу лекарства в организме, скоростью-лимитирующим является метаболизм, то  $T_{1/2}$  и общий клиренс отражают именно его активность. В случае, если метаболизм лекарства осуществляется несколькими ферментами и при этом образуется несколько метаболитов, возможен расчет метаболических клиренсов, характеризующих активность отдельных метаболических путей:

$$CL_m = CL_{total} \times f_m,$$

где  $f_m$  - фракция дозы, экскретированная как метаболит "m".

Возможность мониторинга системы биотрансформации у человека сопряжена с наличием знаний о субстратах-лекарствах и образующихся метаболитах, высокоспецифичных ("маркерных") для индивидуальных молекулярных форм и соответствии этих форм уже изученным формам-ортологам у грызунов, что дает возможность судить о характере воздействия окружающей среды и биологических последствиях. Эти знания, сделавшие информативной оценку системы биотрансформации у человека в условиях *in vivo*, были получены именно в исследованиях *in vitro*.

Наиболее информативным подходом в изучении специфичности лекарств является метаболизм в реконструированной системе высокоочищенных ферментов или в клетках, геном которых в норме лишен генов, кодирующих исследуемые ферменты, куда эти гены встраивают.

С помощью препаратов изолированных микросом исследуются кинетические параметры ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ), проводится ингибиторный анализ с использованием других лекарств и моноклональных антител. Воздействуя на экспериментальное животное агентами с уже изученными биологическими эффектами - индукторами или ингибиторами ферментов биотрансформации,- проводится корреляционный анализ соответствия количества индивидуальных форм ферментов скорости продукции индивидуальных метаболитов в препаратах микросом и фармакокинетических показателей. После этого делается вывод о возможности использования данного лекарства в качестве "маркерного" для конкретной изоформы-ортолога у человека.

В настоящее время среди известных ферментов биотрансформации повышенным вниманием пользуются те, для которых установлена роль трансформации ксенобиотиков в реак-

тивные метаболиты, предполагается взаимосвязь с какими-либо заболеваниями, прежде всего онкологическими, а также полиморфные изоформы цитохрома P450 (во многих случаях эти признаки сочетаются). К ним относятся: P450 IA1 и IA2, P450 IB6, P450 IIIA4, P450 IIE1, P450 IID6 и P450 IIC19. Информация о высокоспецифичных лекарствах-субстратах этих форм, а также некоторых нелекарственных субстратах представлена в табл. 3.1.

Поскольку в предшествующих главах уделено достаточно внимания биологической основе множественности форм ферментов биотрансформации и перекрывающейся субстратной специфичности, отсутствие уникальных маркеров ферментов не вызовет удивления. Ниже мы кратко рассмотрим семейства цитохрома P450 человека в связи с задачами биомониторинга.

### 3.1. Подсемейство CYP1A

P450 IA1 и IA2 человека осуществляют биоактивацию следующих протоксикантов и проканцерогенов: P450 IA1- бензо[а]пирена и других ПАУ, P450 IA2- 2-ацетиламинофлюорена, 2-аминофлюорена, 2-аминоантрацена, 4-аминобифенила, 2-нафтиламина, парацетамола, об-

Т а б л и ц а 3.1

Специфичность форм цитохрома P450 человека и грызунов в окислении лекарств и нелекарственных соединений

Формы P450	Приоритетная реакция	Активность в отношении других субстратов	P450-ортолог у грызунов
CYP1A1	O-деэтилирование 7-этоксирезорифина	1- и 3-N-деметилирование, C8-окисление теофиллина 1-,3-,7-N-деметилирование и C8-окисление кофеина, эпексидация верлукаста	CYP1A1 (крысы) Cyp1a-1 (мыши)
CYP1A2	O-деметилирование метоксирезорифина	высокоаффинная составляющая O-деэтилирования фенацетина, 1-,3-,7-деметилирование и C8-окисление кофеина, C8-окисление и 1- и 3-N-деметилирование теофиллина	CYP1A2 (крысы) Cyp1a-2 (мыши)
CYP2D6	4-гидроксилирование дебризоквина	2,3-дидегидрирование спартеина, 4S-гидроксилирование пахикарпина, O-деметилирование кодеина, 4-гидроксилирование пропранолола, 2-гидроксилирование имипрамина	CYP2D1 (крысы)
CYP2B6	Депентилирование пентоксирезорифина	16-β-гидроксилирование андростендиона и тестостерона, окисление триметадина	CYP2B1 (крысы)
CYP2C	4-гидроксилирование мепенитоина	гидроксилирование фенитоина, гексобарбитала, толбутамида, диазепамы	CYP2C (крысы)
CYP3A	N-деметилирование эритромицина	6-β-гидроксилирование кортизола, андростендиона и тестостерона, дегидрирование нифедипина, окисление парацетамола	CYP3A (крысы)
CYP2E1	6-гидроксилирование хлорзаксозона	окисление ацетона в ацетол окисление изониазида, парацетамола	CYP2E1 (крысы)

разующихся в обуглившемся мясе гетероциклических аминов-2-амино-3-метилимидазо[4,5f]хинолина (IQ), 2-амино-3,8-диметилимидазо[4,5f]хинолина (MeIQ), 2-амино-3,8-диметилимидазо[4,5f]хиноксалина (MeIQx), 2-амино-6-метилпиридо[1,2-а:3',2'-d]имидазола (Glu P-1), 2-амино-6-метилдипиридо[1,2-а:3',2'-d]имидазола (Glu P-2), 3-амино-1-метил-5Н-пиридо[4,3-б]индола (Trp P-2) Кроме того, Р450 1А2 инактивирует такие проканцерогены как афлатоксин В1, 2-фурилфурамид, 1,3-динитропирен [36].

ПАУ, диоксин, β-нафтофлавон, бифенилы, изосафрол являются индукторами Р450 1А1/А2, причем изосафрол предпочтительно индуцирует Р450 1А2 [179]. Ингибируют активность данных цитохромов α-нафтофлавон и 9-гидроксиэллиптицин (Р450 1А1) и фурафиллин (Р450 1А2) [180, 181].

Важность оценки активности цитохромов Р450 1А1 и 1А2 у человека прежде всего обусловлена их ролью в химическом канцерогенезе, индуцированном ПАУ [45] (подробно эта проблема изложена в специальной главе сборника). Изучение фармакокинетики лекарств у курильщиков выявило увеличение клиренса и укорочение периода полувыведения кофеина и теofilлина [182, 183], что связывали с содержащимися в табачном дыме ПАУ [184]. Изучение метаболизма метилксантинов в микросомах печени крыс, индуцированных ПАУ, Ароклором 1254 и изосафролом, увеличивающих количество цитохромов субсемейства Р450 1А, и фенобарбиталом (индуктор семейства Р450 1В), показало, что Р450 1А1 и 1А2 являются преимущественными, хотя и не исключительными метаболитерами метилксантинов [185 - 189]. Эти результаты соответствовали изменениям фармакокинетики метилксантинов у индуцированных животных [190 - 192].

Изучение метаболизма теofilлина в реконструированной системе с высокоочищенными формами цитохрома Р450 показало, что и 1-, 3-*N*-деметилирование, и С8-окисление осуществляются Р450 1А1 и 1А2. Р4502С6 также обладает С8-окислительной активностью [193]. Продукты *N*-деметилирования и С8-окисления теofilлина и кофеина были зарегистрированы также в клетках V79 китайского хомячка с экспрессированными единичными цитохромами Р450 1А1 и 1А2 крысы и человека [194].

Важное место в доказательстве специфичности Р450 1А1/1А2 в метаболизме метилксантинов занимают также исследования, выполненные на срезах печени, культурах гепатоцитов и микросом печени человека [195 - 197].

В целом, результатом этих экспериментов стало доказательство специфичности субсемейства Р450 1А человека и грызунов в метаболизме метилксантинов. Цитохрому Р450 1А2 принадлежит основная часть активности как в биотрансформации теofilлина, так и кофеина. Кофеин в большей мере, чем теofilлин подвергается *N*-деметилированию. У человека в сравнении с грызунами продукты *N*-деметилирования составляют более значительную часть по отношению к продуктам С8-окисления. Индукция субсемейства Р450 1А приводит к возрастанию общего клиренса, укорочению периода полувыведения и увеличению доли продуктов реакций *N*-деметилирования.

В качестве другого потенциального маркера этих форм цитохрома Р450 был изучен также антипирин. Однако в реконструированной системе было показано участие и ФБ-, и МХ-индуцируемых, и конститутивных форм Р450 в продукции его основных метаболитов [198]. Правда, эти активности регистрировались с использованием таких высоких концентраций, которые не могут быть достигнуты в условиях *in vivo*. В опытах по изучению фармакокинетики антипирина у крыс, обработанных индукторами 1А и 1В субсемейств, удалось показать корреляцию одного из метаболитов антипирина- 4-гидроксиантипирин - с изменениями активности Р450 1А [199] и его корреляцию с фармакокинетикой теofilлина [200]. Такая взаимосвязь была выявлена и при обследовании людей [201]. В экспериментах [202] обработка крыс фенобарбиталом или метилхолантеном приводила к возрастанию общего клиренса антипирин в 4 и 8 раз соответственно. Наш опыт использования этих лекарств при обследовании рабочих алюминиевого производства, загрязняющего окружающую среду бензо[а]пиреном, проведенном совместно с Новокузнецким институтом комплексных проблем

гигиены и профпатологии СО РАМН, свидетельствует о большей специфичности теофиллинового теста для оценки P450 1A (табл. 3.2) G.H. Lambert и соавт. [204], обследовавшие кофеиновым тестом жителей Мичигана, подвергшихся в 1973 - 1974 гг. воздействию полибромированных бифенилов, выявили корреляцию между их уровнем в крови обследуемых и скоростью элиминации кофеина. Авторы делают вывод о пригодности кофеинового теста для мониторинга активности P450 1A.

Т а б л и ц а 3.2

**Фармакокинетика антипирина и теофиллина у рабочих  
алюминиевого производства [203]**

Показатель	Контроль	Рабочие
Период полувыведения антипирина, ч	10,9 ± 2,8 (n = 12)	7,8 ± 2,4* (n = 12)
Доля 4-ОН-АП среди метаболитов АП, %	38,2 ± 2,4 (n = 7)	44,0 ± 6,0 (n = 7)
Период полувыведения теофиллина, ч	9,4 ± 5,2 (n = 8)	4,3 ± 2,1* (n = 21)

Примечания. 4-ОН-АП - 4-гидроксиантипирин; \* - p 0.05

Мы считаем целесообразным использование антипиринового теста в тех случаях, когда заранее неизвестны состав загрязнителей окружающей среды или биологические эффекты экологических факторов. В таких случаях первичное обследование антипирином может быть впоследствии дополнено более специфичными тестовыми лекарствами. С использованием антипиринового теста нами получены данные о снижении ксенобиотик-метаболизирующей функции печени у жителей Севера [205], перераспределении активностей форм цитохрома P450 у лиц, получавших лазерную терапию [206].

### 3.2. Подсемейство CYP3A

Каталитические активности, связанные с P4503A, уровни белка и уровни мРНК широко варьируются между индивидами [207 - 209]. Это послужило причиной того, что первоначально различия в нифедипиноксидазной активности отнесли к генетическому полиморфизму [210]. Однако с увеличением числа обследованных было получено одномодальное распределение [211], которое хорошо совпадало с различиями в уровнях мРНК [209, 212] и каталитической активностью. Получение ряда высокоочищенных белков и клонов ДНК привело к формированию данного подсемейства [208, 213, 214], которое в настоящее время включает 4 гена. Нифедипиноксидазная активность установлена для белков, кодируемых CYP4503A4 [215, 216] и CYP4503A5 [186]. Следующие характеристики данного подсемейства обуславливают повышенное внимание исследователей: 1) в количественном отношении оно составляет основную часть всей композиции цитохромов P450 печени человека - около 30% [207]; 2) его представители окисляют очень большое количество различных по структуре лекарств (по оценкам U. Meuer - примерно 50% всех известных лекарств) и ряда химических канцерогенов.

Кратко отметим такие субстраты данного подсемейства, как стероидные гормоны (андростендион, тестостерон, кортизол, дегидроэпиандростен 3-сульфат) [186, 217], макролидные антибиотики (эритромицин и тролеандомицин [218, 219], циклоспорин [220], рифампицин) [221], противогрибковые препараты - производные имидазола - кетоконазол, клотримазол и др.) [179], сердечный гликозид дигитоксин [222], антиаритмический препарат амиодарон [223], бензо[а]пирен, диметилбензантрацен, дигидродиолы ПАУ, аминохризен [41, 186].

Примечательно, что многие субстраты P450 3A4 одновременно и индукторы, и ингибиторы. Это относится к макролидным антибиотикам и противогрибковым препаратам [179, 223], стероидным препаратам (прегненолон-16  $\alpha$ -карбонитрил, дексаметазон), рифампицину [186], барбитуратам [55].

Изучение субстратной специфичности P450 3A4 *in vitro* показало, что в ряду эритромицин - тролеандомицин - кортизол наблюдается высокая корреляция между активностями и количеством цитохрома в микросомах печени человека [224]. Однако такие особенности эритромицина, как распад в кислой среде желудка [225, 226] с образованием ангидроэритромицина, ингибирующего P450 3A [227], делали его неудобным для оценки активности P450 3A4 *in vivo*, хотя принципиально такой метод был отработан в виде эритромицинового дыхательного теста [228]. Использование нифедипина ограничивала нестабильность на свету [229]. В то же время, в ряде работ была убедительно показана адекватность использования отношения 6- $\beta$ -гидроксикортизол / кортизол с этой целью [224, 230].

Мониторинг семейства P450 3A в связи с проблемами экологии пока еще не получил широкого распространения. Больше внимание ему уделяют в связи с такими клиническими проблемами, как взаимодействие лекарств, влияние возраста, заболеваний печени, половых различий и др. Однако данные [231] о различной заболеваемости раком печени у жителей Китая, эндемичных по распространенности афлатоксинов, свидетельствуют о том, что это дело недалекого будущего.

### 3.3. Подсемейство CYP2C

История данного подсемейства также начинается с открытия полиморфизма 4'-гидроксилирования S-мефенитоина [177, 232]. Среди североамериканцев и европейской популяции количество медленных метаболизеров составляет 2 - 5%, среди японцев достигает 20% [233]. Субстратами этого подсемейства являются диазепам [234], гексобарбитал [235], мефобарбитал [236], толбутамид [237], тиениловая кислота [238], пропранолол [239].

В 1986 г. из микросом печени человека были изолированы два белка, названные P450 MP-1 и P450 MP-2 с Mr 50000 и 48000, обладавшие мефенитоингидроксилазной активностью и сходные по своим спектральным, хроматографическим свойствам, K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub> и N-концевой последовательности, кросс-реагирующие с поликлональными антителами. Трансляция *in vitro* изолированной из печени РНК указывала на то, что эти белки кодируются различной мРНК [240].

Скрининг поликлональной антисывороткой кролика к P450 MP-1 библиотеки индивидуальной комплементарной ДНК, сконструированной в системе бактериофага g11, выявил несколько иммунопозитивных клонов, из которых затем был изолирован и секвенирован клон кДНК, названный MP-8, кодирующий P450, осуществляющий 4'-гидроксилирование S-мефенитоина [241]. С использованием этого клона была проведена оценка геномной ДНК нескольких индивидов, которая показала, что новое семейство может включать по крайней мере 7 генов [242]. Позднее в этой лаборатории были дополнительно выделены клон MP-4, сходный с MP-8, и сходные между собой MP-12 и MP-20. Аминокислотная последовательность, дедуцированная из клона MP-8, соответствовала таковой у P450 MP-1 и P450 MP-2 [240]. Белок, соответствующий по своей аминокислотной последовательности клону MP-20, также удалось получить в высокоочищенном состоянии. Он был назван P450 MP-3 и обладал

низкой мефенитоин-4'-гидроксилазной активностью, которая, вероятно объяснялась загрязнением P450 MP-1 [242]. Было показано также, что все три гена - MP4, MP-8 и MP-20-транскрибируются в большинстве образцов печени человека, уровни мРНК варьируют некоординированно, а S-мефенитоин 4'-гидроксилазная активность не коррелирует ни с одной из этих мРНК. Следовательно, генетический полиморфизм не был связан с этими генами.

С получением моноклональных антител, распознающих только P450 MP-1, было показано отсутствие взаимосвязи между количеством этого белка и S-мефенитоин 4'-гидроксилазной активностью в микросомах печени человека. Авторы расценили это как свидетельство в пользу того, что причиной генетического полиморфизма является экспрессия структурно дефектного белка [243].

Позднее был клонирован ген CYP4502C10. Продукт этого гена, экспрессированного в дрожжевых клетках *Saccharomyces cerevisiae*, катализировал метил-гидроксилирование толбутамида и 3'-гидроксилирование гексобарбитала, но не 4'-гидроксилирование мефенитоина. P450 2C10 осуществлял также 5-гидроксилирование тиениловой кислоты. Белок, полученный из микросом печени человека, эффективно катализировал 4'-гидроксилирование S-мефенитоина, но не толбутамида, имел N-концевую последовательность, идентичную P450 2C9, 2C10 MP-1 и MP-2. Следовательно, он являлся продуктом тесно связанного гена, но не генов CYP4502C8, C9 или C10 [186].

В 1991 г. были получены клоны двух новых генов этого субсемейства- ПС18 и ПС19 [244]. В 1993 г. удалось изолировать из образцов печени человека белок, у которого N-концевая последовательность совпадала с дедуцированной последовательностью кДНК CYP4502C19. Белок обладал S-мефенитоин 4'-гидроксилазной активностью. Его количество в 14 препаратах микросом печени человека варьировало в 10,5 раз вплоть до полного отсутствия и строго коррелировало с этой активностью. Авторы пришли к выводу, что именно данный белок ответствен за полиморфизм 4'-гидроксилирования S-мефенитоина [66].

Таким образом, сейчас исследователи располагают точными знаниями и о белке-носителе генетического полиморфизма, и о субстратной специфичности отдельных форм цитохрома P450 субсемейства 2C. Однако подавляющая часть информации касается лекарств и возможной роли этого семейства в патологии печени, индуцированной лекарствами. Относительно роли данного семейства в биотрансформации промышленных ксенобиотиков известно гораздо меньше. В доступной нам литературе мы нашли только информацию относительно 7,12-диметилбензантрацена, бензо[а]пирена и нитрозодиметиламина [13], но ведущую роль в отношении каждого из этих субстратов играют другие формы цитохрома P450 человека.

Большой интерес представляет тот факт, что, несмотря на генетический контроль, активность 4'-гидроксилирования S-мефенитоина возрастает под влиянием рифампицина у быстрых метаболизаторов в 1,4 - 2,8 раза, а у медленных не меняется [245]. Под влиянием рифампицина и пентобарбитала меняется метаболизм других лекарств-субстратов субсемейства P450 2C [246, 247].

### 3.4. Подсемейство CYP2B

Изучение этого подсемейства, наряду с подсемейством 1A, у экспериментальных животных привело к открытию множественности форм цитохрома P450 (ФБ-индуцируемый цитохром). На уровне белка у человека представлено P450 2B6. В своей субстратной специфичности эта форма во многих случаях перекрывается формами субсемейств P450 3A и P450 2C. Это справедливо в отношении барбитуратов, бензодиазепинов. Высокоспецифичными реакциями является депентилирование пентоксирезоруфина, но это нелекарственный препарат [108], и 16- $\beta$ -гидроксилирование андростендиона [248]. Перекрываются в отношении этих подсемейств также эффекты индукторов, таких как барбитураты, стероиды, рифампицин. Этим обусловлены большие трудности в выборе тестовых лекарств для данного подсемейства.

ва. На эту роль может претендовать лишь N-деметилование триметадиона [249], но метаболизм этого лекарства еще не изучен достаточно подробно. Участие данной формы P450 в метаболизме AFB1 [250] и ряда противоопухолевых лекарств с образованием реактивных метаболитов [251], индуцибельность делают оценку его специфической активности у человека актуальной задачей.

### 3.5. Подсемейство CYP2D

У человека представлено цитохромом P450 2D6. Начало исследованиям этого подсемейства положило сообщение о полиморфном 4-гидроксилировании дебризоквина [176]. В настоящее время является наиболее изученным видом полиморфизма цитохрома P450. Обследованы более 5000 человек, выявлены этнические различия в частоте встречаемости медленных метаболитов [252]. Изучены варианты повреждения гена, приводящие к нарушению синтеза белка и дефициту дебризоквин-6-гидроксилазной активности [30, 253]. Выявлен феномен сверхбыстрого метаболизма дебризоквина [254].

Установлена роль P450 2D6 в метаболизме нескольких десятков лекарственных препаратов, в числе которых антидепрессанты, антигипертензивные, б-блокаторы, антиаритмические и др. [255]. Показана консервативность этого цитохрома по отношению к индукторам монооксигеназной системы. Нелекарственные ксенобиотики-субстраты и ингибиторы этого цитохрома изучены недостаточно [262]. Знания о его роли в метаболизме эндогенных соединений пока еще тоже ограничены.

В связи с этим в экологическом мониторинге данной форме цитохрома P450 пока не придается значения, но широко исследуются взаимосвязи данного вида полиморфизма с различной патологией онкологическими заболеваниями разной локализации [35, 257], психическими расстройствами, болезнью Паркинсона [258, 259] и др. Методические проблемы в оценке активности P450 2D6 решены давно, обширен список лекарств, которые можно применять в качестве тестовых. В качестве доступного с этой целью препарата у нас можно отметить пахикарпин [260].

### 3.6. Подсемейство CYP2E

Единственный представитель этого подсемейства у человека P450 2E1 впервые изолирован в неактивной форме в 1986 г. из микросом печени человека с помощью антител к этанол-индуцируемой форме P450 крысы [33]. Активный фермент был получен чуть позже двумя независимыми группами исследователей [261, 262]. Известно большое количество ксенобиотиков-субстратов P450 2E1, среди которых этанол [75], анилин [261, 262], парацетамол [263], нитрозодиметиламин [264], а также проканцерогены трихлорэтилен, метилхлорид, этилендихлорид и этилендибромид, 1,2-дихлорпропан, 1,1,1-трихлорэтан [265]. В микросомах печени кролика и крысы эта форма является главной в окислении первичных спиртов в альдегиды, N-окислении пиридина, гидроксилировании бензола и последующем гидроксилировании фенола в гидрохинон, одноэлектронном восстановлении четыреххлористого углерода [266]. Эти субстраты, а также ацетон, изониазид, трихлорэтилен являются индукторами фермента [267]. Показано на экспериментальных животных, что голодание также приводит к индукции P450 2E1 [186].

В 1990 г. выявлена высокоспецифичная реакция P450 2E1 - 6-гидроксилирование хлорзоксазона - миорелаксанта центрального действия [268]. В 1993 г. предложен достаточно простой и удобный метод оценки активности CYP2E1 у человека по отношению 6-гидрокси-хлорзоксазон/хлорзоксазон в сыворотке крови. По данным авторов, через 1,5 ч после приема лекарства это отношение было в 3 раза выше в группе алкоголиков, чем в кон-

трольной группе [269]. Немного позднее были опубликованы данные об участии CYP1A1 и A2, CYP2C9 и CYP3A4, экспрессированных в дрожжевых клетках, в 6-гидроксилировании хлорзоксазона [270]. Согласно этим результатам, молекулярная активность CYP2E1 превосходила таковую у CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9 и CYP3A4 соответственно в 10, 1250, а двух последних форм - в 417 раз. Однако в микросомах печени крыс, обработанных индукторами субсемейства CYP1A, хлорзоксазон-6-гидроксилазная активность совпадала с таковой при обработке крыс индукторами CYP2E1. На основании полученных результатов авторы делают вывод о том, что использовать хлорзоксазон для оценки активности CYP2E1 следует с осторожностью.

Ранее предпринимались попытки использовать для оценки активности CYP2E1 *in vivo* реакцию гидроксилирования ацетона в ацетол, в том числе в нашем институте [271, 272]. Однако возможность использовать эту реакцию появляется только в тех ситуациях, когда усиливается продукция кетонных тел (диабет, голодание).

Очевидно, что индуцибельность фермента, его участие в метаболизме токсических соединений и проканцерогенов, будут стимулировать исследователей к разработке высокоспецифичных фармакокинетических тестов для оценки активности этого цитохрома. Несомненно также, что в исследованиях CYP2E1 будет расширяться применение молекулярно-биологических методов, поскольку выявлен полиморфизм гена этого цитохрома у человека [273].

### **3.7. Комплексная оценка индивидуальных форм цитохрома P450 с использованием тестовых лекарств**

Специфичность молекулярных форм цитохрома P450 в метаболизме лекарств создает принципиальную возможность одновременной оценки их активности с помощью набора тестовых лекарств. D. Breimer и руководимые им исследователи, первыми начавшие разрабатывать такой подход, назвали его "cocktail" strategy" [274]. При этом необходимо соблюсти фармакологическую совместимость выбранных лекарств и свести к минимуму конкурентные взаимоотношения. Преимущества такого подхода состоят в том, что он сокращает время обследования, исключает возможную интраиндивидуальную вариабельность активности ферментов биотрансформации ксенобиотиков в динамике длительного обследования и обеспечивает возможности корреляционных оценок путей метаболизма лекарств.

Дополнительные трудности, которые возникают при использовании коктейля, заключаются в усложнении аналитических процедур, обусловленных увеличением числа анализируемых соединений в одном биологическом образце. Уже применявшиеся этими авторами коктейли включали в свой состав антипирин, гексобарбитал и теофиллин в одном случае [201], и нифедипин, спартеин, мефенитоин и антипирин - в другом [275]. Мы в своей работе используем коктейль из антипирина (для оценки монооксигеназных активностей) и сульфадимезина (для оценки N-ацетилтрансферазы) [205]. Известно применение коктейлей в составе дебризоквин/сульфаметазин [276] и декстрометорфан/кофеин [277].

Вероятно, аналогичную информацию можно было бы получать и в случае региоспецифичного метаболизма некоего субстрата большим количеством индивидуальных форм цитохрома P450. Среди лекарств в этой связи можно отметить варфарин и циклоспорин А, для которых показано большое количество метаболитов [186, 278], а среди физиологических соединений - гидроксилирование тестостерона или андростендиона в разных положениях [217]. К сожалению, перекрывание форм P450 выявлено и для большинства парциальных реакций с этими субстратами [179, 279]. Поэтому такая возможность остается теоретической.

Нам представляется, что дальнейшее развитие этого подхода будет заключаться в увеличении числа высокоспецифичных лекарств, составляющих коктейль, в сочетании с анализом

метаболитов физиологических соединений, для которых будет показана исключительная роль какой-либо индивидуальной формы цитохрома P450.

Завершая рассмотрение материала, считаем необходимым подчеркнуть, что неинвазивная оценка ферментов биотрансформации с помощью тестовых лекарств сделала возможным массовые исследования на человеке. Опыт этих исследований показывает, что данный подход адекватно отражает взаимосвязь окружающей среды и активность системы биотрансформации ксенобиотиков, что можно было ожидать на основе исследований экспериментальных животных. Этот факт делает перспективным его использование в изучении заболеваний, обусловленных влиянием экологических факторов.

#### Глава 4. ФЕРМЕНТЫ I-ой И II-ой ФАЗЫ МЕТАБОЛИЗМА КСЕНОБИОТИКОВ И ХИМИЧЕСКИЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Ежедневно человек вступает в физический контакт с различными химическими канцерогенами, включая ПАУ, ароматические амины и нитрозамины. Их источниками являются табачный дым, медпрепараты, загрязнения в пище и окружающем воздухе, на работе и в быту. Негативными последствиями воздействия химических факторов среды могут быть онкологические болезни. По современным представлениям, они участвуют в 80-90% всех случаев рака [280]. Однако само пребывание человека в неблагоприятных условиях не обуславливает неизбежное заболевание. При изучении этиологии рака необходимо рассматривать все возможные факторы, которые могли бы привести к этой злокачественной болезни.

Важно подчеркнуть, что факторы, способствующие этому процессу, реализуются в человеческой популяции с высокой степенью вариабельности. В некоторых случаях один из факторов может быть преобладающим, например, высокая встречаемость рака мочевого пузыря у рабочих, контактирующих с 2-нафтиламином [281]. В других - ситуация не столь однозначна. Речь идет о смеси реагентов, которые могут присутствовать в различных концентрациях и их воздействие на организм человека может осуществляться разными механизмами. Исследование химического канцерогенеза должно включать совокупность всех факторов риска при экспозиции химическими канцерогенами.

Известно, что биохимический механизм действия химических канцерогенов различен [282]. Лишь некоторые из бытовых и промышленных загрязнителей, как например, оксид этилена, способны к непосредственной ковалентной модификации белковых молекул в живых организмах. Более чем 75% от числа известных канцерогенов обладают генотоксическим действием, повреждая ДНК через ковалентное связывание электрофильных фрагментов нативной молекулы ксенобиотика, либо образующихся в реактивном метаболите\* после ферментной активации, с нуклеофильными центрами в ДНК.

Большинство генотоксикантов, проявляющих способность образовывать ковалентные аддукты с ДНК, так называемые проканцерогены активируются основными путями:

а) одностадийное образование электрофильных промежуточных продуктов с участием Фазы I, как например образование оксида хлорэтилена из хлористого винила;

б) комбинация нескольких процессов с помощью ферментов Фазы I, например, многостадийное образование диолэпоксида бензо[а]пирена через 7,8-эпоксидование, ферментный гидролиз последнего до диола и 9,10-эпоксидование;

в) сочетание реакций с участием ферментов как Фазы I, так и Фазы 2. Так, сафрол сначала гидроксилируется монооксигеназами в 1'-положение, затем образуется сульфатный конъюгат, который и оказывается истинным канцерогеном.

В тех случаях, когда метаболическая активация проканцерогена приводит к образованию более чем одного электрофильного метаболита, относительный вклад каждого из них в общий канцерогенный эффект зависит от различных факторов: относительная доля образования данного электрофильного метаболита, его "жесткость", определяющаяся хими-

---

\* Реактивным метаболитом называют продукт ферментной реакции, электрофильный по природе, способный повреждать внутриклеточные макромолекулы (как несущие генетическую информацию, так и выполняющие структурную функцию), приводя тем самым к появлению токсических, канцерогенных и мутагенных эффектов [283].

ческой природой, а также наличие в системе нуклеофильных соединений (например, глутатиона), способных защитить ДНК от атаки электрофила.

Активация большинства проканцерогенов происходит с участием оксидаз, локализующихся, как правило, в эндоплазматическом ретикулуме. Одна из этих систем, флавиносодержащая монооксигеназа (иногда называемая аминоксидазой смешанных функций) (MFAO) проводит двухэлектронное окисление ксенобиотиков, как следует из ее второго названия, предпочтительно вторичных и третичных аминов. Ксенобиотики могут также окисляться простагландин Н синтазой (PHS), основной биологической функцией которой в организме является окисление арахидоновой кислоты в простагландин Н. Как было показано в экспериментах *in vitro*, эта система может осуществлять одноэлектронное окисление бензо[а]пирена, бензидина, 2-аминофлуорена, 2-нафтиламина и других проканцерогенов. Все эти реакции могут быть воспроизведены действием на упомянутые ксенобиотики  $H_2O_2$  в присутствии пероксидазы хрена. Однако роль как MFAO, так и PHS в процессах активации проканцерогенов *in vivo* остается спорной. Полагают, что в живом организме активация проканцерогенов этими ферментами, в частности, PHS, может протекать в тех экстрапеченочных тканях, где PHS существенно превосходит по активности цитохром P450 зависимые монооксигеназы [283].

Основной фермент, осуществляющий окислительную активацию проканцерогенов - цитохром P450 [284]. К канцерогенам, активируемым P450, в первую очередь отнесены ПАУ, ароматические амины, нитроароматические амины, нитрозоамины, гидразины, афлатоксины и галогенированные углеводороды. Эти классы соединений вызывают рак у экспериментальных животных. Более того, существуют доказательства, что ПАУ, нитроароматические углеводороды и афлатоксин играют существенную роль в генезисе некоторых форм рака у человека [41, 4]. Этот процесс, осуществляемый через модификацию ДНК, мутацию и/или превращения в неоплазме, и является тем общим, что объединяет процессы химического канцерогенеза [41, 284, 285].

Для ПАУ общим механизмом образования аддуктов с белками и нуклеиновыми кислотами служит окисление этих соединений либо их метаболических продуктов в реактивные эпоксиды, которые способны взаимодействовать с нуклеофильными центрами в ДНК, альбумине или гемоглобине. Подобно образует аддукты и афлатоксин В1, который метаболизируется микросомальными монооксигеназами в реактивный 8,9-эпоксид.

Ароматические амины и амиды образуют аддукты с белками, главным образом, ковалентным связыванием аминного или амидного атома азота с  $C_8$  атомом гуанина, а минорные аддукты - реакцией между атомами углерода, соседними с аминным или амидным азотом, с экзоциклическими атомами азота или кислорода гуанина и аденина. Связыванию ароматических аминов с белковыми молекулами способствует промежуточное образование в результате окисления монооксигеназами N-гидроксиариламинов, которые либо образуют аддукты с ДНК, либо далее окисляются в эритроцитах до нитрозоаренов, реагирующих с гемоглобином.

Диалкилнитрозамины, среди которых компоненты табачного дыма, N'-нитрозонорникотин и 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон, подвергаются а-гидроксилированию по соседнему к нитрозированному азоту атому углерода с образованием нестабильных производных. Последние разлагаются до алкандиазогидроксидов  $AlkN=NOH$ , которые далее алкилируют в основном фосфорсодержащие соединения и гуанин по атому  $N_7$ , но удалось доказать, что наибольшим туморогенетическим потенциалом обладают продукты алкилирования экзоциклического атома кислорода.

Связывание канцерогена или его электрофильного метаболита с белками, как правило, высокорегииоспецифично для последних и определяется как природой функциональной группы, реагирующей с лигандом, так и ее пространственной ориентацией.

#### 4.1. Применение экзогенных продуктов аддуктов биологических макромолекул в биомониторинге

За последнее десятилетие в разработке высокочувствительных методов регистрации аддуктов канцерогенов с белками был достигнут значительный прогресс, что сделало возможным определение содержания аддуктов с белками в различных тканях у людей. Его главная цель - оценка риска нахождения людей в условиях экспозиции. Это требует эпидемиологических исследований на молекулярной основе, которые устанавливают надежные качественные и количественные соответствия между биомаркерами и вероятностью заболевания раком. Ниже делается попытка обзора современных методов определения аддуктов и экспериментальных стратегий для получения точных количественных и качественных данных, нужных для включения этой методологии в онкологическую эпидемиологию.

На модельных объектах показано, что количество аддуктов, образованных канцерогенами, может служить мерой экспозиции, т.е. количественными индикаторами биологически эффективных доз этих канцерогенов. Разработка методов измерения аддуктов ДНК привела к созданию техники, обладающей достаточной чувствительностью для работы с человеческими образцами. Уровни определяемых аддуктов лежат в диапазоне от 0,3 до 605107 аддуктов на нуклеотидное основание (а/н), что соответствует уровню от десятков до тысяч аддуктов с ДНК на клетку.

В настоящее время для мониторинга аддуктов ДНК у людей применяют несколько методов, основные из которых: 1) иммунохимические, использующие для опознания, а также для количественного отделения аддуктов на связанных с ферментами иммуносорбентах моно- и поликлональные антитела; 2) метод послемечения  $^{32}\text{P}$ , основанный на ферментном введении в нуклеотиды высокой специфической радиоактивности [ $^{32}\text{P}$ ]; 3) тандем газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ/МС), обычно включающий в себя отщепление аддуктообразующего канцерогена от ДНК, его дериватизацию, хроматографическое разделение и собственно анализ молекулярного иона, для количественного измерения используют аутентичный внутренний стандарт.

Метод иммуноферментного анализа (ELISA) обычно используется в тех случаях, когда не нужно или невозможно применение радиоактивных субстратов; обладает высокой чувствительностью и легко может быть использован для довольно значительного числа аддуктов. Для выполнения анализа с хорошо подготовленными антителами обычно достаточно 50 мкг интактной ДНК на пробу, при этом определяются уровни аддукта  $1/10^8$  нуклеотидов. Чувствительность метода можно поднять до почти теоретической, если до анализа сконцентрировать этот аддукт каким-либо хроматографическим методом.

Главным преимуществом метода является его высокая специфичность для канцерогенов или классов канцерогенов. Поскольку иммуноанализ обычно имеет дело с антителами, специфичными для нескольких химикатов в пределах химического класса, без предварительного разделения аддуктов многие из них реагируют с антителом с разной специфичностью. При этом конечный результат, полученный по смеси аддуктов, не отражает реальной концентрации ни определяемого аддукта, ни суммы всех аддуктов.

Специфические примеры этого подхода обсуждаются ниже. В различных работах по исследованию образования аддуктов в человеческих популяциях применяют антитела, полученные *in vitro* модификацией ДНК эпоксидом БПДЭ-1. Сразу было найдено, что эти антитела обладают высокой специфичностью для аддукта БПДЭ-1-ДНК и не опознают свободный бензо[а]пирен, немодифицированную ДНК и ряд прочих аддуктов ДНК с канцерогенами [286]. Позже, когда стали доступными диолэпоксиды ряда других ПАУ, обнаружено, что антитела, специфичные для аддукта БПДЭ-1-ДНК, дают кроссреактивность с рядом других ПАУ диолэпоксидов с подобной либо с в 10-100 раз меньшей чувствительностью [287]. Таким образом, когда эти антитела использовали в мониторинге человеческих популяций, подвергавшихся экспозиции сложными смесями ПАУ, специфичность обнаружения искажалась.

Поздние исследования также продемонстрировали различия в аффинности антител [288]. С высокомодифицированной ДНК достигали более высокой аффинности (1,2 аддукта на 100 нуклеотидов), чем с низко модифицированной ( $1,5 \cdot 10^6$ ).

Антитела, опознающие БПДЭ-1-ДНК, используются также в иммунохимических работах для локализации образования аддуктов в специфических типах клеток и тканей. Чтобы увеличить чувствительность окрашивания, срезы обычно обрабатывают РНазой для исключения потенциальной кроссреактивности с аддуктами РНК, протеиназой К для отделения некоторых белков, увеличивая тем самым специфичность антител к аддуктам, и для того же денатурируют ДНК кислотой или основанием. Такой подход использован для демонстрации образования аддуктов в коже у больных псориазом, подвергнутых лечению дегтем [289].

Рядом исследователей отмечено занижение количества аддуктов с ДНК, в частности, с использованием антисыворотки против БПДЭ [288].

Среди модификаций метода - радиоиммунный анализ (USERIA и RIA), а также метод с использованием биотина-стрептавидина.

Другим методом для определения канцерогенных аддуктов ДНК является  $^{32}\text{P}$ -послемечение [290]. Образцы ДНК расщепляют микрококковой эндонуклеазой и эндонуклеазой селезенки до дезоксирибонуклеозид-3'-монофосфатов как нормальных нуклеотидов, так и связанных с аддуктами. Затем следует мечение 5'-позиции [ $^{32}\text{P}$ ] АТФ и Т4полинуклеотидкиназой с образованием дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфатов. При недостатке АТФ аддукты ароматических канцерогенов в сравнении с нормальными нуклеотидами предпочтительно метятся киназой. ТСХ на полиэтиленимин-целлюлозе отделяет нормальные нуклеотиды от связанных с аддуктами. Хроматография в растворителях, содержащих мочевины, позволяет разделять аддукты различных соединений. Образцы обнаруживаются автордиографией и могут быть посчитаны по Черенкову.

После публикации оригинальной методики разработано две модификации для существенного повышения чувствительности метода. По одной из них для отделения гидрофобных аддуктов расщепленную ДНК экстрагируют бутанолом [291]. Экстрагированные аддукты метятся в условиях отсутствия большого избытка нормальных нуклеотидов, что повышает чувствительность метода. Во втором методе используют тот факт, что нормальные нуклеотиды расщепляются нуклеазой Р1 легче, чем связанные с аддуктами [292]; значит, еще до мечения образец можно обогатить аддуктами. Интересно, что первый из этих методов облегчает обнаружение аддуктов из ПАУ и ароматических аминов, в то время как расщепление нуклеазой Р1 обнаруживает аддукты ДНК с ПАУ, но не с ароматическими аминами [293]. Таким образом, сравнительное использование этих методик может дать качественную информацию о природе аддуктов.

Достоинствами метода послемечения ДНК является более высокая чувствительность ( $1 \cdot 10^8$ - $1 \cdot 10^{10}$  нуклеотидов, примерно в 70 раз выше, чем у иммунохимического метода) и небольшое количество ДНК (1 - 50 мкг). Еще одно преимущество - возможность обнаружения аддуктов, образующихся при экспозиции сложными смесями, в которых трудно установить соединение, повреждающее ДНК.

С другой стороны, невозможно определить содержание аддуктов неустановленной природы и строения из-за незнания эффективности их мечения, а получить эти характеристики непросто из-за малого их количества. Кроме того, некоторые аддукты могут быть устойчивы к их расщеплению или мечению. Обычно используемые системы ТСХ плохо применимы для алкилированных аддуктов, которые могут двигаться с фронтом нормальных нуклеотидов. Все это может приводить к занижению реального уровня содержания аддуктов.

Однако разделение индивидуальных аддуктов ПАУ с ДНК из сложных смесей методом ТСХ часто бывает затруднено, так что разработано несколько методов для улучшения разделения  $^{32}\text{P}$  меченых аддуктированных нуклеотидов. Наиболее обещающим подходом, похоже, является использование ВЭЖХ, а также ее комбинация с масс-спектрометрией.

Существенное ограничение метода послемечения - и то, что точные качественные и количественные определения достигаются лишь при аутентичных аддуктах в качестве хроматографических стандартов. В некоторых работах пытались соотнести определяемое количество аддуктов (как  $^{32}\text{P}$ -меченых производных) к их реальному содержанию в тканях. Оказалось, что определяются далеко не все аддукты и доля определяемых аддуктов заметно варьируется в зависимости от химической природы последних. Например, определяется лишь 10-15% аддукта ДНК с флуорантеном [294], 35-45% 7-метилированного по гуанину [295], 60-80% с 1'-гидрокси-2',3'-дигидроэстраголом [296], 70% с БПДЭ [297] и 89-92% метилированного по  $\text{O}_6$ -гуанину [298].

Измерение возвращения аддуктов на каждой из стадий обработки показало, что основные потери происходят из-за неполного расщепления ДНК. Различные канцерогенные аддукты с ДНК отличаются по своей чувствительности к нуклеазе P1 [293]. Расщепление микрококковой нуклеазой и селезеночной фосфодиэстеразой, используемое в обычной процедуре  $^{32}\text{P}$ -послемечения, не обеспечивает количественного расщепления аддуктов по дезоксиаденозину [299]. В итоге любой из методов расщепления может привести к недосчету степени, с которой модифицируется ДНК. В самом деле, установлено, что во всех предыдущих определениях содержание аддуктов ПАУ с ДНК было заниженным [300]. Другими источниками потерь могут оказаться недофосфорилирование, неполное разложение аддукта и физические потери во время хроматографии и экстракции [294, 295]. С использованием аутентичных стандартов аддуктов можно оптимизировать эффективность каждой из стадий [294]. Полученные таким образом поправки можно применять для пересчета в реальное содержание аддуктов.

Несмотря на ограничения, метод  $^{32}\text{P}$ -послемечения наиболее приемлем для определения содержания аддуктов, образующихся в тканях людей, подвергшихся экспозиции сложными смесями органических соединений. Для полномасштабного применения этого метода в эпидемиологических исследованиях необходима дальнейшая работа по стандартизации, устранению системных ошибок и повышению чувствительности. А в будущем, объединенный с новыми инструментальными возможностями (например, лазер-сканирующей микроскопией) этот метод должен обеспечить новый уровень в измерении аддуктов в тканях человека.

Для разработки чувствительных методов определения некоторых канцерогенов, включая бензо[а]пирен и афлатоксин В1, использованы их флуоресцентные свойства. Метод SFSS был применен для оценки образования аддуктов бензо[а]пирена с клеточными макромолекулами [301]. После денатурации выделенного белка NaI и сорбции ДНК на силикагеле измеряли содержание тетролов бензо[а]пирена, образующихся после кислотного гидролиза аддуктов. В этом методе длины волн как возбуждения, так и эмиссии, сканировались с фиксированным различием в длинах волн в 34 нм. Для тетролов бензо[а]пирена во флуоресцентном спектре появляется одиночный пик при 380 нм. Для определения обычно требуется 100 мкг ДНК, чувствительность метода  $3,5 \times 10^7$  а/н.

Для изучения содержания аддуктов в моче африканцев, употребляющих пищу с высоким содержанием афлатоксина, использовали модификацию метода, связанную с предварительной экстракцией SepPak и очисткой ВЭЖХ [302]. Метод SFSS был применен также после предварительного обогащения смеси аддуктами иммуноаффинной хроматографией на колонке с моноклональными антителами против БПДЭ-деоксигуанозина [303].

Для обнаружения алкилированных аддуктов у людей применяли технику тандема ГХ/МС [304]. Сначала выделяют из ДНК аддукты, которые затем для придания летучести и повышения термостабильности дериватизируют. Значительное количество атомов галогенов в аддукте увеличивает чувствительность метода до фемтограмм [305]. Для получения количественных результатов пользуются внутренними стандартами, мечеными стабильными изотопами. Например, дериватизация пентафторбензилбромидом облегчает определение полярных соединений газовой хроматографией с детектором электронного захвата, либо с масс-спектрометрическим определением с детектором отрицательной химической ионизации.

Этот метод использовали для определения 04-Et-Thy с чувствительностью 27 фг [306]. 3-Me-Ade дериватизовался N-(трет-бутилдиметилсилил)-N-метилтрифторацетаминном и определялся масс-спектрометрически с использованием счетчика одиночных ионов и меченого дейтерием 3-Me-Ade в качестве внутреннего стандарта.

Этот метод обычно применяют для определения аддуктов ДНК у человека, появившихся в результате его контакта с 4-аминобифенилом, ПАУ и алкилирующими агентами. Он обладает высокой селективностью и чувствительностью ( $1 \cdot 10^8$  а/н), но его использование в рутинном биомониторинге может быть ограничено относительно высокой стоимостью оборудования и значительным количеством ДНК, необходимым для анализа.

Несмотря на высокую чувствительность применяемых в анализе методов, возникают трудности с определением аддуктов ДНК с такими соединениями, как пищевые белковые пиролизаты (амины IQ, PhIP и MeIQx), потребление которых составляет величину порядка нескольких нанограммов на 1 кг живого веса. Возможно, эту проблему удастся решить при помощи разрабатываемого метода ускоренной масс-спектрометрии, основанного на измерении природных радиоактивных изотопов, таких как  $^{14}\text{C}$ . Эта техника позволяет достичь в экспериментах чувствительности порядка  $10^{11}$ - $10^{12}$  а/н [307].

Для корректного анализа экспозиции человека канцерогенами важен выбор ткани, содержащей модифицированную аддуктом ДНК. Очевидно, что наличие аддуктов будет определяться совокупностью условий, решающие из которых - локальная экспрессия изоформ P450, активирующих проканцерогены, возможность переноса чужеродных соединений и их активных метаболитов в данную ткань, а также тканеспецифичность в процессах репарации модифицированной ДНК. Так, при изучении ксенобиотического воздействия табачного дыма на курильщиков аддукты ПАУ с ДНК обнаруживали во всех исследованных тканях, которые обычно рассматриваются как целевые органы для индуцированных курением раковых заболеваний. Уровни этих аддуктов соответствовали числу выкуриваемых сигарет [308, 309]. В работе [310] методом  $^{32}\text{P}$ -послемечения определяли аддукты ПАУ с ДНК как в целевых, так и в нецелевых клетках и тканях, включая кровяные лимфоциты, ткани плаценты, смыв легочных клеток и сперму у курящих и некурящих. Показано, что максимальная разница в содержании аддуктов была в сердце (x5,1), затем в легких (x3,0). В лимфоцитах и плаценте различия в содержании аддуктов были менее заметны (x2,0), а в сперме вовсе отсутствовали.

Полезным нецелевым источником ДНК могут быть бронхоальвеолярные макрофаги, полученные из бронхиальных смывов: 85% обследованных курильщиков в образцах легочных альвеолярных макрофагов содержали аддукты БПДЭ с ДНК, в то время как у некурящих и бывших курильщиков аддукты не определялись [311].

Однако для определения содержания аддуктов не всегда можно отобрать целевые ткани для неинвазивного биомониторинга, поэтому особенно интересна работа с такими суррогатными тканями, как белые кровяные тельца, в частности, периферические кровяные лимфоциты.

В работе [312] для определения воздействия на рабочих промышленного канцерогена 4,4'-метиленис(2-хлоранилина) было предложено использовать содержание его аддуктов с ДНК в отслоившихся клетках эпителия стенок уретры в качестве эффективного неинвазивного метода биомониторинга.

$^{32}\text{P}$ -послемечение применяли также для анализа содержания аддуктов в ДНК, выделенной из клеток слизистой ротовой полости [313] и костного мозга [314]. Но если персистенция аддуктов в целевых тканях существенно отлична от суррогатных тканей, то корреляций провести нельзя. В [315] возможность использования белых кровяных телец как нецелевого источника ДНК была поставлена под сомнение. Также не найдено соответствий между уровнем аддуктов ПАУ в легких человека и белых кровяных тельцах [316]. Во всех изучаемых популяциях в содержании аддуктов ДНК наблюдались существенные межиндивидуальные различия.

Поскольку некоторые белки (например, гемоглобин и альбумин), более доступны, чем ДНК, они также могут быть предметом как химических, так и эпидемиологических исследований. Еще одно преимущество гемоглобина - долгое время его существования (120 дней) и наличие почти во всех органах, что в значительной степени позволяет пренебречь тканеспецифичностью в процессах метаболической активации ксенобиотиков и репарации белковых молекул.

Аналитические методы, использованные в этих исследованиях, весьма специфичны для соединений или классов соединений. Оксиды этилена и пропилена образуют N-гидроксиэтилвалин и N-гидроксипропилвалин соответственно, которые селективно расщепляются по модифицированному методу Эдмана [317]. Аддукты ароматических аминов расщепляются щелочью и образовавшиеся амины отделяют экстракцией, аддукты БПДЭ - ферментативным протеолизом и химическим гидролизом, а продукт - смесь тетрагидротетролов - выделяется иммуноаффинной хроматографией с моноклональными антителами. Аддукты афлатоксина определяют в виде лизинового остатка из гидролизованного альбумина после иммуноаффинной хроматографии [318, 319].

В работах [320, 321] показано убедительное соответствие между дозой поступающего в организм человека афлатоксина В1 и уровнем образующихся аддуктов с сывороточным альбумином. Аддукты с этим белком могут быть также полезны в идентификации пищевых пирилизатов - ароматических аминов [322]. Благодаря скорости и легкости выполнения определение аддуктов с альбумином является особенно подходящим для интенсивных эпидемиологических исследований.

В мониторинге экспозиции генотоксикантами используется также обнаружение в моче продуктов реакции канцерогенов с белками или нуклеиновыми кислотами. Этот метод позволяет в ряде случаев сравнением данных по содержанию аддуктов в целевых тканях и моче оценить активность репарационных систем. Для определения содержания в моче основных аддуктов с ДНК после экспозиции людей афлатоксинами использовали иммуноаффинную очистку, соединенную с регистрацией ВЭЖХ гуанинового аддукта афлатоксина В1 [323]. Этот метод позволял не только обнаружить до 0,1 мкг аддукта в дневном сборе мочи у людей с высоким уровнем экспозиции афлатоксином, но и был удобен для определения экскретированного метаболита - афлатоксина М1 - и неметаболизированного канцерогена. Экспозиция афлатоксином была также оценена у кенийцев, живущих в зонах с различной частотой рака печени, через содержание в моче аддукта с гуанином [302]. В этой работе наличие аддукта, определяемое ВЭЖХ в комбинации с SSFS, зарегистрировано в 12% собранных за длительный период 983 образцов. В обеих работах применена довольно заумная аналитическая инструментовка, которую трудно рекомендовать для рутинного мониторинга.

Измерено содержание 3-метиладенина в моче как индикатор действия метилирующих агентов на человека [304]. Диапазон значений содержания метилированных оснований у номинально неподвергшихся экспозиции особей, определенных тандемом ГХ/МС с использованием счетчика одиночных ионов после экстракции аддуктов на хроматографической колонке ХАД-2 и ВЭЖХ на обращенной фазе составил 4,5 - 16,1 мкг/день. Подобную процедуру применяли для определения в человеческой моче 3-Me-Ade, 7-Me-Guo и гидроксильированных пуринов 8-гидроксиаденина, 8-гидроксигуанозина и 7-метил-8-гидроксигуанина [324]. Для обогащения метилированных аминокислот при выделении их из мочи использовали иммуноаффинную колонку, приготовленную на кроличьей антисыворотке против 3-метиладенина, для определения последнего - метод ELISA с моноклональными антителами [325] и ГХ/МС [326]. Результаты, полученные в этих работах, коррелировали между собой.

По понятным причинам большинство работ по установлению количественных соответствий между концентрацией действующего канцерогена, содержанием его аддуктов с ДНК в организме и вероятностью возникновения мутаций или развития опухолевых процессов выполнялось на лабораторных животных.

Показали, что частота возникновения опухолей в печени мышей линейно зависела от концентрации 2-ацетиламинофлуорена (ААФ) в пище, тогда как подобная зависимость для рака мочевого пузыря была далека от линейности [327]. Изучение зависимости образования аддуктов ААФ с ДНК от подобной предобработки показало, что содержание аддуктов увеличивалось пропорционально с дозой в тканях как печени, так и мочевого пузыря, но уровни аддуктов в мочевом пузыре были в 2 - 4 раза выше, чем в печени. Таким образом, сам по себе высокий уровень аддуктов в мочевом пузыре не является необходимым для развития опухоли вплоть до критического значения потребляемого с пищей ААФ, равного 75 мг/кг пищи [328].

Добавление в пищу самцов другого канцерогенного амина-4-аминобифенила (АБФ) - приводило к пропорциональному увеличению аддукта ДНК в тех же органах [329]. Однако процент раковых опухолей в печени не превышал 10% при самых высоких дозах обработки, тогда как число опухолей в мочевом пузыре, начиная с концентрации АБФ в питьевой воде 25 ppm, линейно зависело как от доз, так и от содержания аддуктов в этой ткани [330]. У самок зависимость образования аддукта в печени от дозы была линейной до 75 ppm, затем обнаруживала перегиб, а для аддуктов в мочевом пузыре после дозы в 50 ppm вообще регистрировалось плато насыщения. Профиль зависимости числа опухолей в печени выходил на плато после дозы в 150 ppm, в то время как процент мышей с раком мочевого пузыря, начиная с этой дозы, даже уменьшался.

Подобные профили для содержания аддуктов в печени самцов крыс при обработке их афлатоксином В1 и N,N-диэтилнитрозамином от доз канцерогенов с большей или меньшей линейностью соответствовали таковым для вероятности возникновения опухолей в этом органе [331, 332]. Зависимость образования аддукта главного канцерогена табачного дыма, 4-(N-метил-N-нитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанона и числа опухолей в легких у самцов крыс были совершенно подобны: резкое увеличение до дозы 1 мг/кг веса, более плавное до 10 мг/кг и снова более крутое при высоких дозах [333].

Изучена взаимосвязь метаболической активации пищевых пиролизатов - гетероциклических аминов IQ, PhIP и MeIQx - в тестах Эймса на мутагенность и образования аддуктов у людей, крыс и обезьян [334]. Слабой активности микросом из печени обезьян в отношении активации аминов *in vitro* соответствовало низкое содержание аддуктов этих аминов во всех тканях этого же вида животных.

Если накопленные сравнительные данные по развитию опухолей и образованию аддуктов ДНК у животных моделей могут стать основанием для оценки человеческого риска, то из вышеописанных экспериментов следует ряд выводов.

Во-первых, при низком уровне доз у изученных моделей грызунов образование аддуктов ДНК всегда линейно по дозе; следовательно, у человека при хронической экспозиции низкими дозами канцерогенами можно ожидать линейных соответствий между дозой и образованием аддукта ДНК.

Во-вторых, у людей такой подход может работать, скорее всего, если упомянутая экспозиция постоянна по действию; следовательно, для достижения точности нужна надежная информация о предыстории обработок.

В-третьих, примерно половина из изученных моделей не имела опухолей, даже если при низких дозах экспозиции регистрировалось образование аддуктов - следовательно, для развития опухоли необходима реализация иных, кроме образования аддуктов, факторов.

В-четвертых, фармакокинетические эксперименты на животных показали, что скорости удаления аддуктов из организма грызунов, подвергающихся хронической экспозиции, отражаются в постоянном уровне аддуктов ДНК [335]; следовательно, нельзя не учитывать индивидуальных характеристик эпарации ДНК.

Изучение взаимосвязи содержания аддуктов с вероятностью возникновения опухолей в организме людей, подвергающихся действию загрязнителей среды в рабочих или бытовых условиях, в целом подтвердило сделанные на животных выводы.

Характерным примером действия сложных смесей загрязнителей на человека является курение и его последствия. Изучение содержания аддуктов в плацентарной ДНК - один из примеров применения метода  $^{32}\text{P}$ -послемечения в биомониторинге человека [336]. Эти аддукты были обнаружены у 16 из 17 обследованных курящих женщин, но только у четырех из 14 некурящих. Природу аддуктов установить не удалось, похоже, они соответствовали тем, которые образовывались в кожном покрове мышей после обработки конденсатом табачного дыма [337]. В другом исследовании уровень аддукта БПДЭ-1-ДНК ( $1107\text{a/н}$ ), определенный  $^{32}\text{P}$ -послемечением в плацентарных тканях, не зависел от статуса курения [338].

При изучении преимущественной локализации аддуктов в организме человека, максимальное их содержание ( $1\cdot 10^7\text{ a/н}$ ) зарегистрировано в легочной и сердечной тканях курящих [337, 339]. Диагональная зона радиоактивности в ТСХ, указывающая на значительное число аддуктов, была обнаружена в легочной ДНК курящих после ее обработки нуклеазой Р1. Содержание аддуктов ПАУ в образцах из эпителия мочевого пузыря составляло (после экстракции *n*-бутанолом и расщепления нуклеазой Р1)  $1,3\text{-}26,7\cdot 10^8\text{ a/н}$  вне зависимости от курения и наличия рака мочевого пузыря. В клетках респираторного тракта наблюдалась линейная корреляция между потреблением сигарет и уровнем аддуктов как в образцах ДНК из периферической легочной ткани [308], так и в клетках из бронхиального эпителия [313]. В последних зарегистрированы только аддукты с ПАУ, но почти отсутствуют аддукты с ароматическими аминами. Подобные же выводы сделаны при анализе ДНК из смывов бронхоальвеолярных клеток [340].

Аддукты ПАУ с ДНК обнаруживались и в белых кровяных тельцах (БКТ). Объединенная из лимфоцитов и моноцитов ДНК у курильщиков содержала  $4,38\text{+}4,29\cdot 10^8\text{ a/н}$  аддуктов, в то время как у некурящих  $-1,35\text{+}0,78\cdot 10^8$  [341]. Но в этой же работе показано, что только у части популяции БКТ являются тканью, подходящей для мониторинга генотоксичности при курении.

Продемонстрирована легкость обнаружения аддуктов БПДЭ в образцах ДНК, отобранных из легочной ткани и лимфоцитов больных раком легкого [342]. В более поздней работе в 6 из 21 опухолевых тканей обнаружены те же аддукты (от 0,2 до  $13,4\text{Г}10^7\text{ a/н}$ ). Однако по всей выборке автордиография хроматограмм ДНК из неопухолевых тканей легкого обнаруживала выраженную диагональную зону радиоактивности, которая, как правило, отсутствовала в больных тканях [343]. Корреляции между курением и наличием аддуктов в этих работах были невыраженными, но интересно, что курящие сигареты без фильтра имели максимальный уровень аддуктов. Аддукты ПАУ с ДНК, взятой из спонтанно абортивного материала, обнаруживались в 27% случаев в фетальной печени и в 42% случае в фетальных легких - но корреляций с курением не было [344].

Установлено линейное соответствие между содержанием аддуктов и продолжительностью курения [345]. Кроме того, содержание аддуктов у бросивших курить более чем пять лет назад, не отличались от характеристик некурящих. Анализ бутанольного экстракта после расщепления ДНК из соскобов трахеи обнаружил аддукты в диапазоне  $0,3\text{-}4,4\cdot 10^8\text{ a/н}$  у некурящих и  $0,3\text{-}12,4\cdot 10^8$  у курящих.

Были проанализированы образцы биопсии из эпителия мочевого пузыря от 48 человек, курящих и некурящих [346]. У всех людей довольно сложная картина аддуктов, но достоверного различия по группам не было. Не оказалось корреляции между количествами определяемых методом  $^{32}\text{P}$ -послемечения и наличием (в настоящем и прошлом времени) рака этого органа.

Однако если оценивать автордиографически уровень индивидуальных аддуктов после их хроматографического разделения на РЕИ-целлюлозе, то уровень одного из аддуктов у курящих в 2 раза достоверно выше, чем у некурящих. Эти данные в целом коррелировали с результатами [347], где содержание одного из аддуктов из эпителия мочевого пузыря, предположительно идентифицированного как производное 4-аминобифенила с деоксигуанозином, у курящих в 3-4 раза выше, чем у некурящих.

В работе [348] измерялось содержание метилированных аддуктов, являющихся результатом экспозиции N-нитрозодиметиламином, в плацентарной ДНК курящих и некурящих. По меньшей мере 1 мг ДНК переводили в деоксинуклеозиды, аддукт выделяли методом ВЗЖХ, а затем анализировали RIA. Уровень аддуктов колебался от 0,57 до  $1,6 \cdot 10^6$  а/н и не соотносился с курением.

Изучение наличия аддукта потенциального канцерогена мочевого пузыря 4-аминобифенила с гемоглобином у беременных женщин показало, что его содержание (184 пг АБФ на 1 г гемоглобина) у курящих было значительно выше, чем у некурящих (22 пг/г), причем у "пассивных" курильщиков число аддукта возрастало с увеличением концентрации табачного дыма в окружающей среде [349]. Эти соответствия между вдыханием табачного дыма и содержанием аддукта АБФ с гемоглобином подтверждают тезис об опасности курения в период беременности.

Сравнивая результаты анализа содержания аддуктов в тканях курильщиков и некурящих, полученные разными методами, можно утверждать, что различия в уровнях аддуктов в зависимости от статуса чаще всего не обнаруживаются при применении методов, основанных на регистрации определенного аддукта БПДЭ с ДНК - в экспериментах с антителами, приготовленными против +анти-БПДЭ, комбинации иммуноаффинной хроматографии и ВЭЖХ с методом SFSS, равно как тандема ГХ/МС. Применение  $^{32}\text{P}$ -послемечения, которое обладает общей специфичностью для всех ароматических аддуктов ДНК, позволяет регистрировать более резкие различия.

Однако, если судить по результатам образования аддуктов *in vitro* [310], в способности вызывать онкогенные последствия, в частности, легочную карциному, табачный дым значительно уступает загрязнителям атмосферы коксохимического завода и продуктам сгорания каменного угля и дизельного топлива.

В [350] иммунохимическим методом определяли аддукты ПАУ с ДНК в БКТ у работников коксохимической промышленности. Не было обнаружено корреляций между содержанием ПАУ, в частности, бензо[а]пирена, в воздухе и уровнем аддуктов в белых кровяных тельцах, но было соответствие между временем экспозиции и уровнем аддуктов ПАУ. Курение заметно повышало уровень этих аддуктов. Анализ методом SFSS определял меньшее число обладателей регистрируемого уровня аддуктов, чем USERIA (10 против 41 для коксохимиков) [351]. Поскольку во флюоресцентных спектрах большей части образцов, взятых у людей, наблюдаются широкие пики, обусловленные, вероятно, наличием многих аддуктов, данные с трудом поддаются количественной обработке.

Для определения содержания аддуктов ДНК в белых кровяных тельцах у металлургов, работников коксохимической и алюминиевой промышленности был применен метод  $^{32}\text{P}$ -послемечения с минимальным уровнем определения  $1 \cdot 10^7$  а/н. Обнаружены широкие межиндивидуальные вариации в содержании аддуктов у металлургов и коксохимиков - 40-50 раз от нижнего к верхнему уровню. В контроле такое соотношение значительно меньше.

Хотя состав и соотношение ПАУ, присутствующих в атмосфере алюминиевого завода, в принципе не отличается от загрязнений атмосферы коксохимического производства, ни SFSS, ни иммунохимический метод не смогли определить аддукты в БКТ работников алюминиевой промышленности. Однако применение метода  $^{32}\text{P}$ -послемечения дает положительный анализ аддуктов в периферических кровяных лимфоцитах и БКТ практически у всех обследованных работников, хотя и в этом случае средние значения содержания аддуктов ПАУ немногим отличались от значений, полученных в контроле [350].

Для проверки возможности образования аддуктов в бытовых условиях были обследованы две общины в китайском регионе Хуан Вей. В общине, где для отопления пользовались каменным углем, число случаев рака легкого (в расчете на 100 тыс. жителей) в 80 раз превышало значения в общине, использующей для отопления дерево [352]. И хотя содержание бензо[а]пирена в воздухе первой общины было больше в 5 раз, число определяемых его аддуктов с ДНК методом ELISA в плаценте женщин было практически одинаковым.

Методом  $^{32}\text{P}$ -послемечения определены уровни аддуктов в БКТ и тканях плаценты у женщин, часто имеющих дело с горящей древесиной [353]. Во всех плацентарных образцах, независимо от статуса, обнаружены аддукты неизвестной природы, но ни один из девяти найденных в плаценте аддуктов не был обнаружен ни у одной женщины в БКТ. Из этого результата следует, что экспозиция древесным дымом не вызывает образования заметного количества аддуктов, но все женщины из данной выборки подвергались экспозиции канцерогеном неизвестной природы.

А вот пищевая экспозиция играла важную роль в наличии аддуктов ПАУ, как показано при изучении четырех добровольцев, употреблявших приготовленное на угле мясо [354]. У двух из них обнаружено 3 - 6-кратное превышение содержания аддуктов над базовой линией, полученной перед месячным приемом пищи, содержащей значительно количество ПАУ.

Люди подвергаются действию нитрозаминов из различных источников - пищи, напитков, табака, косметики, резиновых изделий и т.п. В результате реакций в организме, как было показано выше, эти соединения обладают довольно неселективным алкилирующим действием, однако в последнее время появились основания считать, что наибольшим туморогенетическим потенциалом обладают минорные продукты алкилирования экзоциклического атома кислорода. Так, предположено, что значительная доля опухолей в легких мышей определяется G-C мутацией во втором основании кодона 12 гена K-ras, главным образом, из-за образования в этой позиции O<sub>6</sub>-метилгуанина [355].

Однако за исключением индукции рака полости рта у потребителей жевательного табака [356], нет определенных эпидемиологических доказательств о канцерогенности N-нитрозаминов у людей. Тем не менее, у экспозированных обнаруживали те же аддукты, что и у экспериментальных животных, например, N<sub>7</sub>- и O<sub>6</sub>-метилгуанин - в печени отравленных N-нитрозодиметиламином [357], O<sub>6</sub>-метилгуанин - в тканях желудка и кишечника у китайцев, больных раком кишечника [358]. Последний аддукт был также найден в небольшом количестве в некоторых тканях у европейцев, которые в меньшей степени подвержены риску рака пищевода, а повышенные уровни O<sub>4</sub>-этилтимина - в печеночной ДНК у больных раком печени [359]. Средние значения для больных раком печени были 3,99 аддукта O<sub>4</sub>-Et-dThy на 10<sup>7</sup> dThy, для больных прочими видами рака -  $5,35 \cdot 10^7$ , а в контроле значительно ниже ( $1,17 \cdot 10^7$ ).

В работе [304] моча, собранная у нормально питающихся людей, обнаруживала широкие вариации в уровнях содержания 3-Me-Ade со средним значением 9,5 мкг за сутки. Контроль качества пищи давал результатом снижение как экскреции аддукта до 0,63 мкг, так и вариативности. Эти данные дали основания для предположения, что 90% 3-Me-Ade, выделенного с мочой, не образуется в организме *in vivo*, а заносится туда с пищей. Если это верно, то полезность метода для измерения метилированных аддуктов у людей, потребляющих пищу, состав и качество которой не контролируются, сильно ограничена.

На настоящий момент, хотя у лабораторных животных обнаружена определенная закономерность между потреблением афлатоксина и развитием опухолевых процессов в печени (наряду с толстой кишкой, почками, поджелудочной железой и желчными протоками этот орган считается целевым для вызываемого AFB<sub>1</sub> канцерогенеза), для людей таких надежных эпидемиологических результатов не получено. Многие исследователи полагают, что решающую роль в появлении индуцируемых AFB<sub>1</sub> опухолей играет образование аддуктов с ДНК и действие последних на репрессирующий опухоли ген p53 с образованием там зон мутации [360]. Если это так, то белковые аддукты AFB<sub>1</sub> могут стать подходящими биомаркерами в определении потенциального человеческого риска.

Главным аддуктом афлатоксина B<sub>1</sub> с ДНК является нестабильное N<sub>7</sub> гуаниновое производное. Этот аддукт либо теряется при депуринации, либо через раскрытие имидазольного кольца превращается в стабильную персистентную форму. Моноклональные антитела, приготовленные против этой стабильной формы или самого афлатоксина, были использованы для мониторинга аддуктов ДНК иммунохимическим методом.

Уже первые эксперименты по связыванию афлатоксина с ДНК показали, что существуют значительные межвидовые различия, и метаболизм AFB1 у человека более приближен к процессам, происходящим у относительно устойчивых к действию этого канцерогена видов, например, хомячков, нежели у чувствительных крыс. Это наблюдение было подтверждено недавно при интенсивном исследовании содержания аддуктов AFB1 в тканях англичан [361]. Показано, что уровень аддуктов AFB1 с ДНК в целевых тканях по значению такой же, что и вызывающий в 40 - 50% случаев раковые опухоли у лабораторных крыс.

В ряде работ сравнивали содержание аддуктов AFB1 с ДНК в целевых органах у людей, живущих в развивающихся странах Африки и Юго-Восточной Азии, где традиционные источники питания - рис, бобы, орехи и т.п. - содержат значительное количество афлатоксина, с европейцами. И хотя обнаружена положительная корреляция между количеством потребленного афлатоксина B1 и случаями рака печени [362] и найдено вполне определенное соответствие между ежедневной дозой афлатоксина B1 и концентрацией сывороточных аддуктов с ДНК и содержанием аддукта по N<sub>7</sub> гуанина в моче [318], в целом уровень аддуктов, выделенных из опухолевых и неопухолевых тканей у больных раком печени жителей Тайваня, Китая, Кении, Уганды с одной стороны, и Чехословакии, Франции и Великобритании с другой, лежал в общих пределах 1-3·10<sup>6</sup> а/н. Этот факт заставляет предположить для европейцев наличие иных, пока неизвестных источников поступления афлатоксина в организм.

Как видно из вышеизложенного, обзриваемая область знания представляет из себя совокупность надежно установленных зависимостей типа дозозффект на лабораторных животных, разработанных точных методов для определения содержания аддуктов в биологических субстанциях и разнородных, труднокоррелируемых между собой результатов по определению уровней различных аддуктов у представителей различных человеческих популяций.

Основными проблемами при внедрении этих методов в широкомасштабный биомониторинг являются следующие.

Уровень повреждения ДНК, обусловленный воздействием вредных факторов окружающей среды на человека, относительно мал. Каждый из разработанных или разрабатываемых методов, в большей или меньшей степени, требует дорогостоящего оборудования и высокой квалификации исполнителей.

Имея в виду определение уровней аддуктов ДНК как меру экспозиции и чувствительности, нужно помнить, что все доказательства о взаимосвязи образования аддуктов и возникновения опухолей были получены в экспериментах на лабораторных животных. Многие канцерогены образуют сложные смеси аддуктов с белками, в частности, с ДНК, количественно мало различающиеся для чувствительных или устойчивых видов, в целевых или суррогатных тканях. Никто еще не показал соответствий между уровнем аддуктов и состоянием здоровья людей. Если как-то можно проводить корреляции между уровнем аддукта канцерогена с ДНК в целевом органе и онкологическим риском человека, то определение уровня аддуктов с белками в суррогатной ткани может быть применено только для оценки степени экспозиции человека этим канцерогеном.

Если пытаться использовать определение уровня аддуктов для оценки долговременного риска, то ситуация усложняется еще больше. Нет точного знания о мишени действия генотоксических аддуктов. Не разработаны неинвазивные методы отбора образцов из целевых органов и не получены надежные корреляции между содержанием аддуктов в целевых и суррогатных тканях. Наконец, разовые определения содержания аддукта дают мало информации о множественности и динамике действия канцерогенов на человека.

Некоторые образцы исследовались различными методами, и порой получались вполне противоречивые данные. Эти противоречия, скорее всего, обусловлены различиями в специфичности каждого метода и есть надежда, что по мере развития методологии, они будут устранены. Но сравнивать результаты из различных лабораторий нужно осторожно. К сожалению, межлабораторная стандартизация методологии не проведена, хотя метод (с исполь-

зованием иммунохимии и  $^{32}\text{P}$ -послемечения) существует более 10 лет. Затрудняет проведение корреляций и тот факт, что изрядное количество аддуктов обнаруживается и у людей, вроде бы не подвергавшихся экспозиции. У людей со сходной экспозицией из-за индивидуальных вариаций наблюдаются различные уровни содержания аддуктов. Одними из причин являются различная способность к адсорбции, репарации и метаболической активации и детоксификации, которые определяются как генетическими факторами, так и условиями окружающей среды (например, наличием в воздухе, пище или применяемых лекарственных средствах индукторов и ингибиторов монооксигеназных активностей).

После преодоления этих трудностей метод определения уровня экзогенных аддуктов с биологическими макромолекулами может стать отличным способом биомониторинга и моделью для описания процессов взаимодействия живых организмов с неблагоприятными факторами окружающей среды.

#### **4.2. Генетический полиморфизм ферментов метаболизма ксенобиотиков и риск развития онкозаболеваний у человека**

Межиндивидуальная вариабельность в метаболической активности может быть ключевым фактором для объяснения различий в чувствительности к химическим канцерогенам среди индивидуумов. Получить прямое доказательство генетической предрасположенности человека к химически индуцируемому канцерогенезу гораздо сложнее, чем это показано для экспериментальных животных. Накоплено большое число литературных данных, указывающих на участие цитохромов CYP1A, CYP2D и CYP2E в процессах возникновения онкологических заболеваний, в частности, рака легкого и мочевого пузыря. Для этих ферментов показано существование генетического полиморфизма, что фенотипически проявляется в различном уровне их активности. Детекция этих белков у людей, работающих в условиях вредных производств и живущих в экологически неблагоприятных условиях, также как и установление их генетического статуса представляют собой комплексный подход при оценке факторов риска возникновения онкологических заболеваний. Генетический полиморфизм характерен также для N-ацетил-трансферазы и CYP2C8-10 (мефенитоингидроксилаза).

На основании активности в метаболизме ряда лекарств популяция была разделена на два фенотипа: быстрые ацетиляторы/интенсивные метаболизеры и медленные ацетиляторы/слабые метаболизеры. Такой полиморфизм является хорошим инструментом для изучения взаимосвязи между генетически детерминированными различиями в активности ферментов, метаболизирующих лекарства, и риском возникновения экологических болезней и рака. При одинаковом уровне экспозиции различных химических соединений фенотип со слабым статусом метаболизма будет накапливать неметаболизированные соединения, в том числе лекарства. В результате этого возникают полинейропатия, вызванная изониазидом или пергексалином, болезнь Паркинсона, индуцированная пестицидами [363]. В то же время, быстрые метаболизеры подвержены более высокой степени риска возникновения раковых заболеваний (бронхиальная карцинома у курильщиков и рак мочевого пузыря).

Молекулярно-эпидемиологический подход является одним из наиболее распространенных для решения проблем генетического полиморфизма. Он позволяет проверить достоверность гипотезы о генетической предрасположенности к раковым заболеваниям, вызванным химическими канцерогенами из окружающей среды, сочетает традиционный дизайн эпидемиологических исследований с современными достижениями лабораторных исследований. Его преимущества включают возможность более детально понять механизмы этих процессов на фоне экспозиции различными химическими соединениями. К недостаткам можно отнести некоторые экспериментальные сложности и достаточно высокую стоимость. В обзоре [364], посвященном этим вопросам, указывается на существование трех основных фармакогенетических факторов риска. Первые два - изоформы

CYP1A (ПАУ-гидроксилаза) и CYP2D (ДБГ), чьи активности связаны с чувствительностью к раку легкого. Другой фактор - N-ацетилтрансфераза, фермент, не принадлежащий к классу P450, чья активность ассоциирована с чувствительностью к раку мочевого пузыря. В этом контексте обсуждается гипотеза взаимосвязи между фенотипом метаболизма дебризохина и раком легкого. Как уже упоминалось выше, эпидемиологические исследования предполагают взаимосвязь определенного фенотипа полиморфных ферментов, метаболизирующих чужеродные соединения, с некоторыми типами рака.

Особый интерес при изучении генетического полиморфизма представляет генетический локус дебризохин/спартеингидроксилазы или CYP2D. Хотя эта форма цитохрома P450 является минорной для печени человека, ее полиморфная экспрессия связана с метаболизмом по крайней мере 30 лекарств, применяемых в современной медицине. Среди них  $\beta$ -блокаторы и антидепрессанты. Показано, что мутантный ген CYP2D6, глутатион S-трансфераза (GST) класса Mu и ариламин N-ацетилтрансфераза служат генетическими основами мутантных аллелей у больных раком легкого [365]. С помощью полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДФ) метода с применением кДНК для CYP2D6 было проверено 79 больных раком легкого. Предварительно эти больные были обследованы по способности метаболизировать дебризохин. Мутантные аллели гена CYP2D6 были определены с помощью аллельспецифичной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Аналогично был определен генотип GST класса Mu в соответствии с определением *in vivo* активности образования конъюгатов глутатиона с трансстильбеносидом. Образцы ПДФ установили расхождение между быстрым и медленным генотипом N-ацетилтрансферазы и их гетерозиготами. Среди обследованных больных было выявлено три фенотипа слабых метаболизеров дебризохина (3,8%). Самая высокая активность ДБГ наблюдалась у гомозигот по генам "сильного" метаболизма. Гетерозиготы, имеющие один "сильный" ген, проявляли сниженную активность. Больные с фенотипически поврежденной GST-Mu активностью также имели мутантные гены этого фермента, что было подтверждено методом ПЦР. Было также показано полное соответствие между фенотипированием N-ацетилтрансферазы, выявленному по метаболизму кофеина, и генотипированием.

Авторы исследования делают важный вывод о возможности использования молекулярно-эпидемиологических исследований для установления факторов риска возникновения онкологических заболеваний. В этом же контексте выполнена работа [366], где исследован полиморфизм активности лимфоцитарной GST-Mu и гена CYP2D. Показано, что курильщики с низкой GST-Mu активностью обладали высокой степенью риска возникновения рака легкого, в то время как фенотип с низкой ДБ-гидроксилазной активностью коррелировал с низкой степенью риска. 80% людей среди слабых метаболизеров ДБ имели мутацию в 4-м экзоне гена CYP2D [367]. При исследовании частоты встречаемости этой мутации в популяции здоровых людей и больных раком легкого не обнаружено каких-либо связей между полиморфизмом данного гена и возникновением рака. Однако в других популяциях больных был обнаружен сдвиг в сторону слабых метаболизеров и их гетерозигот.

Подтверждением существования корреляционных взаимосвязей CYP2D и возникновения рака легкого служит исследование [368]. ПДФ методом с использованием рестриктазы Xba I в комбинации с ПЦР определен генотип 122 здоровых и 106 больных раком легкого. В гене CYP2D6 было выявлено 3 аллельных варианта: 2D6A, 2D6B и 2D6D. Ген 2D6B составлял 11,1% и 10,4% от общих аллелей среди здоровых и больных раком легкого соответственно. Частота встречаемости других аллелей - 5,7% и 2,8% для CYP2D6A и 3,4% и 2,4% для CYP2D6D генов. Из 122 здоровых людей 5,7% были слабыми метаболизерами ДБ, в то время как у больных раком легкого этот показатель 0,9%.

Не обнаружено корреляционных взаимосвязей между частотой различных аллелей у больных и курящих людей. Однако статистический анализ показал существенные различия ( $p=0,05$ ) в распределении генотипа слабого метаболизма ДБ между раковыми больными (1/106) и здоровыми людьми (7/122). По мнению авторов, эти данные говорят в пользу гипо-

тезы, что риск заболевания раком легкого выше у людей с генотипом интенсивного метаболизма ДБ. Исследована связь генотипа CYP2D6 с возникновением рака мочевого пузыря с помощью тестовых лекарств ДБ, мефенитоина и дапсона, метаболизирующихся CYP2D6, CYP2C19 и CYP3A4 соответственно [369, 370]. Концентрация метаболитов этих лекарств была определена в моче здоровых и прооперированных больных раком мочевого пузыря. Эти больные наблюдались в течение 3 лет. Из 95 пациентов у 55 вновь была зарегистрирована опухоль. Все больные после 3-летнего послеоперационного перерыва тестировались по гидроксированию ДБ. Было установлено, что у больных с повторным раком скорость метаболизма ДБ была выше.

Из приведенных выше литературных данных следует, что несмотря на некоторые противоречивые результаты, существует положительная корреляция между генотипом CYP2D, его фенотипическим проявлением (4-ОН-гидроксирование ДБ) и возникновением некоторых форм рака. Существует также достаточно много данных, указывающих на роль цитохрома CYP1A в химическом канцерогенезе [371]. Именно ферменты этого класса активируют проканцерогены. Поэтому важно рассмотреть этот класс P450 в связи с возникновением раковых заболеваний.

Ген CYP1A1 экспрессируется в большинстве тканей лишь после воздействия индуцирующих соединений. Так, показана индукция этого P450 в плаценте курящих женщин [372] и в легких курильщиков [373]. Продукт гена CYP1A2 найден в печени, однако, уровень его экспрессии варьирует [374]. У человека этот фермент активирует ароматические амины, промутагены - гетероциклические ариламины из пищевых пиролизатов и афлатоксин В1 [375]. Последовательность событий, в которых участвуют цитохромы P450 1A1 и 1A2 печени человека, осуществляется следующим образом. Соединения (проканцерогены) из окружающей среды связываются с белком-рецептором (Ah-рецептор). Этот комплекс участвует в активации транскрипции через его взаимодействие с регуляторными участками генов этих P450. Индуцированные белки активируют проканцерогены, в результате чего образуются реактивные метаболиты, способные связываться с ДНК.

Накоплен достаточно обширный экспериментальный материал о роли цитохромов P450 1A в возникновении онкологических заболеваний у человека. Рак легкого - одна из наиболее часто встречающихся форм рака у курильщиков во всех странах. Возникновение карциномы инициируется активацией проканцерогенов, например, бензо[а]пирена, цитохромом P450 1A1. Накопленные доказательства предполагают, что увеличение риска возникновения бронхогенной карциномы у курильщиков связано с высокой арилгидроксилазной (бензо[а]пиренгидроксилазной) активностью, т.е. индуцибельностью фенотипа P450 1A1 [376]. Показана достаточно высокая корреляция риска возникновения рака легкого с разными аллельными вариантами гена P450 1A1, выявленными ПДРФ методом с использованием рестриктазы MspI [32]. Определена частота встречаемости каждого типа MspI полиморфизма в популяции здоровых и больных карциномой легкого в Японии. Сделан вывод о том, что гомозиготы редкого аллеля MspI полиморфизма для гена P450 1A1 встречались в 3 - 5 раз чаще у раковых больных.

В другой работе исследовался MspI полиморфизм методом ПЦР. Показано существование, по крайней мере, двух форм цитохрома P450 1A1 у человека, различающихся по первичной структуре [377]. Один из них чаще встречается у больных раком, что было выявлено при исследовании MspI полиморфизма гена CYP1A1. Этот фенотип связан с заменой лишь одной аминокислоты.

Далее была проделана работа по взаимосвязи генотипа CYP1A1, частоты встречаемости карциномы легкого и генотипа GST класса Mu, фермента, детоксифицирующего электрофильные метаболиты проканцерогенов, активируемых цитохромом P450 1A1 [378]. Было обследовано 85 больных сквамозной карциномой легкого с учетом количества потребляемых сигарет. Был выявлен генотип этих больных по генам CYP1A1 и GST1. Пациенты, гомозиготные по чувствительному MspI полиморфизму или по замене аминокислот Le-Val,

были больны карциномой после недлительного курения. Больные с таким генотипом плюс гомозиготы по дефициту GST1 обладали наивысшей степенью риска этим злокачественным заболеванием. Был сделан вывод, что межиндивидуальная вариабельность по ферментам, метаболизирующим чужеродные соединения, в том числе проканцерогены, может быть ключевым фактором при объяснении различий в чувствительности к канцерогенам [379]. Однако в популяции людей в США такой положительной корреляции не выявлено [380]. Тем не менее, наличие мутантной MspI аллели CYP1A1 у африканских американцев статистически достоверно показало увеличение степени риска возникновения онкологической патологии [381].

Другие результаты свидетельствуют о существовании взаимосвязи фенотипа CYP1A1 и риска возникновения рака легкого. Исследована активность и проведен иммунохимический анализ цитохромов P450 1A1 и P450 1A2 с помощью моноклональных антител в легких здоровых и больных раком легкого среди финской популяции [382]. В легочной ткани 57 больных раком легкого были определены P450 1A1/2, бензо[а]пиренгидроксилазная активность, маркерная для P450 1A1 и кофеингидроксилазная активность, маркерная для P450 1A2, по образованию метаболитов этого лекарства в моче. Эти P450 не были выявлены в препаратах легких некурящих или бывших курильщиков, тогда как иммуногистохимически белки выявлялись у курильщиков, у кого была диагностирована периферическая (16 из 16 человек) или бронхиальная (10 из 17) карцинома легкого. Активность этих ферментов была выше у раковых больных. Был сделан вывод, что курение индуцирует CYP1A1 в легких и, вероятно, CYP1A2 в печени. Индукция этих ферментов увеличивает риск возникновения онкологических заболеваний, на что влияет и определенный метаболический фенотип P450 1A.

Используя MspI полиморфизм, авторы исследовали взаимосвязь генотипа CYP1A1 и риска возникновения рака легкого [383]. Обследовано 87 больных раком легкого, 23 больных с неонкологическими легочными патологиями и 121 здоровых людей. Учитывая экологическую обстановку, курение, авторы не установили такой взаимосвязи. Ими было сделано предположение, что у финской популяции MspI полиморфизм CYP1A1 - не показатель индивидуальной чувствительности к раку легкого, в отличие от японской популяции [32]. Отсутствие корреляционных взаимосвязей между полиморфизмом CYP1A1 и больных раком легкого было показано и при исследовании норвежской популяции [384]. Рассматривая эти несоответствия, исследователи считают, что необходимо более детально изучить механизмы этих явлений, включая исследование Ah-рецептора человека, секвенирование его гена, с последующим скринингом полиморфизма генов, вовлеченных в процесс химического канцерогенеза [385].

Другие исследователи проверили взаимосвязь между генотипом и транскрипционной регуляцией CYP1A1 гена в различных популяционных группах [386], а именно, индуцибельность этого P450 в митогенстимулированных лимфоцитах у 68 человек евро-, афроамериканского и азиатского происхождения. Индуцибельность CYP1A1 у афроамериканцев была значительно ниже, чем у других исследованных групп. MspI полиморфизм этого гена показал существенные различия в частоте встречаемости нескольких генотипов CYP1A1 между евроамериканцами и азиатами. Однако не было выявлено никаких различий между индуцибельностью фермента и его генотипом. Авторы полагают, что индуцибельность P450 1A1 может быть потенциальным маркером воздействия ПАУ соединений на человека. Подтверждением может быть определение бензо[а]пиренгидроксилазной активности в образцах печени человека и указание на положительную корреляцию уровня этой активности с различными патологиями [387].

Метаболические превращения канцерогенных ароматических аминов у человека являются примером полиморфизма, который может играть существенную роль в выявлении некоторых форм рака. Эти соединения могут поступать в организм человека из различных источников, в том числе сигаретного дыма и пережаренной пищи. Иницирующий этап метаболизма ариламинов - N-гидроксилирование осуществляется в печени цитохромом P450

1A2. На следующем этапе происходит N-ацетилирование ацетилтрансферазой. Первый этап - активация, второй соответственно - детоксификация этих вредных для здоровья человека соединений. Для этих ферментов характерен полиморфизм и индивидуальный фенотип может быть определен по спектру метаболитов кофеина в моче [388]. N-гидроксиариламины могут транспортироваться в кровь, где связываются с гемоглобином, образуя аддукты или подвергаются почечной фильтрации, попадая в полость мочевого пузыря, где при кислом pH связываются с ДНК. Уровень аддуктов канцерогенов с ДНК в мочевом пузыре человека зависит от интенсивности курения, а основным продуктом является аддукт 4-аминобифенила и дезоксигуанозином по C<sub>8</sub> [388].

Существует и альтернативный путь биотрансформации ариламинов, в котором продукты метаболизма могут подвергаться конъюгации глюкуронилтрансферазой, секретироваться с желчью в просвет кишечника, где вновь освобождаются в результате гидролиза β-глюкуронидазой. В дальнейшем, освободившиеся N-гидроксиметаболиты активируются ацетилтрансферазой. В этом случае люди с фенотипом быстрого ацетилирования обладают высокой степенью риска возникновения колоректального рака. Конечно же, определение специфических ариламин-ДНК-аддуктов в кишечнике человека могло бы прямо доказать роль этих канцерогенов в этиологии рака кишечника [388]. В печени человека обнаружен полиморфизм сульфотрансферазы относительно N-гидроксиариламинов, что может проявляться в разном уровне циркулирующих метаболитов. Было показано, что экспрессия этой группы ферментов выше у негров, чем у белых [389]. Этот факт может объяснить относительно низкую частоту встречаемости рака мочевого пузыря у черного населения.

Для подтверждения роли быстрого и медленного фенотипа ацетилтрансферазы при определении факторов риска возникновения указанных выше форм рака были определены профили метаболизма кофеина - субстрата для цитохрома P450 1A2 [390]. Показано тримодальное распределение активности CYP1A2 у некурящих: 12 - 13% медленных, 51 - 67% промежуточных и 20 - 37% быстрых фенотипов в популяциях белых американцев из Арканзаса (n=101), итальянцев (n = 95) и китайцев (n = 78). У итальянских и американских курильщиков зарегистрирована индукция CYP1A2, что проявилось в увеличении метаболитов кофеина. В китайской популяции индукции этого P450 не выявлено. Более того, уровень 4-аминобифенил-ДНК-аддуктов у курильщиков был в 2 раза выше, чем у некурящих людей, причем этот показатель зависел от фенотипа CYP1A2 и ацетилтрансферазы [391]. Этот же класс аддукта был преобладающим в биоптатах мочевого пузыря раковых больных. Сделан общий вывод о взаимосвязи между курением, образованием аддуктов канцерогенов с ДНК в уротелиальных клетках, уровнем первичных ароматических и, возможно, гетероциклических аминов при возникновении рака мочевого пузыря.

Гетероциклические амины образуются в пережаренной мясной пище. Показано, что полиморфная N-ацетилтрансфераза активирует эти соединения, что может также привести к возникновению колоректального рака [392]. Доказана роль промышленных ариламинов в этиологии рака мочевого пузыря [393]. Среди больных этой формой рака 66% составляли медленные ацетиляторы, среди больных, контактирующих с ариламинами на производстве, этот показатель увеличивался до 76%.

Цитохром P450 2E1 активирует канцерогенные N-нитрозоамины, ароматические углеводороды, производные мочевины, этилкарбаматы и другие низкомолекулярные химические соединения. Роль этого фермента в метаболизме проканцерогенов у человека доказана на примере селективного ингибирования его каталитической активности, иммуноингибирования антителами против CYP2E1 кроликов [268]. Количество цитохрома P450 2E1 в печени человека может широко варьировать. Можно оценить его уровень неинвазивными методами (метаболизм хлорзоксазона или ингибирование дисульфирамом) и соотнести количество фермента между здоровыми и больными раком людьми [271].

Методом ПДРФ с использованием рестриктаз PstI и PsaI проанализирован ген CYP2E1 в популяциях здоровых и больных раком легкого [394]. Частоты различных аллелей существ-

венно различались у японцев, американских негров и белых. Pst1 редкий аллель с частотой 2% встречался у белых, 5% у американских негров и 24% у японцев. Для Psa1 редкого аллеля эти частоты были равны 2,2 и 27% соответственно. Было обследовано также 128 больных раком легкого. Частота встречаемости Pst1 мутантного аллеля в случае рака легкого у негров составляла 0,19%, а у белых - 4,28%. Схожие результаты получены для Psa1 мутантного аллеля. Авторы полагают, что такие расовые различия могут быть соотнесены с генетически предрасположенной чувствительностью к раку легкого.

В другой работе был исследован полиморфизм CYP2E1 гена по DraI рестриктазе [395]. Распределение генотипов в этом случае у раковых больных и здоровых достоверно различалось. Сделан вывод о связи DraI полиморфизма гена CYP2E1 и чувствительности к возникновению рака легкого и органов пищеварительной системы. В обзоре [396] суммированы результаты, полученные разными авторами о полиморфизме цитохромов P450 1A1, 2D6 и 2E. Особый интерес проявляется к обнаружению четко выраженных межиндивидуальных различий гена CYP1A1, что может быть чрезвычайно важным в понимании различий в чувствительности к раку легкого. Прогнозы специалистов относительно двух других P450 менее оптимистичны.

Таким образом, в литературе содержится достаточно обширный материал о связи генотипа некоторых цитохромов P450 и риска онкологических заболеваний. Изучение генетического полиморфизма этих ферментов вместе с их фенотипированием (определение активностей) позволит дать как характеристику воздействия факторов внешней среды на организм человека, так и оценить степень риска относительно возникновения раковых заболеваний.

#### **4.2.1. Эксперименты по изучению индуцибельности бензо[а]пиренгидроксилазы**

Рак легкого остается одной из основных причин смертности людей в промышленных регионах. Эпидемиологические исследования свидетельствуют также о большой корреляции между интенсивностью курения и частотой возникновения рака легкого (бронхогенных карцином). Хотя механизм канцерогенного действия полициклических углеводородов и других встречающихся в промышленности ксенобиотиков не до конца изучен, ключевую роль в нем отводят микросомным монооксигеназам, ответственным за метаболическую активацию химических промутагенов и проканцерогенов. Помимо химических факторов среды, в регуляции активности и индуцибельности монооксигеназных систем (в частности, бензо[а]пиренгидроксилазы) участвуют генетические факторы. Сотрудником лаборатории ксенобиохимии В.А.Осташевским исследованы корреляционные взаимодействия индукции P450 1A1 (бензо[а]пиренгидроксилазы) и рака легкого [397].

Монооксигеназная система мононуклеарных клеток крови относительно более доступна для исследования, поэтому наши усилия были направлены прежде всего на разработку адекватного лимфоцитарного теста, отражающего состояние систем биотрансформации ПАУ у человека, и оценку этих систем у больных раком легкого. Для изучения цитохромов у человека и оценки роли монооксигеназной системы в детоксикации и метаболической активации ксенобиотиков необходима доступная для анализа ткань. Такой тканью оказались мононуклеарные клетки периферической крови, в первую очередь, лимфоциты и моноциты, первичные культуры из других органов и тканей, а также различные линии перевиваемых человеческих клеточных культур. Хотя лимфоциты содержат меньшее количество эндоплазматического ретикулума, чем клетки печени, его содержание повышается при митогенной стимуляции культуры, когда лимфоциты претерпевают бласттрансформацию.

Ранее было известно, что лимфоциты и моноциты человека, так же как и микросомная фракция печени, катализируют цитохром P450-зависимое гидроксилирование бензо[а]пирена [398]. Более того, в культивируемых клетках крови можно вызвать индукцию бензо[а]пиренгидроксилазной активности добавлением в культуральную среду индукторов ПАУ. Этот факт наряду с данными об иммунологической идентичности цитохромов P450

экспериментальных животных и человека позволил утверждать, что лимфо- и моноцитарные первичные клеточные культуры периферической крови являются хорошей моделью для изучения химического канцерогенеза у людей. Индивидуальные различия в активности БПГ у людей зависят не только от их генотипа, а в значительной степени от факторов окружающей среды [399]. Таким образом, в различных человеческих клеточных линиях экспрессируются множественные формы Р450, участвующие в биоактивации ксенобиотиков ПАУ и ароматических аминов до канцерогенных и мутагенных продуктов. Выявление субстратной специфичности этих цитохромов позволит оценить факторы риска опухолеобразования у людей и, возможно, решить проблему доклинического выявления предрасположенности отдельных людей к возникновению опухолей.

Проблема поиска маркерных субстратов для обнаружения различных форм Р450 у человека довольно остра. Прежде всего процедуры забора человеческого материала должны быть простыми и доступными, а методы регистрации ферментативной активности - чувствительными и специфичными. Во-вторых, метаболизм ксенобиотиков у людей вариабелен и регулируется генетическими факторами, а также подвержен влиянию факторов окружающей среды. Широкое распространение получили исследования на лимфоцитах периферической крови людей вследствие доступности этой ткани и возможности регистрировать в бласттрансформированных лимфоцитах и моноцитах монооксигеназные активности диоксинового типа.

Действительно, исследование межиндивидуальных различий индуцибельности БПГ в митогенстимулированной культуре лимфоцитов 353 человек выявило, что этот признак находится под моногенным контролем и для него характерно тримодальное распределение ПАУ-зависимой индуцибельности БПГ в популяции людей: высокая, низкая и промежуточная [398]. Дальнейшие исследования индуцибельности БПГ в митогенстимулированных лимфоцитах пациентов с бронхогенной карциномой показали, что высокая индуцибельность фермента в лимфоцитах этих больных обнаруживается значительно чаще, чем в контрольной группе. Фактор риска развития бронхогенной карциномы у людей промежуточной по индуцибельности БПГ группы в 16 раз, а для людей высокой группы - в 36 раз больше, чем у людей низкой группы. Полученные данные позволяют надеяться на возможность использования лимфоцитов для донозологического контроля любого человека на фактор риска развития ряда опухолей с целью своевременной коррекции.

Существенно изменилась методология клинического обследования людей, подвергавшихся воздействию опасных для здоровья ксенобиотиков, в том числе ПАУ. Эти изменения касаются: 1) оценки роли генетического полиморфизма человеческой популяции, объясняющего различный уровень реагирования на одинаковые по силе и характеру воздействия ксенобиотиков; 2) учета межвидовых различий в чувствительности, прежде всего различий между грызунами и человеком; 3) введения в клиническую практику современных методов детекции, например, использование моноклональных антител в чувствительных иммунохимических реакциях RIA и ELISA или применения высокоразрешающей хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией; 4) поиска маркерных ферментов, подобных БПГ, способных чутко реагировать на воздействие ксенобиотиков из окружающей среды, а также методов регистрации их активностей в биопробах людей.

Учет всех обстоятельств, перечисленных выше, поможет приблизиться к решению проблемы механизмов токсического действия ксенобиотиков на организм человека.

#### **4.2.2. Индуцибельность БПГ в лимфоцитах больных раком легкого**

На этом этапе исследований с помощью модифицированного лимфоцитарного теста в митоген-стимулированных лимфоцитах периферической крови определяли базальную (ББПГ) и индуцированную (ИБПГ) активность бензо[а]пиренгидроксилазы, а также индекс индуцибельности (ИИ) БПГ у каждого пациента в группах больных раком легкого и больных раком

внелегочной локализации, а также оценивали индуцибельность фермента среди курящих в группе больных первичным раком легкого и в группе людей - доноров крови.

Кровь для исследования брали от двух групп больных и группы доноров. Опытная группа состояла из больных раком легкого (40 человек), госпитализированных в областной онкологический диспансер с диагнозом "бронхогенная карцинома". Группа условного контроля состояла из больных раком внелегочной локализации: молочная железа, желудок, нижняя губа, прямая кишка, кожа, щитовидная железа (19 человек). Группа чистого контроля состояла из доноров крови (58 человек). У каждого человека из этих трех групп определялась активность БПГ в митоген-стимулированных лимфоцитах и высчитывался ИИ фермента.

На основании данных [398], где на гистограммах распределения ИИ в популяциях здоровых доноров и больных раком легкого выявлено тримодальное распределение этого параметра, каждую группу по ИИ условно разделили на три: высокая степень индуцибельности - ИИ 3, 7; средняя степень - ИИ от 3,6 до 2,6; низкая степень - ИИ,5. В каждой из этих групп высчитали процент по степеням индуцибельности и процент курящих.

В группе больных раком легкого с высокой степенью индуцибельности среднее значение ИИ равно - 10,0 (индивидуальные колебания от 3,7 до 30,0), в группе больных раком внелегочной локализации - 5,8 (колебания от 4,0 до 9,3). В группе доноров с высокой степенью индуцибельности ИИ равен 9,2 (колебания от 3,8 до 25,4). Цифры средней и низкой степени индуцибельности по ИИ во всех трех группах практически одинаковы. Интересно, что процент больных раком легкого с высокой степенью индуцибельности равен 38,5, в то время как больных раком внелегочной локализации в соответствующей группе - 31,6, а в группе доноров - всего 20,7. Эти 20,7% людей из группы доноров можно отнести к генетически предрасположенным к эффективной метаболической активации проканцерогенов, что повышает фактор риска в отношении онкологических заболеваний. Это также подтверждается большим процентом курящих в этой группе - 83,3. С низкой степенью индуцибельности оказалось большинство доноров - 62,1%.

Обнаружен высокий процент курящих с высокой степенью индуцибельности у больных раком легкого - 80,0. В связи с этим, интересные, на наш взгляд, данные обнаруживаются при разделении группы больных раком легкого и группы доноров на курящих и некурящих. 44,4% курящих больных с высокой степенью индуцибельности имеют средний ИИ - 10,8, в то время как у некурящих больных, соответственно - 23,0% имеют среднее значение ИИ - 7,0. Но более четкая разница у этих же показателей обнаруживается между группами курящих и некурящих доноров: 25% курящих доноров высокий ИИ, тогда как среди некурящих этот показатель был равен 11%. Этот факт еще раз подтверждает многочисленные данные о том, что фактор курения играет важную роль в возникновении злокачественных опухолей легких и влияет на активность БПГ в лимфоцитах этих людей.

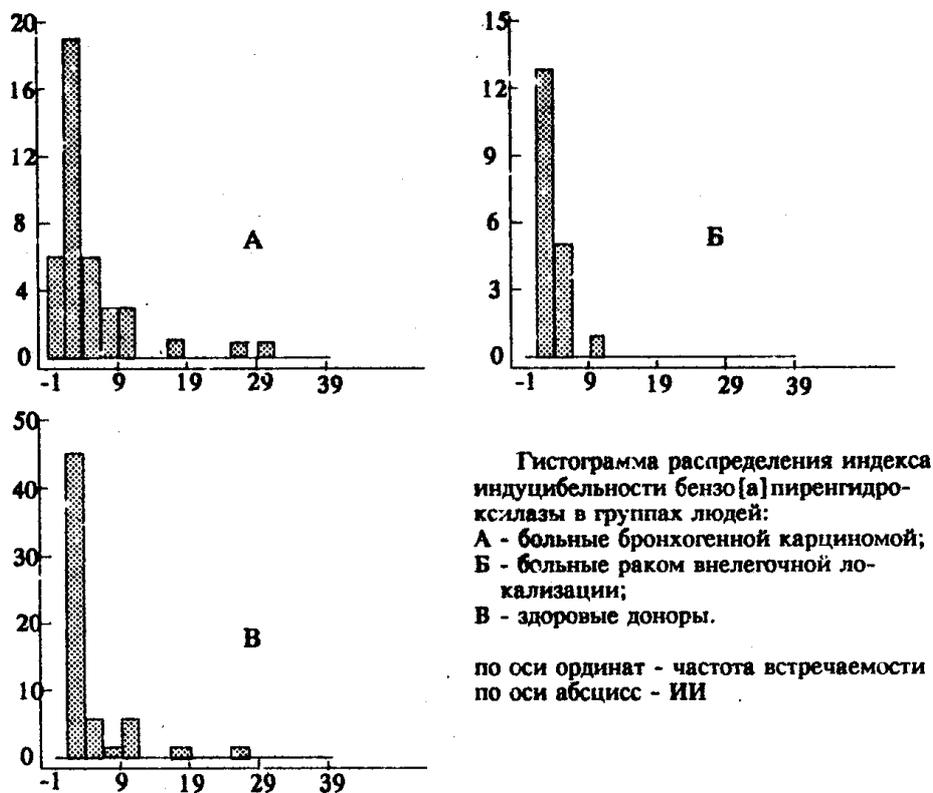
Говоря о распределении ИИ в трех сравниваемых группах людей, можно заметить, что этот показатель имеет тенденцию к смещению влево в двух контрольных группах (больные раком внелегочной локализации и группа доноров), относительно опытной группы (больные раком легкого) (рисунок). Особенно отчетливо это смещение наблюдается в группе условного контроля (больные раком внелегочной локализации). Если у животных показана взаимосвязь между индуцирующим эффектом на бензо[а]пиренгидроксилазы ПАУ и канцерогенной активностью последних [6], то в человеческой популяции такая взаимосвязь не столь очевидна, в основном, вследствие методических трудностей при изучении бензо[а]пиренгидроксилаз (P450 IA1) в лимфоцитах периферической крови.

Между тем, на протяжении многих лет внимание клиницистов и специалистов в области онкологии приковано к вопросу ранней диагностики онкологических заболеваний и доклинического выявления предрасположенности отдельных людей к возникновению злокачественных опухолей. Современный подход к биотестированию канцерогенов должен учитывать множественность молекулярных форм P450. Только некоторые из них (например, P450 IA1) катализируют реакции активации проканцерогенов, в то время как другие ответственны за

активацию промутагенов или же за ферментативную детоксикацию ксенобиотиков. Содержание и активность изоформ цитохрома Р450 среди особей в популяции характеризуется значительной гетерогенностью, что, по-видимому, и обуславливает различную индивидуальную чувствительность к влиянию канцерогенных соединений [400].

Таким образом, на основании собственных и литературных данных считаем целесообразным использовать наш метод - определение индекса индуцибельности БПГ в лимфоцитах периферической крови человека для доклинического выявления индивидуальной чувствительности к канцерогенам типа ПАУ, а также оценки распределения фактора риска онкозаболеваний в популяции и для обоснованного, своевременного профотбора людей для работы в условиях с повышенным содержанием потенциально опасных ксенобиотиков.

Выявление в человеческой популяции индивидуумов с высокой степенью риска возникновения онкологических заболеваний является важной составной частью экологического биомониторинга. Существование генетического полиморфизма ферментов, индуцируемых химическими соединениями окружающей среды и метаболизирующих разнообразные ксенобиотики, в том числе и канцерогены, может быть важным инструментом при выявлении этого риска. Регистрация высокого уровня индукции генов цитохрома Р450 1А может быть свидетельством неблагоприятного воздействия факторов внешней среды, что может приводить к увеличению риска заболевания раком. В пользу этого свидетельствуют достоверные результаты о положительной корреляции между высоким уровнем индукции СYP1A1 у курильщиков и увеличением риска заболевания бронхогенной карциномой легкого [401]. Можно надеяться, что развитие клинических тестов, позволяющих предсказать индуцибельность цитохромов Р450 1А, может оценить индивидуальный риск заболевания раком, вызванным химическими соединениями окружающей среды.



Несмотря на то, что различные исследования от молекулярного к популяционному уровню подтверждают существование связей между фенотипом метаболизма ксенобиотиков и возникновением рака, методологические проблемы до сих пор остаются. Новые эпидемиологические исследования, применение тестов на основе анализа ДНК помогают продвинуть это направление для понимания механизмов химического канцерогенеза. N. Caporaso [127] считает, что несмотря на то, что многие версии этого процесса остаются до сих пор

противоречивыми, существование в популяции значительных межиндивидуальных различий в способности метаболизировать определенные химические канцерогены, является очевидным. Этот факт, по мнению автора, - аргумент в пользу консервативного подхода в регуляции химического канцерогенеза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенный выше материал представляет современное состояние методологии биомониторинга окружающей среды с использованием микросомной монооксигеназной системы живых организмов. О необходимости биомониторинга свидетельствует постоянное увеличение хронических заболеваний, в том числе онкологических, в экологически неблагоприятных районах. Анализируя фактические данные необходимо отметить, что, помимо оценки уровня экспозиции поллютантов, выявления корреляционных соотношений между уровнем загрязнения и патологиями, важно оценивать факторы риска их возникновения с учетом генетического статуса. Представляется весьма важным поиск адекватных биомаркеров для проведения биомониторинга. Микросомная монооксигеназная система, осуществляющая метаболизм широкого спектра соединений из окружающей среды, может быть, на наш взгляд, подходящим биомаркером как для оценки уровня экспозиций, так и для прогнозирования многих заболеваний, в том числе и рака. Такое заключение основывается на следующих положениях: 1) ферменты монооксигеназной системы высокочувствительны к экспозиции химическими соединениями, что проявляется в увеличении их содержания (эффект индукции); 2) этим ферментам свойствен генетический полиморфизм, что позволяет проследить взаимосвязь генотипа с патологиями; 3) продукты метаболизма ксенобиотиков могут ковалентно связываться как с белками, ДНК и РНК (образование аддуктов); 4) использование тестовых лекарств, метаболизируемых монооксигеназной системой, позволяет проводить неинвазивные исследования на человеке.

Если с количественной оценкой уровня экспозиции вопрос упирается в чисто технические трудности, то с оценкой отдаленных эффектов последствия факторов окружающей среды на организм человека многое остается невыясненным, в частности, до сих пор открыты вопросы, имеющие отношение к механизму возникновения онкологических патологий. Однако представляется очевидным существование взаимосвязи между генотипом ферментов метаболизма ксенобиотиков, степенью и продолжительностью экспозиции проканцерогенами и увеличением степени риска возникновения онкозаболеваний. С течением времени данные подходы будут дополнены новыми.

Но уже сейчас необходима более комплексная оценка генетической нестабильности, возникающей под действием различных химических факторов. Необходима дальнейшая работа по расширению спектра биомаркеров, чувствительных к низким уровням воздействия. Тем не менее, представленный здесь комплекс данных дает ценные знания, имеющие отношение к проблеме взаимоотношения человека и окружающей среды. И эти знания могут быть использованы уже сегодня с пользой для человечества.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sipes I.G., Gandolfi A.J. Biotransformation of toxicants // Casarett and Doull's toxicology / Eds C.D. Klaassen, M.O. Admur, J. Doull. - N. Y.: Macmillan Publishing Company, 1986. - P. 99 - 173.
2. Nebert D.W., Gonzalez F.J. P450 genes: structure, evolution, and regulation // Ann. Rev. Biochem. - 1987. - Vol. 56. - P. 945 - 993.
3. Conney A.H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons // Cancer Res. - 1982. - Vol. 42. - P. 4875 - 4917.
4. Gonzalez F.J., Crespi C.L., Gelboin H.V. cDNA-expressed human cytochrome P450s: a new age of molecular toxicology and human risk assessment // Mutation Res. - 1991. - Vol. 247. - P. 113 - 127.
5. Guengerich F.P. Role of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy // Cancer Res. - 1988. - Vol. 48. - P. 2946 - 2954.
6. Pelkonen O., Nebert D.W., Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis // Pharmacol. Rev. - 1982. - Vol. 34. - P. 189 - 222.
7. Wolf C.R. Cytochrome P450s: polymorphic multigene families involved in carcinogen activation // Trends Genet. - 1986. - Vol. 2. - P. 202 - 214.
8. Gonzalez F.J. Molecular biology and regulation of phase I enzymes // 5th European ISSX Meeting, September 26 - 29, 1993, Tours, France. - ISSX Proceedings, USA. - 1993. - Vol. 3. - P. 139.
9. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. - М.: Наука, 1985. - 327 с.
10. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. - Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1978. - 238 с.
11. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами. - М.: Наука, 1982. - 256 с.
12. Guengerich F.P. Reactions and significance of cytochrome P450 enzymes // J. Biol. Chem. - 1991. - Vol. 266. - P. 10019 - 10022.
13. Honkakoski P. Expression, inducibility, and catalytical properties of cytochrome P450 family 2 isozymes isolated from mouse liver. - Куопио: Куопио University Publications A. Pharmaceutical Sciences 3, 1992. - 74 p.
14. Мишин В.М., Ляхович В.В. Множественные формы цитохрома P450. - Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1985. - 180 с.
15. Gonzalez F.J. Molecular genetics of the P450 superfamily // Pharmacol. Ther. - 1990. - Vol. 45. - P. 1 - 38.
16. Cytochrome P450: biochemistry and biophysics / Eds A.I. Archakov, G.I. Bachmanova. - Moscow: INCO-TNC, Joint Stock Company, 1992. - P. 333 - 337.
17. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature / Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J. et al. // DNA and Cell Biology. - 1993. - Vol. 12. - P. 1 - 51.
18. Gibson G.G. The cytochrome P450 IV family: constitutive and inducible haemoproteins // Biochem. Soc. Transact. - 1990. - Vol. 18. - P. 14 - 15.
19. Conney A.H. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction // Pharmacol. Rev. - 1967. - Vol. 19. - P. 317 - 366.

20. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. - Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1981. - 240 с.
21. Conney A.H. Induction of microsomal cytochrome P450 enzymes // *Life Sci.* - 1986. - Vol. 39. - P. 2493 - 2518.
22. Ryan D.E., Levin W. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P450s // *Pharmacol. Ther.* - 1989. - Vol. 45. - P. 153 - 239.
23. Цырлов И.Б. Хлорированные диоксины: биологические и медицинские аспекты: Аналит. обзор. - Новосибирск, 1990. - 210 с.
24. Bandiera S., Safe S., Okey A.B. Binding of polychlorinated biphenyls classified as either phenobarbitone-, 3-methylcholanthrene or mixed-type inducers to cytosolic Ah receptor // *Chem.-Biol. Interact.* - 1982. - Vol. 39. - P. 259 - 277.
25. Kocarek T.A., Schuetz E.G., Guzelian P.S. Selective induction of cytochrome P450s by kepone (chlordecone) in primary cultures of adult rat hepatocytes // *Mol. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 40. - P. 203 - 210.
26. Environmental quality and ecosystem stability / Ed. E. Spanier. - Jerusalem: ISEEQS Publication, 1989. - Vol. 4/B. - P. 479 - 486.
27. Gonzalez F.J. The molecular biology of cytochrome P450s // *Pharmacol. Rev.* - 1989. - Vol. 40. - P. 243 - 288.
28. Ingelman-Sundberg M., Eliasson E., Johansson I. The adaptability of the hepatic cytochrome P450 system to the environment. - Stockholm: Karolinska Institutet, 1990. - P. 1-12.
29. Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzopyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P450 / McManus M.E., Burgess W.M., Veronese M.E. et al. // *Cancer Res.* - 1990. - Vol. 50. - P. 3367 - 3376.
30. Gonzalez F.J., Meyer U.A. Molecular genetics of the debrisoquine/sparteine polymorphism // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 1991. - Vol. 50. - P. 233 - 238.
31. Hickman D., Sim E. N-acetyltransferase polymorphism. Comparison of phenotype and genotype in humans // *Biochem. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 42. - P. 1007 - 1014.
32. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450 IA1 gene / Kawajiri K., Nakachi K., Yoshii A. et al. // *FEBS Lett.* - 1990. - Vol. 263. - P. 131 - 133.
33. Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase / Wrighton S.A., Thomas P.E., Molowa D.T. et al. // *Biochemistry.* - 1986. - Vol. 25. - P. 6731 - 6735.
34. The debrisoquine hydroxylation phenotype and the acetylator phenotype as genetic risk factors for the occurrence of larynx and pharynx carcinoma / Ritter J., Somasundaram R., Heinemeyer G., Roots I. // *Acta Pharmacol. Toxicol.* - 1986. - Vol. 59 (Suppl.5). - P. 221.
35. Lung cancer risk, occupational exposure and the debrisoquine metabolic phenotype / Caporaso N., Hayes R.B., Dosemeci M. et al. // *Cancer Res.* - 1989. - Vol. 49. - P. 3575-3579.
36. Guengerich F.P., Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes // *Chem. Res. in Toxicol.* - 1991. - Vol. 4. - P. 391-407.
37. Hardwick J.P. CYP4A subfamily: functional analysis by immunohistochemistry and in situ hybridization // *Meth. Enzymol.* - 1991. - Vol. 206. - P. 283.
38. Guengerich F.P. Human cytochrome P450 enzymes // *Life Sci.* - 1992. - Vol. 50. - P. 1471 - 1478.
39. Identification of new P450 expressed in human lung: complete cDNA sequence, cDNA-directed expression and chromosome mapping / Nhamburo P.T., Gonzalez F.J., McBride O.W. et al. // *Biochemistry.* - 1990. - Vol. 29. - P. 5491 - 5499.
40. Negishi M., Nebert D.W. Structural gene products of the Ah locus: genetic and immunological evidence for two forms of mouse liver cytochrome P450 induced by 3-methylcholanthrene // *J. Biol. Chem.* - 1979. - Vol. 254. - P. 11015 - 11023.

41. Roles of individual human cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of benzo[a]pyrene, 7,8-dihydrobenzo[a]pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons / Shimada T., Martin M.V., Pruess-Schwartz D. et al. // *Cancer Res.* - 1989. - Vol. 49. - P. 6304 - 6312.
42. Ioannides C. Induction of cytochrome P450 I and its influences in chemical carcinogenesis // *Biochem. Soc. Transact.* - 1990. - Vol. 18. - P. 32 - 34.
43. Whitlock J.P. The regulation of cytochrome P450 gene expression // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1986. - Vol. 26. - P. 333 - 369.
44. Genetic and environmental regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase in man: studies with liver, lung, placenta, and lymphocytes / Pelkonen O., Vahakangas K., Karki N.T., Sotaniemi E. A. // *Toxicol. Pathol.* - 1984. - Vol. 3. - P. 256 - 260.
45. Gelboin H.V. Benzo[a]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role of regulation of mixed-function oxidases and related enzymes // *Physiol. Rev.* - 1980. - Vol. 40. - P. 1107 - 1165.
46. Yang S.K., Mushtaq M., Chiu P.-L. Stereo-selective metabolism and activation of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Polycyclic hydrocarbons and carcinogenesis* / Ed. R.G. Harvey. - Washington: Amer. Chem. Soc., 1985. - P. 19 - 34.
47. Phenotyping of cytochromes P450 in human tissues with monoclonal antibodies / Fujino T., Park S.S., West D., Gelboin H.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1982. - Vol. 79. - P. 3682 - 3686.
48. Human cytochrome P450 PA (P450 IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines / Butler M. A., Iwasaki M., Guengerich F.P., Kadlubar F.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1989. - Vol. 86. - P. 7696 - 7700.
49. Goldstein J.A., Weaver R., Sundheimer D.W. Metabolism of 2-acetylaminofluorene by two 3-methylcholanthrene-inducible forms of rat liver cytochrome P450 // *Cancer Res.* - 1984. - Vol. 44. - P. 3768 - 3771.
50. A high-spin form of cytochrome P450 highly purified from polychlorinated biphenyl-treated rats / Kamataki T., Maeda K., Yamazoe Y. et al. // *Mol. Pharmacol.* - 1983. - Vol. 24. - P. 146 - 154.
51. Cytochrome P3-450 cDNA encodes aflatoxin D1-hydroxylase / Faletto M., Koser P., Batulla N. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1988. - Vol. 263. - P. 12187 - 12189.
52. Negishi M., Burkhardt B., Aida K. Expression of genes within mouse IIA and IID subfamilies: simultaneous measurement of homologous P450 mRNAs // *Meth. Enzymol.* - 1991. - Vol. 206. - P. 267 - 272.
53. Molecular genetics of the human cytochrome P450 system / Wolf C.R., Miles J.S., Gough A., Spurr N.K. // *Biochem. Soc. Transact.* - 1990. - Vol. 18. - P. 21 - 24.
54. cDNA-directed expression of rat P450s IIA1 and IIA2. Catalytic activities towards steroids and xenobiotics and comparison with the enzymes purified from liver / Aoyama T., Korzewka K., Matsunaga T. et al. // *Drug Metab. Disp.* - 1990. - Vol. 18. - P. 378 - 382.
55. Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or b-naphthoflavone / Guengerich F.P., Dannan G.A., Wright S.T. et al. // *Biochemistry.* - 1982. - Vol. 21. - P. 6019 - 6030.
56. Expression of cytochrome P450b and P450e genes in small intestinal mucosa following treatment with phenobarbital, polyhalogenated biphenyls, and organochlorine pesticides / Traber P.G., Chianale J., Florence R. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1988. - Vol. 263. - P. 9449 - 9455.
57. Waxman D.J., Walsh C. Phenobarbital-induced rat liver cytochrome P450: purification and characterization of two closely related isozymic forms // *J. Biol. Chem.* - 1982. - Vol. 258. - P. 10446 - 10457.
58. Evidence that the catalytic differences of two structurally homologous forms of cytochrome P450 relate to their home environment / Wolf C.R., Miles J.S., Seilman S. et al. // *Biochemistry.* - 1988. - Vol. 27. - P. 1597 - 1603.

53. Atchison M., Adesnik M. A cytochrome P450 multigene family: characterization of a gene activated by phenobarbital administration // *J. Biol. Chem.* - 1983. - Vol. 258. - P. 11285 - 11295.
60. Labbe D., Jean A., Anderson A. A constitutive member of the rat cytochrome P450 IIB sub-family: full-length coding sequence of the P450 IIB3 cDNA // *DNA.* - 1988. - Vol. 7. - P. 253 - 260.
61. Omiecinski C.J. Tissue-specific expression of rat mRNAs homologous to cytochromes P450b and P450 // *Nucl. Acid Res.* - 1986. - Vol. 14. - P. 1525 - 1539.
62. Immunochemical detection of human liver cytochrome P450 forms related to phenobarbital-inducible forms in the mouse / Raunio H., Valtonen J., Honkakoski P. et al. // *Biochem. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 40. - P. 2503 - 2509.
63. Bandiera S. Expression and catalysis of sex-specific cytochrome P450 isozymes in rat liver // *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 68. - P. 762 - 768.
64. Waxman D.J. Rat hepatic cytochrome P450 isoenzyme 2c // *J. Biol. Chem.* - 1984. - Vol. 259. - P. 15481 - 15490.
65. Yasumori T., Yamazoe Y., Kato R. Cytochrome P450 human-2 (P450 IIC9) in mephenytoin hydroxylation polymorphism in human livers: differences in substrate and stereoselectivities among microheterogeneous P450 IIC species expressed in yeast // *J. Biochem.* - 1991. - Vol. 109. - P. 711 - 717.
66. Purification and characterization of human liver cytochrome P450 2C19 / Wrighton S.A., Stevens J.C., Becker G.W., et al. // 5th European ISSX Meeting, Sept. 26 - 29, 1993, Tours, France. - ISSX Proceedings, USA. - 1993. - Vol. 3. - P. 69.
67. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism / Gonzalez F.J., Scoda R.S., Kimura S. et al. // *Nature.* - 1988. - Vol. 331. - P. 442 - 446.
68. Eichelbaum M., Gross A.S. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism - clinical aspects // *Pharmacol. Ther.* - 1990. - Vol. 46. - P. 377 - 394.
69. Kronbach T. Bufuralol, dextromethorphan, and debrisoquine as prototype substrates for human P450 IID6 // *Meth. Enzymol.* - 1991. - Vol. 206. - P. 509 - 517.
70. Wong G., Kawajiri K., Negishi M. Gene family of male-specific testosterone 16  $\alpha$ -hydroxylase (C-P-45016 a) in mouse liver: cDNA sequences neonatal imprinting, and reversible regulation by androgen // *Biochemistry.* - 1987. - Vol. 26. - P. 8683 - 8690.
71. Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer / Auesh R., Idle J.R., Ritchie J.C. et al. // *Nature.* - 1984. - Vol. 312. - P. 169 - 170.
72. Genetic predisposition to bladder cancer: ability to hydroxylate debrisoquine and mephenytoin as risk factors / Kaisary A., Smith P., Jaczq E. et al. // *Cancer Res.* - 1987. - Vol. 47. - P. 5488 - 5493.
73. Purification and characterization of unique isozyme of cytochrome P450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits / Koop D.R., Morgan E.T., Tarr G.E., Coon M.J. // *J. Biol. Chem.* - 1982. - Vol. 247. - P. 8472 - 8480.
74. Ekstrom G., von Bahr C., Ingelman-Sundberg M. Human liver cytochrome P450 2E1. Immunological evaluation of its contribution to microsomal ethanol oxidation, carbon tetrachloride reduction and NADPH oxidase activity // *Biochem. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 38. - P. 689 - 693.
75. Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P450 induced by isoniazid / Ryan D.E., Ramanathan L., Iida S. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1985. - Vol. 260. - P. 6385 - 6393.
76. Koop D.R., Tierney D.J. Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 // *BioEssays.* - 1990. - Vol. 12. - P. 429 - 435.
77. Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole, and isoniazid / Koop D.R., Crump B.L., Nordblom G.D., Coon M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1985. - Vol. 82. - P. 4065 - 4069.

78. Modulation of cytochrome P450 isozymes in human liver, by ethanol and drug intake / Perrot N., Nalpas B., Yang S.C., Beaune P.H. // *Eur. J. Clin. Invest.* - 1989. - Vol. 19. - P. 549 - 555.
79. Ding X., Coon M.J. Purification and of two unique forms of cytochrome P450 from rabbit nasal microsomes // *Biochemistry.* - 1988. - Vol. 27. - P. 8330 - 8337.
80. Immunochemical examinations of cytochrome P450 in various tissues of human fetuses using antibodies to human fetal cytochrome P450, P450 HFLa / Kitada M., Kamataki T., Itahashi K. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1985. - Vol. 131. - P. 1154 - 1159.
81. Human cytochrome P450 3A4: enzymatic properties of a purified recombinant fusion protein containing NADPH-P450 reductase / Shet M.S., Fisher C.W., Holmans P.L., Estabrook R.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1993. - Vol. 90. - P. 11748 - 11752.
82. Shimada T., Guengerich F.P. Evidence for cytochrome P450 NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1989. - Vol. 86. - P. 462 - 465.
83. Immunochemical study on the metabolism of lauric acid and arachidonic acid / Bains S.K., Gardiner S.M., Mannweiler K. et al. // *Biochem. Pharmacol.* - 1985. - Vol. 34. - P. 3221 - 3229.
84. Microsomal cytochrome P452 induction and peroxisome proliferation by hypo- lipidaemic agents in rat liver. A mechanistic inter-relationship / Sharma R., Lake B.G., Foster J., Gibson G.G. // *Biochem. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 37. - P. 1193 - 1201.
85. Sharma R., Lake B.G., Gibson G. Co-induction of microsomal cytochrome P452 and the peroxisomal fatty acid beta-oxidation pathway in the rat by clofibrate and di-(2-ethylhexyl)phthalate. Dose response studies // *Biochem. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 37. - P. 1203 - 1206.
86. Bacher M.A., Gibson G.G. Chlorophenoxyacid herbicides induce microsomal cytochrome P450 4A1 (P452) in rat liver // *Chem. - Biol. Interact.* - 1988. - Vol. 65, N 2. - P. 145 - 156.
87. Specificity of rabbit pulmonary cytochrome P450 isozymes in the metabolism of several aromatic amines and aflatoxin B1 to mutagenic products / Robertson I.G.C., Philpot R.M., Zeiger E., Wolf C.R. // *Mol. Pharmacol.* - 1981. - Vol. 20. - P. 662 - 668.
88. Nikolaou K., Masclet P., Mouvrier G. Source and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere. A critical review // *Sci. Total Environ.* - 1984. - Vol. 32. - P. 103 - 132.
89. Health effects of long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo -p-dioxin / Hoffman R.E., Stehr-Green P.A., Webb K.B. et al. // *JAMA.* - 1986. - Vol. 255. - P. 2031 - 2038.
90. Eisler R. Polychlorinated biphenyl hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A sinoptic review // *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.* - 1986. - Vol. 1. - P. 85.
91. Critical evaluation of polychlorinated biphenyl toxicity in terrestrial and marine mammals: Increasing impact of non-ortho and mono-ortho coplanar polychlorinated biphenyls from land to ocean / Kannan N., Tanabe S., Mutsuhiro O., Tatsukawa R. // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* - 1989. - Vol. 18. - P. 850 - 857.
92. Highly toxic coplanar PCBs: Occurrences, source, persistency, and toxic implications to wildlife and humans / Tanabe S., Kannan N., Subramanian A. et al. // *Environ. Pollut.* - 1987. - Vol. 47. - P. 147 - 163.
93. Fries G.F. The PBB episode in Michigan // *CRC Crit. Rev. Toxicol.* - 1986. - Vol. 16. - P. 105 - 156.
94. Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology and mechanisms of action // *CRC Crit. Rev. Toxicol.* - 1984. - Vol. 13. - P. 319 - 395.
95. Paasivirta J., Heinola K., Humppi T., et al. // *Chemosphere.* - 1985. - Vol. 14. - P. 469.
96. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Polynuclear aromatic compounds. Part 1: Chemical, environmental and experimental data. IARC. - Lyon, 1983. - Vol. 32. - 146 p.

97. Beaudoin A.R. Teratogenicity of polybrominated biphenyls in rats // *Environ. Res.* - 1977. - Vol. 14. - P. 81 - 86.
98. Cecil H.D., Bitman J. Toxicity of polybrominated biphenyls and its effects on reproduction of white leghorn hens // *Poultry Sci.* - 1978. - Vol. 57. - P. 1027 - 1036.
99. Fraker P.J. The antibody-mediated and delayed type hypersensitivity response of mice exposed to polybrominated biphenyls // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 1980. - Vol. 53. - P. 1 - 7.
100. Biochemical and cytogenetic effects in rats caused by short-term ingestion of Aroclor 1254 or Firemaster BP-6 / Garthoff L.H., Freidman L., Faber T.M. et al. // *J. Toxicol. Environ. Health.* - 1977. - Vol. 3. - P. 769 - 796.
101. Sleight S.D., Sanger V.L. Pathologic features of polybrominated biphenyl toxicosis in the rat and guinea pig // *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* - 1976. - Vol. 169. - P. 1231 - 1235.
102. Babish J.G., Gutenman W.H., Stoewsand G.S. Polybrominated biphenyls: tissue distribution and effect on hepatic microsomal enzymes in Japanese quail // *J. Agric. Food Chem.* - 1975. - Vol. 23. - P. 879 - 882.
103. Stimulation of hepatic and renal mixed-function oxidase in developing rats by polybrominated biphenyls / McCormack K.M., Cagen S.Z., Rickert D.E. et al. // *Chem.-Biol. Interact.* - 1979. - Vol. 7. - P. 252 - 259.
104. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues; a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450 / Burke M.D., Thompson C.R., Elcombe T.H. et al. // *Biochem. Pharmacol.* - 1985. - Vol. 34. - P. 3337 - 3345.
105. Induction of hepatic cytochrome P450 mediated alkoxy-resorufin O-dealkylase activities in different species by prototype inducers / Lubet R.A., Syi J., Nelson J.O., Nims R.W. // *Chem. Biol. Interact.* - 1990. - Vol. 75. - P. 325 - 339.
106. Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P450 1A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse / Nerurkar P.V., Park S.S., Thomas P.E. et al. // *Biochem. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 46. - P. 933 - 943.
107. Induction of cytochrome P450 and other drug-metabolizing enzymes in rat liver following dietary exposure to Aroclor 1254 / Lubet R.A., Jones R.C., Stockus D.L. et al. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 108. - P. 355 - 365.
108. Drug Metabolism - from Molecules to Man / Eds D.J. Benford, J.W. Bridges, G.G. Gibson - L.; N.Y.; Philadelphia: Taylor & Francis, 1987. - P. 263 - 274.
109. Goksoyr A., Husoy A.M. The cytochrome P450 1A1 response in fish: Application of immunodetection in environmental monitoring and toxicological testing // *Marine Environ. Res.* - 1992. - Vol. 34. - P. 147 - 150.
110. Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics / Ed. Schuster I.- L.; N.-Y.; Philadelphia: Taylor & Francis, 1989. - P. 679 - 684.
111. Stegeman J.J., Woodin B.R., Smolowitz R.M. Structure, function and regulation of cytochrome P450 forms in fish // *Biochem. Soc. Transact.* - 1990. - P. 19 - 21.
112. Stegeman J.J. Cytochrome P450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities // *Xenobiotica.* - 1989. - Vol. 19. - P. 1093 - 1110.
113. Cloned rainbow trout liver P(1)450 complementary DNA as a potential environmental monitor / Haasch M.L., Wejksnora K.J., Stegeman J.J., Lech J.J. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 98. - P. 362 - 368.
114. An ecotoxicological study of a population of the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) inhabiting a polychlorinated biphenyl-contaminated area / Batty J., Leavitt R.A., Biondo N. et al. // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* - 1990. - Vol. 19. - P. 283 - 290.
115. Environmental contaminants and biochemical responses in flatfish from the Hvaler Archipelago in Norway / Goksoyr A., Husoy A.M., Larsen H.E. et al. // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* - 1991. - Vol. 21. - P. 486 - 496.

116. Lower W.R., Kendall R.J. Sentinel species and sentinel bioassay // Biomarkers of Environmental Contamination / Eds J.F.McCarthy, L.R.Shugart. - Boca Raton. FL: Lewis Publications, 1990. - P. 168 - 179.
117. Индукция с помощью полициклических углеводородов активности монооксигеназ в тканях рыб и ее использование для биомониторинга загрязненных вод / Котелевцев С.В., Пономарева Л.В. и др. // Эксперим. онкология. - 1987. - N 5. - С. 46 - 49.
118. Induction of hepatic CYP1A activity as a biomarker for environmental exposure to Aroclor 1254 in feral rodents / Lubet R. A., Nims R.W., Beebe L.E. et al. // Arch. Environ. Contam. Toxicol. - 1992. - Vol. 22. - P. 339 - 344.
119. Poland A., Greenlee W.F., Kende A.S. Studies on the mechanism of action of the chlorinated dibenzo-p-furans and related compounds // Ann. N.Y. Acad. Sci. - 1979. - Vol. 320. - P. 214 - 230.
120. Comparative toxicity of four chlorinated dibenzo-p-dioxins (CDDs) and their mixture. Part III: Structure-activity relationship with increased plasma tryptophan levels, but no relationship to hepatic ethoxyresorufin o-deethylase activity / Weber L.W., Lebofsky M., Stahl B.U. et al. // Arch. Toxicol. - 1992. - Vol. 66. - P. 484 - 488.
121. Placental markers of human exposure to polychlorinated biphenyls and poly-chlorinated dibenzofurans / Lucier G.W., Nelson K.G., Everson R.B. et al. // Environ. Health Perspect. - 1987. - Vol. 76. - P. 79 - 87.
122. Alkoxyresorufin o-dealkylases: association with the murine Ah locus / Lum P.Y., Burke R.T., Mayer R.T., Ioannides C. // Cancer Lett. - 1986. - Vol. 32. - P. 255 - 262.
123. Novak J. Jr., Qualis C.W. Jr. Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on the hepatic cytochrome P450 metabolism of various alkoxyresorufin ethers in the cotton rat (*Syngmodon hispidus*) // Comp. Biochem. Physiol. - 1990. - Vol. 94C. - P. 543 - 545.
124. Influence of biological factors on hepatic steroid and xenobiotic metabolism in fish: Interaction with PCB and beta-naphthoflavone / Forlin L., Andersson T., Koivusaari U., Hansson T. // Marine Environ. Res. - 1984. - Vol. 14. - P. 47 - 58.
125. Effects of ortho- and non-ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic monooxygenase system in scup (*Stenotomus chrysops*) / Gooch J.W., Elskus A.A., Klopper-Sams P.J. et al. // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 1989. - Vol. 98. - P. 422 - 433.
126. Payne J.F., Fancey L.L., Kiceniuk J. et al. // Marine Environ. Res. - 1985. - Vol. 17. - P. 323 - 325.
127. Stegeman J.J., Klopper-Sams P.J. Cytochrome P450 isoenzymes and monooxygenase activities in aquatic animals // Environ. Health Perspect. - 1987. - Vol. 71. - P.87-95.
128. Addison R.F., Sadler M.C., Lubet R.A. Absence of hepatic microsomal pentyl- or benzyl-resorufin-O-deethylase induction in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) treated with phenobarbitone // Biochem. Pharmacol. - 1987. - Vol. 36. - P. 1183 - 1184.
129. Andersson T., Pesonen M., Johansson C. // Biochem. Pharmacol. - 1985. - Vol. 36. - P. 3309 - 3312.
130. Ankley G.T., Reinert R.E., Mayer R.T. Metabolism of alkoxyphenoxazones by channel catfish liver microsomes: Effects of phenobarbital, Aroclor 1254 and 3-methylcholanthrene // Biochem. Pharmacol. - 1987. - Vol. 36. - P. 1379 - 1381.
131. Klopper-Sams P.J., Stegeman J.J. The temporal relationships between P450e protein content, catalytic activity and mRNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with b-naphthoflavone // Arch. Biochem. Biophys. - 1989. - Vol. 1. - P. 525-535.
132. Lech J.J., Bend J.R. // Environ. Health Perspect. - 1980. Vol. 34. - P. 115.
133. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring / Payne J.F., Fancey L. L., Rahimtula A.D., Porter E.L. // Compar. Biochem. Physiol. - 1987. - Vol. 86C. - P. 233 - 238.

134. O'Brien D.J., Kaneene J.B., Poppenga R.H. The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment // *Environ. Health Perspect.* - 1993. - Vol. 99. - P. 351 - 368.

135. Lubet R.A., Guengerich F.P., Nims R.W. The induction of alkoxyresorufin metabolism: a potential indicator of environmental contamination // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* - 1990. - Vol. 19. - P. 157 - 163.

136. Simmons G.J., McKee M.J. Alkoxyresorufin metabolism in white-footed mice at relevant environmental concentrations of Aroclor 1254 // *Fundam. Appl. Toxicol.* - 1992. - Vol. 19. - P. 446 - 452.

137. Elangbam C.S., Qualls C.W. Jr, Lochmiller R.L. O-dealkylation of resorufin ethers as an indicator of hepatic cytochrome P450 isoenzyme induction in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*): a method for monitoring environmental contamination // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* - 1991. - Vol. 47. - P. 23 - 28.

138. Elangbam C.S., Qualls C.W., Confer A.W. Evaluation of ultrastructural hepatic response to environmental toxicants in wild cotton rats (*Sigmodon hispidus*) // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* - 1991. - Vol. 47. - P. 321 - 328.

139. Development of the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) as abiomonitor of environmental contamination with emphasis on hepatic cytochrome P450 induction and population characteristics / Elangbam C.S., Qualls C.W. Jr, Lochmiller R.L., Novak J. // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* - 1989. - Vol. 42. - P. 482 - 488.

140. Hinks J.R., Brindley W.A. Effect of varying inducer type and dose on hepatic monooxygenase activity in the mountain vole *Microtus montanus* // *Comp. Biochem. Physiol.* - 1986. - Vol. C85. - P. 385 - 389.

141. Иммунохимический анализ индукции изоформ цитохрома P-450 в печени пресноводных рыб 3-метилхолантеном, б-нафтафлавоном и Арохлором 1254 / Котелевцев С.В., Пономарева Л.В., Новиков К.Н. и др. // *Биол. науки.* - 1990. - N 5. - С. 23 - 29.

142. Comparison of xenobiotic biotransformation enzymes in kidney and liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) / Pesonen M., Celander M., Forlin L., Andersson T. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 91. - P. 75 - 84.

143. Species characteristics of the hepatic xenobiotic and steroid biotransformation system of two teleost fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) / Goksoyr A., Andersson T., Hansson T. et al. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 89. - P. 347 - 360.

144. Specificity and cross-reactivity of monoclonal and polyclonal antibodies against cytochrome P450e of marine fish scup / Klopper-Sams P.J., Park S.S., Gelboin H.V., Stegeman J.J. // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1987. - Vol. 253. - P. 268 - 278.

145. Stegeman J.J., Klopper-Sams P.J., Farrington J.W. Monooxygenase induction and chlorobiphenyls in the deep-sea fish *Coryphaenoides armatus* // *Science.* - 1986. - Vol. 231. - P. 1287 - 1289.

146. Mixed-function oxidase induction as a test for the biological monitoring of water: limitations and prospects / Arillo A., Bagnasco M., Bennicelli C. et al. // *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* - 1992. - Vol. 68. - P. 543 - 548.

147. Oikari A., Jimenez B. Effects of hepatotoxicants on the induction of microsomal monooxygenase activity in sunfish liver by beta-naphthoflavone and benzo[a]pyrene // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* - 1992. - Vol. 23. - P. 89 - 102.

148. Elskus A.A., Pruell R., Stegeman J.J. Endogenously-mediated, pretranslational suppression of cytochrome P450 1A in PCB-contaminated flounder // *Marine Environ. Res.* - 1992. - Vol. 34. - P. 97 - 101.

149. Elskus A.A., Stegeman J.J. Further consideration of phenobarbital effects on cytochrome P450 activity in the killifish, *Fundulus heteroclitus* // *Comp. Biochem. Physiol.* - 1989. - Vol. 92. - P. 223 - 230.

150. Induction of P450 isoenzyme activities in Sirian golden hamster liver compare to rat liver as probed by the rate of 7-alkoxyresorufin-O-dealkylation / Blaich G., Gottlicher M., Cikryt P. et al. // *Chem-Biol. Interact.* - 1988. - Vol. 67. - P. 129 - 138.
151. Induction of hepatic CYP1A in male F344/NCr rats by dietary exposure to Aroclor 1254: examination of immunochemical, RNA, catalytic, and pharmacokinetic endpoints / Nims R.W., Beebe L.E., Dragnev K.H. et al. // *Environ. Res.* - 1992. - Vol. 59. - P. 447 - 466.
152. Hepatic CYP1A1 induction in rainbow trout by continuous flowthrough exposure to  $\beta$ -naphthoflavone / Haasch M.L., Quardokus E.M., Sutherland L.A. et al. // *Fundam. Appl. Toxicol.* - 1993. - Vol. 20. - P. 72 - 82.
153. Stegeman J.J., Smolowitz R.M., Hahn M.E. Immunohistochemical localization of environmentally induced cytochrome P450 IA1 in multiple organs of the marine teleost *Stenotomus chrysops* (Scup) // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 1991 - Vol. 110. - P. 486- 504.
154. Smolowitz R.M., Hahn M.E., Stegeman J.J. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 IA1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenil and by 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurane in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup) // *Drug Metab. Dispos.* - 1991. - Vol. 19. - P. 113 - 116.
155. Knight G.C., Walker C.H. A study of the hepatic monooxygenase of sea birds and its relationship to organochlorine pollutant // *Comp. Biochem. Physiol.* - 1982. - Vol. 73. - P. 211 - 221.
156. Bhatia A., Mazzucco K. Wild mice as a bioindicator for pollution monitoring // *Abstracts of 8th International Conference on Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology.* - Lisbon, 1993. - P. 209.
157. Wild mice as biomonitoring of anthropogenic pollutions of Altai region / Grishanova A.Yu., Gulyaeva L.F., Lyakhovich V.V., Slyn'ko N.M. // *Toxicology of Industrial Compound. Proceedings of European ISSX Workshop. USA; ISSX Proceedings.* - 1994. - Vol. 5. - P. 37.
158. Ingestion of soil contaminated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters hepatic enzyme activities in rats / Lucier G.W., Rumbaugh R.C., McCoy Z. et al. // *Fundam. Appl. Toxicol.* - 1986. - Vol. 6. - P. 364 - 371.
159. Dioxin in soil: Bioavailability after ingestion of by rats and guinea pigs / McConnell E.E., Lucier G.W., Rumbaugh R.C. et al. // *Science.* - 1984. - Vol. 223. - P. 1077-1079.
160. Umbreit T.H., Hesse E.J., Gallo M.A. Reproductive toxicity in female mice of dioxine-contaminated soil from a 2,4,5,-trichlorophenoxyacetic acid manufacturing site // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* - 1987. - Vol. 16. - P. 461 - 466.
161. Umbreit T.H., Hesse E.J., Gallo M.A. Bioavailability of dioxin in soil from a 2,4,5-T manufacturing site // *Science.* - 1986. - Vol. 232. - P. 497 - 499.
162. Long-term effects of bleached kraft mill effluents on carbohydrate metabolism and hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in fish / Andersson T., Bengtsson B.E., Forlin L. et al. // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* - 1987. - Vol. 13. - P. 53 - 60.
163. Aryl hydrocarbon hydroxylase in lymphocytes and lung tissue from lung cancer patients and controls / Karki N.T., Pokela R., Nuntinen L., Pelkonen O. // *Int. J. Cancer.* - 1987. - Vol. 39. - P. 565 - 570.
164. Variations in aryl hydrocarbon hydroxylase activities in mitogen-activated human and non-human primate lymphocytes / Kouri R.E., McKinney C.E., Levine A.S. et al. // *Toxicol. Pathol.* - 1984. - Vol. 12. - P. 44 - 48.
165. Исследование ферментов монооксигеназного окисления в лимфоцитах и печени людей, подвергшихся воздействию хлорфеноксигербицидов / Осташевский В.А., Герасимов К.Е., Цырлов И.Б., Румак И.С. // *Изв. РАН. Сер. биол.* - 1994. - N 1. - С. 56 - 63.
166. Safe S., Harris M., Zacharewski T. Development and validation of bioassays for polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans // *IARC Sci. Publ.* - 1991. - Vol. 108. - P. 147 - 159.

167. Expression of the CYP1A1 gene in peripheral lymphocytes as a marker of exposure to creosote in railroad workers / Cosma G.N., Toniolo P., Currie D.M. et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* - 1992. - Vol. 1. - P. 137 - 142.
168. Inhibitor panel studies of human hepatic and placental cytochrome P450-associated monooxygenase activities / Pasanen M., Taskinen T., Sotaniemi E.A. et al. // *Pharmacol. & Toxicol.* - 1988. - Vol. 62. - P. 311 - 317.
169. Pelkonen O., Karki N.T., Tuimala R. Relationship between cord blood and maternal blood lymphocytes and term placenta in the induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity // *Cancer Lett.* - 1981. - Vol. 13. - P. 103 - 110.
170. Correlation of placental microsomal activities with protein detected by antibodies to rabbit cytochrome P450 isozyme 6 in preparations from humans exposed to polychlorinated biphenyls, quaterphenyls, and dibenzofurans / Wong T.K., Domin B.A., Bent P.E. et al. // *Cancer.* - 1986. - Vol. 46. - P. 999 - 1004.
171. Species variation in the response of the cytochrome P450 dependent monooxygenase system to inducers and inhibitors / Boobis A.R., Sesardic D., Murray B.P. et al. // *Xenobiotica.* - 1990. Vol. 20. - P. 1139 - 1161.
172. Giudicelli J.F., Tillement J.P. Influence of sex on drug kinetics in man // *Clin. Pharmacokin.* - 1977. - Vol. 2. - P. 157 - 166.
173. Biehl J.P. Emergence of drug resistance as related to the dosage and metabolism of isoniazid // *Trans. 16th Conf. Chemother. Tuberc.* - Washington D.C.: U.S. Veterans Adm. Army Navy, 1957. - P. 108 - 113.
174. Mitchell R.S., Bell J.C. Clinical implications of isoniazid PAS and streptomycin blood levels in pulmonary tuberculosis // *Trans. Amer. Clin. Clim. Ass.* - 1957. - Vol. 69. - P. 98 - 105.
175. New information on the clinical implications of individual variations in the metabolic handling of antituberculous drugs particularly isoniazid / Mitchell R.S., Riemensnyder D.K., Harsh J.R., Bell J.C. // *Trans 17th Conf. Chemother. Tuberc.* - Washington D. C.: U.S. Veterans Adm. Army Navy, 1958. - P. 77 - 85.
176. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man / Mahgoub A., Dring L.G., Idle J.R., et al. // *Lancet.* - 1977. - Vol. 2. - P. 584 - 585.
177. Mephenytoin hydroxylation deficiency in Caucasians: Frequency of a new oxidative drug metabolism polymorphism / Wedlund P.J., Aslanian W.S., McAllister C.G. et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 1984. - Vol. 36. - P. 773 - 780.
178. Wilkinson G.R. Clearance approaches in pharmacology // *Pharmacol. Rev.* - 1987. - Vol. 39. - P. 1 - 47.
179. Inhibition des cytochromes P450. Mécanismes biochimiques et conséquences thérapeutiques éventuelles. I- Inactivation par complexation réversible / Jayyosi Z., Livertoux M.H., Batt A.M., Siest G. // *J. Toxicol. Clin. Exper.* - 1991. - Vol. 11. - P. 9 - 30.
180. Murrey M., Reidy G. Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P450 by chemical agents // *Pharmacol. Rev.* - 1990. - Vol. 42. - P. 85 - 101.
181. Kunze K., Trager W.F. Mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafilline // *ISSX Proceedings.* - 1992. - Vol. 2. - P. 16.
182. Parsons W.D., Neims A.D. Effects of smoking on caffeine clearance // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 1978. - Vol. 24. - P. 40 - 45.
183. Grygiel J.J., Birkett D.J. Cigarette smoking and theophylline clearance and metabolism // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 1981. - Vol. 30. - P. 491 - 496.
184. Jusko W.J. Role of tobacco smoking in pharmacokinetics // *J. Pharmacokin. Biopharm.* - 1978. - Vol. 6. - P. 7 - 39.
185. Studies on the metabolism of aminopyrine, antipyrine and theophylline using monoclonal antibodies to cytochrome P450 isozymes purified from rat liver/ Slusher L.B., Park S.S., Gelboin H.V., Vesell E.S. // *Biochem. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 36. - P. 2359-2367.

186. Proc. of the 8th Intern. Symp. on Microsomes and Drug Oxidation. - Stockholm, 1990. - P. 96 - 218.
187. Kinetics of caffeine metabolism in control and 3-methylcholanthrene-induced rat liver microsome / Bonati M., Celardo A., Galletti F. et al. // *Toxicol. Lett.* - 1984. - Vol. 21. - P. 53 - 58.
188. Shiveli A., Vesell E.S. In vivo and in vitro biotransformation of theobromine by phenobarbital and 3-methylcholanthrene-inducible cytochrome P450 monooxygenases in rat liver. Role of thiol compounds // *Drug Metab. Dispos.* - 1987. - Vol. 15. - P. 217 - 224.
189. Theophylline metabolism features in liver microsomes of Wistar rats treated with different inducers / Vavilin V., Gromova O., Grishanova A. et al. // Proc. of the 7<sup>th</sup> Intern. Conferenc "Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics" / Eds A.I. Archakov, G.I. Bachmanova. - M., 1991. - P. 641.
190. Welch R.M., Hsu S.Y., De Angelis R.L. Effect of Aroclor 1254, phenobarbital and polycyclic aromatic hydrocarbons on the plasma clearance of caffeine in the rat // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 1977. - Vol. 22. - P. 791 - 798.
191. Matthew D.E., Houston J.B. Drug metabolizing capacity in vitro and in vivo- I. Correlations between hepatic microsomal monooxygenase markers in b-naphthoflavone-induced rats // *Biochem. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 40. - P. 743 - 749.
192. Matthew D.E., Houston J.B. Drug metabolizing capacity in vitro and in vivo- II. Correlation between hepatic microsomal monooxygenase markers in phenobarbital-induced rats // *Biochem. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 40. - P. 751 - 758.
193. Theophylline metabolism by multiple forms of cytochrome P450 / Lyakhovich V., Mishin V., Vavilin V. et al. // Abstracts of 11th European Workshop on Drug Metabolism. - Konstanz, 1988. - P. 1.75.
194. Caffeine and theophylline biotransformation in cells expressing a single cytochrome P450 isozyme / Fuhr U., Doehmer J., Janssens C. et al. // 3th Intern. ISSX Meeting. - Amsterdam, 1991. - P. 145.
195. Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver/ Berthou F., Ratanasavanh D., Riche C. et al. // *Xenobiotica.* - 1989. - Vol. 19. - P. 401 - 417.
196. Methylcholanthrene but not phenobarbital enhances caffeine and theophylline metabolism in cultured adult human hepatocytes / Ratanasavanh D., Berthou F., Dreano Y. et al. // *Biochem. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 39. - P. 85 - 94.
197. Characterisation of theophylline metabolism by human liver microsomes / Robson R.A., Mathews A.P., Miners J.O. et al. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 24. - P. 293 - 300.
198. Studies on in vitro antipyrine metabolism by <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N double labelled method / Nakagawa A., Nakamura K., Maeda K. et al. // *Life Sci.* - 1987. - Vol. 41. - P. 133 - 143.
199. Influence of 9-hydroxyellipticine and 3-methylcholanthrene treatment on antipyrine metabolite formation in vivo/ Teunissen M.W.E., Joeres R.P., Vermeulen N.P.E. et al. // *Xenobiotica.* - 1983. - Vol. 13. - P. 223 - 231.
200. Correlation between in vivo antipyrine metabolite formation and theophylline metabolism in rats/ Teunissen M.W.E., Brorens I.O.N., De Langen H.J. et al. // *Pharmac. Res.* - 1986. - Vol. 3. - P. 156 - 161.
201. Relationship between the metabolism of antipyrine, hexobarbitone and theophylline in man as assessed by a 'cocktail' approach / Schellens J.H.M., Van Der Wart J.H.F., Van Der Velde E.A., Breimer D.D. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 26. - P. 373 - 384.
202. Correlation between the in vivo metabolism of hexobarbital and antipyrine in rats / Van Der Graaff M., Vermeulen N.P.E., Joeres R.P. et al. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1983. - Vol. 227. - P. 459 - 465.
203. Elimination of antipyrine and theophylline in aluminium manufacture workers / Vavilin V., Kesova I., Voscovets M. et al. // 4<sup>th</sup> Europ. ISSX Meeting. - 1992. - Vol. 1. - P.64.

204. The caffeine breath test and caffeine urinary metabolite ratios in the Michigan cohort exposed to polybrominated biphenils: A preliminary study / Lambert G.H., Schoeller D.A., Humphrey H.E.B. et al. // *Environ. Health Perspect.* - 1990. - Vol. 89. - P. 175 - 181.
205. Elimination of antipyrine, its metabolites and N-acetylsulphadimidine in Caucasians incomers of West Yakutia / Macarova S., Vavilin V., Gromova O. et al. // *ISSX Proceedings.* - 1993. - Vol. 3. - P. 193.
206. Фармакокинетика антипирина у больных ИБС до и после лечения гелий-неоновым лазером / Ляхович В.В., Вавилин В.А., Файбушевич А.А. и др. // Тезисы докладов конференции "Современные методы контроля лазерного облучения крови и оценки эффективности лазерной терапии". - Новосибирск, 1990. - С. 57 - 58.
207. Identification of an inducible form of cytochrome P450 in human liver/ Watkins P.B., Wrighton S.A., Maurel P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1985. - Vol. 82. - P. 6310 - 6314.
208. Characterisation of rat and human liver microsomal P450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism / Guengerich F.P., Martin M.V., Beanue P.H. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1986. - Vol. 261. - P. 5051 - 5060.
209. Guengerich F.P. Characterization of human microsomal cytochrome P450 enzymes // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1989. - Vol. 29 - P. 241 - 264.
210. Variability in nifedipine pharmacokinetics and dynamics: a new oxidation polymorphism in man / Kleinbloesem C.H., van Brummelen P., Faber H. et al. // *Biochem. Pharmacol.* - 1984. - Vol. 33. - P. 3721 - 3724.
211. Schellens J.H.M., Soons P.A., Breimer D.D. Lack of bimodality in nifedipine plasma kinetics in a large population of healthy subjects // *Biochem. Pharmacol.* - 1988. - Vol. 37. - P. 2507 - 2510.
212. Complete cDNA sequence of a cytochrome P450 inducible by glucocorticoids in human liver / Molowa D.T., Schuetz E.G., Wrighton S.A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1986. - Vol. 83. - P. 5311 - 5315.
213. Demonstration of multiple species of inducible hepatic cytochromes P450 and their mRNAs related to glucocorticoid-inducible cytochrome P450 of the rat / Wrighton S.A., Schuetz E.G., Watkins P.B. et al. // *Mol. Pharmacol.* - 1985. - Vol. 28. - P. 312 - 321.
214. Gonzalez F.J., Song B.-J., Hardwick J.P. Pregnenolon-16 a-carbonitrile-inducible P450 gene family: gene conversion and differential regulation // *Mol. Cell Biol.* - 1986. - Vol. 6. - P. 2969 - 2976.
215. Human P450 PCN1: sequence, chromosome localization, and direct evidence that P450 PCN1 is nifedipine oxidase/ Gonzalez F. J., Schmidt B.J., Umeno M. et al. // *DNA.* - 1988. - Vol. 7. - P. 79 - 86.
216. Isolation and sequence determination of a cDNA clone related to human cytochrome P450 nifedipine oxidase/ Beanue P.H., Umbenhauer D.R., Bork R.W. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1986. - Vol. 83. - P. 8064 - 8068.
217. Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6b-hydroxylase cytochrome P450 enzyme / Waxman D.J., Attisano C., Guengerich F.P., Lapenson D.P. // *Arch. Biochem. Biophys.* -1988. - Vol. 263. - P.424-436.
218. Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin-inducible human-liver cytochrome P450 (cyclosporin-oxidase) as a product of P450III<sub>A</sub> gene subfamily / Combalbert J., Fabre I., Fabre G. et al. // *Drug Metab. Dispos.* - 1989. - Vol. 17. - P. 197 - 207.
219. Sartori E., Delaforge M. Specific drug binding to rat liver cytochrome P450 isozymes induced by pregnenolone-16a-carbonitrile and macrolide antibiotics. Implications for drug interactions // *Chem.-Biol. Interact.* - 1990. - Vol. 73. - P. 297 - 307.
220. Kronbach T., Fisher V., Meyer U.A. Cyclosporine metabolism in human liver: Identification of a cytochrome P450 III<sub>A</sub> gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme ex-

plains interactions of cyclosporine with other drugs // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 1988. - Vol. 43. - P. 630 - 635.

221. Species differences in the toxicity and cytochrome P450 IIIA-dependent metabolism of digitoxin / Eberhart D.C., Gemzik B., Halvorson M.R. et al. // *Mol. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 40. - P. 859 - 867.

222. In vitro hepatic, renal, and pulmonary N-dealkylation of amiodarone / Rafeiro E., Leeder R.J., Daniels J.M. et al. // *Biochem. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 39. - P. 1627- 1629.

223. Babany J., Larrey D., Pessayre D. Macrolide antibiotics as inducers and inhibitors of cytochrome P450 in experimental animals and man // *Progress in Drug Metabolism* / Ed. G.G. Gibson. - London, 1988. - Vol. 11. - P. 61 - 98.

224. The increase of urinary excretion of 6 b-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450 IIIA induction / Ged C., Rouillon J.M., Pichard L. et al. // *Brit. J. Clin. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 28. - P. 373 - 388.

225. Boggiano B.G., Glesson M. Gastric inactivation of erythromycin stearate in solid dosage forms // *J. Pharmacol. Sci.* - 1976. - Vol. 65. - P. 497 - 502.

226. Decomposition kinetics of erythromycin A in acidic aqueous solution / Cachet T., Van den Mooter G., Hauchecorne R. et al. // *Int. J. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 55. - P. 59-65.

227. Stupans I., Sansons L. The inhibition of drug oxidation by anhydroerythromycin, an acid degradation product of erythromycin // *Biochem. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 42. - P. 2085 - 2090.

228. Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P450; studies in rats and patients / Watkins P.B., Murray S.A., Winkelman L.G. et al. // *J. Clin. Invest.* - 1989. - Vol. 83. - P. 688 - 697.

229. Ramsh K.D., Sommer J. Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine // *Hypertension.* - 1983. - Vol. 5 (Suppl 2). - P. 18 - 24.

230. A simple noninvasive procedure for the investigation of cytochrome P450 IIIA dependent enzymes in humans/ Bienvenu T., Rey Y., Pons G. et al. // *Intern. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* - 1991. - Vol. 29. - P. 441 - 445.

231. Case-control study of cigarette smoking and primary hepatoma in an aflatoxin-endemic region of China: a protective effect / Lin L., Yang F., Ye Z. et al. // *Pharmacogenetics.* - 1991. - Vol. 1. - P. 79 - 85.

232. Family study of a genetically determined deficiency of mephenytoin hydroxylation in man / Kupfer A., Desmond P., Schenker S., Branch R. // *Pharmacologist.* - 1979. - Vol. 21. - P. 173.

233. Inaba T. Genetic polymorphism of mephenytoin metabolism // *Ethnic Differences in Reactions to Drugs and Xenobiotics.* - Alan R. Liss, Inc., 1986. - P. 139 - 156.

234. Importance of genetic factors in the regulation of diazepam metabolism. Relationship to S-mephenytoin, but not debrisoquine hydroxylation phenotype / Bertillon L., Hentborn T.K., Sanz E. et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 1989. - Vol. 45. - P. 348 - 355.

235. Oxidative metabolism of hexobarbital in human liver: relationship to polymorphic S-mephenytoin hydroxylation / Knodell R.G., Dubey R.K., Wilkinson G.R., Guengerich F.P. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1988. - Vol. 245. - P. 845 - 849.

236. Characterization and inhibition of mephenytoin 4-hydroxylase activity in human liver microsomes / Hall S.D., Guengerich F.P., Branch R.A., Wilkinson G.R. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1987. - Vol. 240. - P. 216 - 222.

237. Hepatic metabolism of tolbutamide. Characterization of the form of cytochrome P450 involved in methyl hydroxylation and relationship to in vivo disposition / Knodell R.G., Hall S.D., Wilkinson G.R., Guengerich F.P. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* - 1987. - Vol. 241. - P. 1112 - 1119.

238. Human anti-endoplasmic reticulum antibody appearing in a drug -induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P450 that hydroxylates the drug / Beanue P., Dansette P.M., Mansuy D. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1987. Vol. 84. - P. 351 - 355.

239. Propranolol's metabolism is determined by both mephenytoin and debrisoquine hydroxylase activities / Ward S.A., Walle T., Walle U.K. et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 1989. - Vol. 45. - P. 72 - 79.
240. Shimada T., Misono K.S., Guengerich F.P. Human liver microsomal 4-mephenytoin hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism: purification and characterization of two similar forms involved in the reaction // *J. Biol. Chem.* - 1986. - Vol. 261. - P. 909 - 921.
241. Cloning and sequence determination of a complementary DNA related to human liver microsomal cytochrome P450 S-mephenytoin 4-hydroxylase / Umbenhauer D.R., Martin M.V., Lloyd R.S., Guengerich F.P. // *Biochemistry.* - 1987. - Vol. 26. - P. 1094 - 1099.
242. Characterization of cDNAs and mRNAs, and proteins related to human liver microsomal cytochrome P450 S-mephenytoin 4'-hydroxylase/ Ged C., Umbenhauer D.R., Bellew T.W. et al. // *Biochemistry.* - 1988. - Vol. 27. - P. 6929 - 6940.
243. Meier U.T., Meyer U.A. Genetic polymorphism of human cytochrome P450 (S)-mephenytoin 4-hydroxylase. Studies with human autoantibodies suggest a functionally altered cytochrome P450 isozyme as a cause of the genetic deficiency // *Biochemistry.* - 1987. - Vol. 26. - P. 8466 - 8474.
244. Cloning and expressing of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450 IIC subfamily / Romkes M., Faletto M.B., Blaisdell J.A. et al. // *Biochemistry.* - 1991. - Vol. 30. - P. 3247 - 3255.
245. Induction of polymorphic 4'-hydroxylation of S-mephenytoin by rifampicin / Zhou H.H., Antony L.B., Wood A.J.J., Wilkinson G.R. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 30. - P. 471 - 475.
246. Zilly W., Breimer D.D., Richter E. Induction of drug metabolism in man after rifampicin treatment measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* - 1975. - Vol. 9. - P. 219 - 227.
247. Kinetics of hexobarbital and dipyrone in critical care patients receiving high-dose pentobarbital / Heinemeyer G., Gramm H.-J., Simgen W. et al. // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* - 1987. - Vol. 32. - P. 273 - 277.
248. Regio- and stereoselective metabolism of two C19 steroids by five highly purified and reconstituted rat hepatic cytochrome P450 isozymes / Wood A.W., Ryan D.E., Thomas P.E., Levin W. // *J. Biol. Chem.* - 1983. - Vol. 258. - P. 8839 - 8847.
249. Tanaka E., Etoh H., Mitsawa S. The effects of selective cytochrome P450 inducing agents on trimethadione metabolism as an indicator of hepatic drug-oxidizing capacity in rats // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 68. - P. 375 - 378.
250. Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1 / Aoyama T., Yamano S., Guzelian P.S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1990. - Vol. 87. - P. 4790 - 4793.
251. Le Blanc G.A., Waxman D.J. Interaction of anticancer drugs with hepatic monooxygenase enzymes // *Drug Metab. Rev.* - 1989. - Vol. 20. - P. 395 - 439.
252. Kalow W. Interethnic variation of drug metabolism // *TiPS.* - 1991. - Vol. 12. - P. 102 - 107.
253. Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype: analysis of common mutations and alleles of CYP2D6 in a European population / Broly F., Gaedic A., Heim M. et al. // *DNA and Cell Biol.* - 1991. - Vol. 10. - P. 545 - 548.
254. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine / Johansson I., Lundquist E., Bertillon L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1993. - Vol. 90. - P. 11825 - 11829.
255. Caporaso N.E., Shaw G.L. Clinical implications of the competitive inhibition of the debrisoquin-metabolizing isozyme by quinidine // *Arch. Intern. Med.* - 1991. - Vol. 151. - P. 1985 - 1992.

256. Fonne-Pfischer R., Bargetzi M.J., Meyer U.A. MPTP, the neurotoxin inducing Parkinson's disease is a potent competitive inhibitor of human and rat cytochrome P450 isozymes (P450buf 1, P450db 1) catalyzing debrisoquine 4-hydroxylation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1987. - Vol. 148. - P. 1144 - 1150.
257. Polymorphic oxidation of debrisoquine in bladder cancer / Benitez J., Ladero J.M., Fernandez-Gundin M.J. et al. // *Ann. Med.* - 1990. - Vol. 22. - P. 157 - 160.
258. Shahi G.S., Das N.P., Moochhala S.M. Parkinson's disease and cytochrome P450: a possible link? // *Medical hypotheses.* - 1990. - Vol. 32. - P. 277 - 282.
259. CYP2D6 genotypes in Parkinson's disease / Daly A.K., Armstrong M., Cholerton S. et al. // *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 3. - P. 250.
260. Полиморфизм окисления пахикарпина / Пиотровский В.К., Белолипецкая В.Г., Румянцев Д.О., Метелица В.И. // *Экспер. клин. фармакология.* - 1992.- Т. 55.- С. 56-58.
261. Purification and characterization of ethanol-inducible human hepatic cytochrome P450 HLj / Wrighton S.A., Thomas P.E., Ryan D.E., Lewin W. // *Archiv. Biochem. Biophys.* - 1987. - Vol. 258. - P. 292 - 297.
262. Purification and characterization of human liver cytochrome P450-ALC / Las- ker J.M., Raucy J., Kubota S. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1987. - Vol. 148. - P. 232 - 238.
263. Human liver cytochrome P450 IIE1: a major catalyst in acetaminophen activation / Raucy J., Black M., Lieber C. et al. // *FASEB J.* - 1988. - Vol. 2. - P. A1341.
264. Yoo J.S.H., Guengerich F.P., Yang C.S. Metabolism of nitrosodialkylamines by human liver microsomes // *Cancer Res.* - 1988. - Vol. 48. - P. 1499 - 1504.
265. Guengerich F.P., Kim D.-H., Iwasaki M. Role of human cytochrome P450 IIE1 in the oxidation of several low molecular weight cancer suspects // *Chem. Res. Toxicol.* - 1991. - Vol. 4. - P. 168 - 179.
266. Cytochrome P450 IIE1: roles in nitrosoamine metabolism and mechanism of regulation / Yang C.S., Yoo J.S.H., Ishizaki H., Hong J. // *Drug. Metab. Rev.* - 1990. - Vol. 22. - P. 147 - 159.
267. Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P450 in rat liver, an isozyme homologous to rabbit liver cytochrome P450 isozyme 3a / Ryan D.E., Koop D.R., Thomas P.E. et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1986. - Vol. 246. - P. 633-644.
268. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P450 IIE1 / Peter R., Bocker R.G., Beanue P.H. et al. // *Chem. Res. Toxicol.* - 1990. - Vol. 3. - P. 566 - 573.
269. High-performance liquid chromatographic determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in serum: a tool for indirect evaluation of cytochrome P450 2E1 activity in humans / Lucas D., Berthou F., Girre C. et al. // *J. Chromatograph.* - 1993. - Vol. 622. - P. 79 - 86.
270. On the specificity of chlorzoxazone as drug probe of cytochrome P450 2E1 / Berthou F., Carriere V., Ratanasavanh D. et al. // *ISSX Proceedings.* - 1993.- Vol. 3. - P.116.
271. Casazza J.P., Fu J.L. Measurement of acetol in serum // *Analyt. Biochem.* - 1985. - Vol. 148. - P. 344 - 348.
272. Acetone hydroxylase activity in male Wistar rats treated with different cytochrome P450 inducers / Kozlovskaya N.E., Vavilin V.A., Mishin V.M., Lyakhovich V.V. // *Proc. 12<sup>th</sup> European Workshop on Drug Metabolism.* - Basel, 1990.
273. Kawajiri K., Watanabe J., Hayashi S.-I. Roles in genetics polymorphism of drug metabolizing enzymes in humans // *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 3 (Suppl.). - P. L45.
274. Breimer D.D., Schellens J.H.M. A "cocktail" strategy to assess in vivo oxidative drug metabolism in humans // *TiPS.* - 1990. - Vol. 11. - P. 223 - 225.
275. Influence of enzyme induction and inhibition on the oxidation of nifedipine, sparteine, mephenytoin and antipyrine in humans as assessed by a "cocktail" study design / Schellens J.H.M., van der Wart J.H.F., Brugman M., Breimer D.D. // *J. Pharm. Exper. Ther.* - 1989. - Vol. 249. - P. 638 - 645.

276. N-acetylation and debrisoquine type oxidation polymorphism in Caucasians - with reference to age and sex / Siegmund W., Hanke W., Zschesche M. et al. // *Intern. J. Clin. Pharmacol. Toxicol.* - 1990. - Vol. 28. - P. 504 - 509.
277. Dextromethorphan and caffeine as probes for simultaneous determination of debrisoquin-oxidation and N-acetylation phenotypes in children / Evans W.E., Relling M.E., Petros W.P. et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 1989. - Vol. 45. - P. 568 - 573.
278. Hartman N.R., Jardin I. Mass spectrometric analysis of cyclosporine metabolites // *Biomed. Mass Spectrum.* - 1986. - Vol. 13. - P. 361 - 372.
279. Correlation of human P450 2C subfamily substrate specificities with primary structures - warfarin as a probe / Kaminsky L.S., de Morais S., Faletto M.B. et al. // *ISSX Proceedings.* - 1993. - Vol. 3. - P. 12.
280. Heidelberg C. Chemical carcinogenesis // *Ann. Rev. Biochem.* - 1975. - Vol. 44. - P. 79 - 121.
281. Tumours of urinary bladder workmen engaged in manufacture and use of certain dye-stuff intermediators in British chemical industry: role of aniline, a-naphtylamine and b-naphtylamine / Case R.A.M., Hosker M.E., McDonald D.B., et al. // *Br. J. Ind. Med.* - 1954. - Vol. 11. - P. 75 - 80.
282. Woo Y.-T., Arcos J.C., Lai D.Y. Metabolic and chemical activation of carcinogenesis: an overview // *Chemical Carcinogenesis: Activation Mechanisms, Structural and Electronic Factors and Reactivity* / Eds P. Politzer and F.J. Matrin Jr. - Amsterdam; Oxford; N.Y.; - Tokyo, 1988. - P. 1 - 31.
283. Smith B.J., Curtis J.F., Eling T.E. Bioactivation of xenobiotics by prostaglandin H synthase // *Chem.- Biol. Interact.* - 1991. - Vol. 79. - P. 245 - 64.
284. Kawajiri K., Fujii-Kurijama Y. P450 and human cancer // *Japan. J. Cancer Res.* - 1991. - Vol. 82. - P. 1325 - 1335.
285. Weinstein I.B. The origins of human cancer: Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment // *Cancer Res.* - 1988. - Vol. 48. - P. 4135 - 4143.
286. Monoclonal antibodies to DNA modified by a benzo[a]pyrene diol epoxide / Santella R.M., Lin C.D., Cleveland W.L., Weinstein I.B. // *Carcinogenesis.* - 1984. - Vol. 5. - P. 373 - 377.
287. Weston A., Trivers G., Vahakangas K. // *Prog. Exp. Tumor Res.* - 1987. - Vol. 31. - P. 76 - 84.
288. Interlaboratory comparison of antisera and immunoassays for benzo[a]pyrene-diol-epoxide-I-modified DNA / Santella R.M., Weston A., Perera F.P. et al. // *Carcinogenesis.* - 1988. - Vol. 9. - P. 1265 - 1269.
289. Zhang Y.J., Li Y., Santella R.M. // *Skin Pharm.* - 1990. - Vol. 3. - P. 171 - 176.
290. Gupta R.C., Reddy M.V., Randerath K. <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis of nonradioactive aromatic carcinogen-DNA adducts // *Carcinogenesis.* - 1982. - Vol. 3. - P. 1081 - 1092.
291. Gupta R.C. Enhanced sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts // *Cancer Res.* - 1985. - Vol. 45. - P. 5656 - 5662.
292. Reddy M.V., Randerath K. Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts // *Carcinogenesis.* - 1986. - Vol. 7. - P. 1543 - 1551.
293. Differences in detection of DNA adducts in the <sup>32</sup>P-postlabelling assay after either 1-butanol extraction or nuclease P1 treatment / Gallagher J.E., Jackson M.A., George M.H. et al. // *Cancer Let.* - 1989. - Vol. 45. - P. 7 - 15.
294. Gorelick N.J., Wogan G.N. Fluoranthene-DNA adducts: Identification and quantification by an HPLC-<sup>32</sup>P-postlabeling method // *Carcinogenesis.* - 1989. - Vol. 10. - P. 1567 - 1577.
295. Measurement by <sup>32</sup>P-postlabeling of 7-methylguanine levels - 125 in white blood cell DNA of healthy individuals and cancer patients treated with dacarbazine and procarbazine / Mustonen R., Forsti A., Hietanen P. et al. // *Carcinogenesis.* - 1991. - Vol. 12. - P. 1423 - 1431.
296. Identification and quantitation of hepatic DNA adducts formed in B6C3F1 mice from 1'-hydroxy-2',3'-dehydroestragole: Comparison of the adducts detected with the 1'-3H-labeled car-

- cinogen and by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling / Fennell T.R., Juhl U., Miller E.C. et al. // *Carcinogenesis*. - 1986. - Vol. 7. - P. 1881 - 1887.
297. Multiple DNA adducts in lymphocytes of smokers and nonsmokers determined by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling analysis / Jahnke G.D., Thompson C.L., Walker M.P. et al. // *Carcinogenesis*. - 1990. - Vol. 11. - P. 205 - 211.
298. O6-Alkyl-deoxyguanosine detection by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling and nucleotide chromatographic analysis / Wilson V.L., Basu A.K., Essigmann J.M. et al. // *Cancer Res.* - 1988. - Vol. 48. - P. 2156 -2161.
299. Cheh A.M., Yagi H., Jerina D.M. Stereoselective release of polycyclic aromatic hydrocarbon-deoxyadenosine adducts from DNA by the  $^{32}\text{P}$ -postlabeling and deoxy-ribonuclease I/snake venom phosphodiesterase digestion methods // *Chem. Res. Toxicol.* - 1990. - Vol. 3. - P. 545 - 550.
300. Standardization of the  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-DNA adducts / Shields P.G., Harris C.C., Pertuzzelli S. et al. // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* - 1991. - Vol. 32. - P. 1323 - 1328.
301. Skaanild M.T., Clausen J. Method for estimation of benzo[a]pyrene-DNA adducts // *Analyt. Biochem.* - 1992. - Vol. 205. - P. 337 -341.
302. Aflatoxin exposure measured by urinary excretion of aflatoxin B1-guanine adduct and hepatitis B virus infection in areas with different liver cancer incidence in Kenya / Aupur H., Seremet T., Wakhisi J. et al. // *Cancer Res.* - 1987. - Vol. 47. - P. 3430 - 3433.
303. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta / Manchester D.K., Bowman E.D., Parker N.B. et al. // *Cancer Res.* - 1992. - Vol. 52. - P. 1499 - 1503.
304. The determination of urinary 3-methyladenine in humans as a potential monitor of exposure to methylating agents / Shucker D.E.G., Bailey E., Parry A. et al. // *Carcinogenesis*. - 1987. - Vol. 8. - P. 959 - 962.
305. Electrophore-labeling and alkylation of standards of nucleic acid pyrimidine bases for analysis by gas chromatography with electron-capture detector / Nazareth A., Joppich M., Abdel-Baky S. et al. // *J. Chromatogr.* - 1984. - Vol. 314. - P. 201 - 209.
306. Adams J., David M., Giese R.W. // *Analyt. Chem.* - 1986. Vol. 58. - P. 345-395.
307. Accelerator mass-spectrometry in the biomedical dosimetry: relationship between low-level exposure and covalent binding of heterocyclic amine-carcinogens to DNA / Turteltaub K.W., Felton J. S., Gledhill B.L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1990. - Vol. 87. - P. 5288 - 5292.
308. Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking / Phillips D.H., Hewer A., Martin C.N. et al. // *Nature.* - 1988. - Vol. 336. - P. 790 - 792.
309. DNA adducts in different tissues of smokers and nonsmokers / Cuzick J., Routledge M.N., Jenkins D. et al. // *Intern. J. Cancer.* -1990. - Vol. 45. - P. 673 - 678.
310. Comparison of DNA adducts from exposure to complex mixtures in various human tissues and experimental systems / Lewtas J., Mumford J., Everson R.B. et al. // *Environ. Health Persp.* - 1993. - Vol. 99. - P. 87 - 97.
311. Benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts in alveolar macrophages of smokers / Izzotti A., Rossi G.A., Bagnasco M., DeFlora S. // *Carcinogenesis*. - 1991. - Vol. 12. - P. 1280 - 1285.
312. 4,4'-Methylene-bis-(2-chloroaniline)-DNA adduct analysis in human exfoliated urothelial cells by  $^{32}\text{P}$ -postlabelling / Kaderlik R.K., Talaska G., DeBord G. et al. // *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* - 1993. - Vol. 2. - P. 63 - 69.
313. Chacko M., Gupta R.C. Evaluation of DNA damage in the oral mucosa of tobacco users and non-users by  $^{32}\text{P}$ -adduct assay // *Carcinogenesis*. - 1988. - Vol. 9. - P. 2309 - 2313.
314. Phillips D.H., Hewer A., Glover R.L. Aromatic DNA adducts in human bone marrow and peripheral blood leukocytes // *Carcinogenesis*. - 1986. - Vol. 7. - P. 2071-2075.
315. Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells / Phillips D.H., Shocket B., Hewer A. et al. // *Intern. J. Cancer.* - 1990. - Vol. 46. - P. 569 - 575.

316. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells from lung cancer patients: correlation with adduct levels in lung / Van Shooten F.J., Van Leeuwen F.E., Hillebrand M.J.X. et al. // *Carcinogenesis*. - 1992. - Vol. 13. - P. 987 - 993.
317. Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method / Tornqvist M., Mowrer J., Jensen S., Ehrenberg L. // *Analyt. Biochem.* - 1986. - Vol. 154. - P. 255 - 266.
318. Serum albumin adducts in molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B1 intake and urinary excretion of aflatoxin M1 / Gan L.S., Skipper P.L., Peng X. et al. // *Carcinogenesis*. - 1988. - Vol. 9. - P. 1323 - 1325.
319. Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin albumin adducts and their application to human exposure assessment / Wild C.P., Jiang Y.-Z., Sabbioni G. et al. // *Cancer Res.* - 1990. - Vol. 50. - P. 245 - 251.
320. Correlation of dietary intake of aflatoxins with the level of albumin bound aflatoxin in peripheral blood in Gambia, West Africa / Wild C.P., Hudson G., Sabbioni G. et al. // *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* - 1992. - Vol. 1. - P. 229 - 234.
321. Aflatoxin-albumin adducts in human sera from different regions of the world / Wild C.P., Jiang Y.Z., Allen S.J. et al. // *Carcinogenesis*. - 1990. - Vol. 11. - P. 2271 - 2271.
322. Turesky R.J., Skipper P.L., Tannenbaum S.R. Binding of 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5f]quinoline to hemoglobin and albumin in vivo in the rat. Identification of an adduct suitable for dosimetry // *Carcinogenesis*. - 1987. - Vol. 8. - P. 1537 - 1542.
323. Aflatoxin metabolism in humans: Detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography / Groopman J.D., Donahue P.R., Zhu J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1985. - Vol. 82. - P. 6492 - 6496.
324. Urinary excretion of nitrate, N-nitrosoproline, 3-methyladenine and 7-methyl-guanine in a Colombian population at high risk for stomach cancer / Stillwell W.G., Glogowski J., Xu H.-X. et al. // *Cancer Res.* - 1991. - Vol. 51. - P. 190 - 194.
325. The determination of urinary 3-methyladenine by immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody based ELISA: use in human biomonitoring studies / Prevost V., Shuker D.E.G., Bartsch H. et al. // *Carcinogenesis*. - 1990. - Vol. 11. - P. 1747 - 1751.
326. Freisen M.D., Garren L., Shuker D.E.G. // *Chem. Res. Toxicol.* - 1991. - Vol. 4. - P. 102 - 106.
327. Staffa J.A., Mehlman M.A. Innovations in cancer risk assessment (ED01 study) // *J. Environ. Pathol. Toxicol.* - 1979. - Vol. 3. - P. 1 - 246.
328. Cohen S.M., Ellwein L.B. Proliferative and genotoxic cellular effects in 2-acetylaminofluorene bladder and liver carcinogenesis: biological modelling of the ED01 study // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 104. - P. 79 - 93.
329. Carcinogenesis of 4-aminobiphenyl in BALB/cStCr1fC3Hf/Nctr mice / Schieferstein G.J., Littlefield N.A., Gaylor D.W. et al. // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* - 1985. - Vol. 21. - P. 865 - 873.
330. DNA adduct formation and aromatic amine tumorigenesis / Beland F.A., Fullerton N.F., Smith B.A., Poirier M.C. // *Prog. Clin. Biol. Res.* - 1992. - Vol. 374. - P. 79 - 92.
331. Buss P., Caviezel M., Lutz W.K. Linear dose-response relationship for DNA adducts in rat liver from chronic exposure to aflatoxin B1 // *Carcinogenesis*. - 1990. - Vol. 11. - P. 2133 - 2135.
332. Deal F.H., Richardson F.C., Swenberg J.A. Dose response of hepatocyte replication in rats following continuous exposure to diethylnitrosamine // *Cancer Res.* - 1989. - Vol. 49. - P. 6985 - 6988.
333. Dose-response relationship between O6-methylguanine formation in Clara cells and induction of pulmonary neoplasia in the rat by 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone / Belinsky S.A., Foley J.F., White C.M. et al. // *Cancer Res.* - 1990. - Vol. 50. - P. 3772 - 3780.
334. Mutagenic activation of IQ, PhIP and MeIQx by hepatic microsomes from rat, monkey and man: low mutagenic activation of MeIQx in cynomolgus monkeys in vitro reflects low DNA levels in vivo / Davis C.D., Schut H.A., Adamson R.H. et al. // *Carcinogenesis*. - 1993. - Vol. 14. - P. 61 - 65.

335. Molecular dosimetry of ethylene oxide: formation and persistence of 7-(hydroxyethyl)-guanine in DNA following repeated exposures of rats and mice / Walker V.E., Fennell T.R., Upton P.B. et al. // *Cancer Res.* - 1992. - Vol. 52. - P. 4328 - 4334.
336. Detection of smoking-related covalent DNA adducts in human placenta / Everson R.B., Randerath E., Santella R.M. et al. // *Science.* - 1985. - Vol. 231. - P. 54 - 57.
337. Comparative <sup>32</sup>P-analysis of cigarette smoke-induced DNA damage in human tissues and mouse skin / Randerath E., Avitts T.A., Reddy M.V. et al. // *Cancer Res.* - 1986. - Vol. 46. - P. 5869 - 5877.
338. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in human placenta / Manchester D.K., Weston A., Choi J.-S. et al. // *Environ. Health Persp.* - 1993. - Vol. 99. - P. 83 - 15.
339. Covalent DNA damage in tissue of cigarette smokers as determined by <sup>32</sup>P-postlabeling assay / Randerath E., Miller R., Mittal D. et al. // *J. Natl. Cancer. Inst.* - 1989. - Vol. 81. - P. 341 - 347.
340. Cigarette smoking and DNA adduct levels in bronchoalveolar lavage (BAL) cells / Tetley T.D., Guz A., Hewer A., et al. // *Eur. Respir. J.* - 1990. - Vol. 3 (Suppl. 10).-P.292s.
341. Cigarette smoking related polycyclic aromatic hydrocarbonDNA adducts in peripheral mononuclear cells / Santella R.M., Grinberg-Funes R.A., Young T.L. et al. // *Carcinogenesis.* - 1992. - Vol. 13. - P. 2041 - 2045.
342. A pilot project in molecular cancer epidemiology: Determination of benzo[a]- pyrene-DNA adducts in animal and human tissues by immunoassays / Perera F.P., Poirier M.C., Yuspa S.H. et al. // *Carcinogenesis.* - 1982. - Vol. 3. - P. 1405 - 1410.
343. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients / Van Schooten F.J., Hillebrand M.J.K., Van Leeuwen P.E. et al. // *Carcinogenesis.* - 1990. - Vol. 11. - P. 1677 - 1683.
344. Hatch M.C., Warburton D., Santella R.M. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in spontaneously aborted fetal tissue // *Carcinogenesis.* - 1990. - Vol. 11. - P. 1673 - 1676.
345. Phillips D.H., Hewer A., Malcolm A.D.B. // *Lancet.* - 1990. - Vol. 335. - P.417-421.
346. Phillips H.D., Hewer A. DNA adducts in human urinary bladder and other tissues // *Environ. Health Persp.* - 1993. - Vol. 99. - P. 45 - 49.
347. Talaska G., Al-Juburi A.Z.S.S., Kadlubar F.F. Smoking related carcinogen-DNA adducts in biopsy samples of human urinary bladder: identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl as a major adduct // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1991. - Vol. 88. - P. 5350 - 5354.
348. Evaluation of <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of DNA from exfoliated oral mucosa cells as a means of monitoring exposure of the oral cavity to genotoxic agents / Foiles P.G., Miglietta L.M., Quart A.M. et al. // *Carcinogenesis.* - 1989. - Vol. 10. - P. 1429 - 1434.
349. Relationship between environmental tobacco smoke exposure and carcinogen-hemoglobin adduct levels in nonsmokers / Hammond S. K., Goghlin F., Gann P.H. et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* - 1993. - Vol. 85. - P. 474 - 478.
350. DNA adducts as a measure of lung cancer risk in human exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons / Kriek E., Van Schooten F.J., Hillebrand M.J.X. et al. // *Environ. Health Persp.* - 1993. - Vol. 99. - P. 71 - 75.
351. Detection of benzo[a]pyrenediol epoxide-DNA adducts in peripheral blood lymphocytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers / Harris C.C., Vahakangas K., Newmann M.J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1985. - Vol. 82. - P. 6672 - 6676.
352. DNA adducts as biomarkers for assessing exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in tissues from Xuan Wei women with high exposure to coal combustion emissions and high lung cancer mortality / Mumford J.L., Lee X., Lewtas J. et al. // *Environ. Health Persp.* - 1993. - Vol. 99. - P. 83 - 87.
353. Reddy M.V., Kenny P.C., Randerath K. <sup>32</sup>P Assay of DNA adducts in white blood cells (WBC) and placentas of pregnant women exposed to residential wood combustion (RWC) smoke // *Terat. Carc. Mutagen.* - 1990. - Vol. 10. - P. 373 - 379.

354. Rothman N., Poirier M.C., Baser M.E. // *Carcinogenesis*. - 1990. - Vol. 11. - P. 1241 - 1246.
355. Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats / Wild C.P., Garner R.C., Montesano R., Tursi F. // *Carcinogenesis*. - 1986. - Vol. 7. - P. 853 - 858.
356. Winn D.M. Smokeless tobacco and oral/pharynx cancer: the role of cofactors // *Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis* - N.Y., 1986. - P. 361 - 375.
357. Herron D.C., Shank R.C. Methylated purines in human liver DNA after probable dimethylnitrosamine poisoning // *Cancer Res.* - 1980. - Vol. 40. - P. 3116 - 3117.
358. O6-Methyldeoxyguanosine in esophageal DNA among individuals at high risk of esophageal cancer / Umbenhauer D., Wild C.P., Montesano R. et al. // *Intern. J. Cancer*. - 1985. - Vol. 36. - P. 661 - 665.
359. Detection of O4-ethylthymine in human liver DNA / Huh N.H., Satoh M.S., Shiga J. et al. // *Methods for detecting DNA damaging agents in humans: Application in cancer epidemiology and prevention*. - Lyon, 1988. - P. 292 - 295.
360. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa / Bressac B., Kew M., Wands J. et al. // *Nature*. - 1991. - Vol. 350. - P. 429 - 431.
361. Harrison J.C., Carvajal M., Garner R.C. Does aflatoxin exposure in the United Kingdom constitute a cancer risk? // *Environ. Health Persp.* - 1993. - Vol. 99. - P. 99 - 105.
362. Groopman J.D., Cain L.G. Interactions of fungal and plant toxins with DNA: aflatoxins, sterigmatocystin, safrole, cycasin and pyrrolizidine alkaloids // *Handbook of Experimental Pharmacology*. - Heidelberg, 1990. - Vol. 94/1 - P. 373 - 407.
363. Eichelbaum M., Kroemer N.K., Mikus G. Genetically determined differences in drug metabolism as a risk factor in drug toxicity // *Toxicol. Lett.* - 1992. - Vol. 64. - P. 115 - 122.
364. Caporaso N. Study design and genetic susceptibility factors in the risk assessment of chemical carcinogens // *Annu. Ist. Super. Sanita*. - 1991. - Vol. 27. - P. 621 - 630.
365. Mutant genes of cytochrome P450 IID, glutathione S-transferase class Mu, and arylamine N-acetyltransferase in lung cancer patients / Roots I., Brockmoller J., Dracoulis N., Loddenkemper R. // *Clin. Investig.* - 1992. - Vol. 70. - P. 307 - 319.
366. Bell D.A. Detection of DNA sequence polymorphism in carcinogen metabolism genes by polymerase chain reaction // *Environ. Mol. Mutagen.* - 1991. - Vol. 18. - P. 245-248.
367. Molecular genetic analysis of the cytochrome P450 debrisoquine hydroxylase locus and association with cancer susceptibility / Smith C.A., Moss J.E., Gough A.C. et al. // *Environ. Health Perspect.* - 1992. - Vol. 98. - P. 107 - 112.
368. PCR-based CYP2D genotyping for Finnish lung cancer patients / Hirvonen A., Husgafte-Pursiainen K., Anttila S. et al. // *Pharmacogenetics*. - 1993. - Vol. 3. - P. 19-27.
369. Bladder cancer recurrence and its association with cytochrome P450 IID activity / Persad R.A., Fleming C.M., Wilkinson G.R. et al. // *Prog. Clin. Biol. Res.* - 1992. - Vol. 378. - P. 19 - 27.
370. The ability to 4-hydroxylate debrisoquine is related to recurrence of bladder cancer / Fleming C.M., Kaisary A., Wilkinson G.R. et al. // *Pharmacogenetics*. - 1992. - Vol. 2. - P. 128 - 134.
371. Thorgeirsson S.S., Nebert D.W. The Ah-locus and the metabolism of chemical carcinogens and other foreign compounds // *Adv. Cancer Res.* - 1977. - Vol. 25. - P. 149-193.
372. Monoclonal antibody-directed radioimmunoassay detects cytochrome P450 in human placenta and lymphocytes / Song B.J., Friedman F.K., Park S.S. et al. // *Science*. - 1985. - Vol. 228. - P. 490 - 492.
373. Cytochrome P450 1A1 gene expression in lung cancer patients: evidence for cigarette smoke-induced expression in normal lung and altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas / McLemore T., Adelberg S., Liu M.C. et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* - 1990. - Vol. 82. - P. 1333 - 1339.

374. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues / de Waziers I., Cugnenc P.H., Yang S.C. et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1990. - Vol. 253. - P. 387 - 394.
375. Aoyama T., Gonzalez F.J. and Gelboin H.V. Human cDNA expressed cytochrome P450 IA2: mutagen activation and substrate specificity // *Mol. Carcinogen.* - 1989. - Vol. 1. - P. 192 - 198.
376. Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes / Kouri R.E., McKinney C.E., Slomiany D. J. et al. // *Cancer Res.* - 1982. - Vol. 42. - P. 5030 - 5037.
377. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphism with amino replacement in the gene binding region of the human cytochrome P450 IA1 gene / Naya-shi S., Watanabe J., Nakachi K. et al. // *J. Biochem.* - 1991. - Vol. 110. - P. 407 - 411.
378. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population / Nakachi K., Imai K., Hayashi S. et al. // *Cancer Res.* - 1993. - Vol. 53. - P. 2994 - 2999.
379. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility / Kawajiri K., Nakachi K., Imai K. et al. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* - 1993. - Vol. 14. - P. 77 - 87.
380. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and the CYP1A1 restriction fragment length polymorphism / Shields P.J., Sugimura H., Caporaso N.E. et al. // *Environ. Health Perspect.* - 1992. - Vol. 98. - P. 191 - 194.
381. Lung cancer, race, and a CYP1A1 genetic polymorphism / Shields P.G., Caporaso N.E., Falk R.I. et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* - 1993. - Vol. 2. - P. 481-485.
382. Immunohistochemical detection of pulmonary cytochrome P450 1A and metabolic activities associated with P450 1A1 and P450 1A2 isozymes in lung cancer patients / Antilla S., Vainio H., Hietanen E. et al. // *Environ. Health Perspect.* - 1992. - Vol. 98. - P. 179 - 182.
383. Point-mutational MspI and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene : lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population / Hirvonen A., Husgafvel-Pursiainen K., Karjalainen A. et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* - 1992. - Vol. 1. - P. 485 - 489.
384. Human CYP1A1 (cytochrome P(1)450) gene: lack of association between the Msp I restriction fragment length polymorphism and incidence on lung cancer in a Norwegian population / Tefre T., Ryberg D., Haugen A. et al. // *Pharmacogenetics.* - 1991. - Vol. 1. - P. 20 - 25.
385. Nebert D.W., Petersen D.D., Puga A. Human AH locus polymorphism and cancer: inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin // *Pharmacogenetics.* - 1991. - Vol. 1. - P. 68 - 78.
386. Racial differences in restriction fragment length polymorphisms and messenger RNA inducibility of the human CYP1A1 gene / Cosma G., Crofts F., Wirgin I. et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* - 1993. - Vol. 2. - P. 53 - 57.
387. Conditions for analysis of cytochrome P450 activity in human liver microsomes / Isa V., Cumps J., Fossoul C. et al. // *J. Pharmacol. Belg.* - 1992. - Vol. 47. - P. 407 - 411.
388. Kadlubar F.F. Carcinogenic aromatic amine metabolism and DNA adduct detection in humans // *Int. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Fund.* - 1990. - Vol. 21. - P. 329-338.
389. Polymorphism for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis / Kadlubar F.F., Butler M.A., Kaderlik K.R. et al. // *Environ. Health Perspect.* - 1992. - Vol. 98. - P. 69 - 74.
390. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites / Butler M.A., Lang N.P., Young J.F. et al. // *Pharmacogenetics.* - 1992. - Vol. 2. - P. 116 - 127.
391. Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco cancer risk. IY: Molecular dosimetry studies implicate aromatic amines as bladder carcinogens / Bartsch H., Malaveille C., Friesen M. et al. // *Eur. J. Cancer.* - 1993. - Vol. 29A. - P. 1199 - 1207.

392. Minchin R.F., Kadlubar F.F., Ilett K.F. Role acetylation in colorectal cancer // *Mutat. Res.* - 1993. - Vol. 290. - P. 35 -42.
393. Hein D.W. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis // *Biochem. Biophys. Acta.* - 1988. - Vol. 948. - P. 37 - 66.
394. Cytochrome P450 IIE1 genetic polymorphism, racial variation, and lung cancer / Kato S., Shields P.G., Caporaso N.E. et al. // *Cancer Res.* - 1992. - Vol. 52. - P. 6712-6715.
395. Human cytochrome P450 IIE1 gene: DraI polymorphism and susceptibility to cancer / Uematsu F., Kikuchi H., Motomiya M. et al. // *Tohoku J. Exp. Med.* - 1992. - Vol.168. - P. 113 - 117.
396. Genetic polymorphism of cytochromes P450: interethnic differences and relationship to incidence of lung cancer / Ingelman-Sunberg M., Johansson I., Persson I. et al. // *Pharmacogenetics.* - 1992. - Vol. 2. - P. 264 - 271.
397. Осташевский В.А, Наров Ю.И., Цырлов И.Б. Определение активности бензо[а]пиренгидроксилазы у больных раком легкого // *Вопр. онкологии.* - 1987. - Т. 11. - С. 62 - 65.
398. Kallerman G., Shaw C.R., Luyten-Kellerman M. Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma // *N. Eng. J. Med.* - 1973. - Vol. 289. - P. 934-937.
399. Harris C. Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair // *Carcinogenesis.* - 1989. - Vol. 10. - P. 1563 - 1566.
400. Atlas S.A., Vesell E.S., Nebert D.W. Genetic control of interindividual variations in the inducibility of aryl hydrocarbon hydroxylase in cultured human lymphocytes // *Cancer Res.* - 1976. - Vol. 36. - P. 4619 - 4630.
401. Nebert D.W. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk // *Mutation Res.* - 1991. - Vol. 247. - P. 267 - 281.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Вавилин Валентин Андреевич	Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН. Зав. лабораторией метаболизма лекарств и фармакокинетики
Гришанова Алевтина Юрьевна	Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН. Ведущий научный сотрудник
Громова Ольга Аркадьевна	Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН. Ученый секретарь
Гуляева Людмила Федоровна	Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН. Ведущий научный сотрудник (сл. тел.: 35-20-66)
Ляхович Вячеслав Валентинович	Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН. Директор института
Слынько Николай Мефодиевич	Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН. Зав. лабораторией экологической биохимии

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава 1. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ	5
1.1. Множественные формы цитохрома P450 – основные ферменты метаболизма чужеродных химических веществ .....	6
1.1.1. CYP1 семейство генов (подсемейство 1A) .....	10
1.1.2. CYP2 семейство генов (подсемейства 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G).....	11
1.1.3. CYP3 семейство генов .....	13
1.1.4. CYP4 семейство генов .....	14
Глава 2. ИНДУКЦИЯ ФЕРМЕНТОВ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ ПАРАМЕТР ДЛЯ БИОМОНИТОРИНГА ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....	16
2.1. Индукция P450 химическими компонентами загрязнения окружающей среды у лабораторных животных.....	19
2.2. Индукция P450 у диких животных .....	20
2.3. Влияние низких доз индукторов на цитохром P450 .....	22
2.4. Использование дикоживущих животных и рыб для экологического биомониторинга.....	23
2.5. Экологический биомониторинг с использованием лабораторных животных .....	26
2.6. Индукция P450 химическими компонентами загрязнения окружающей среды у человека .....	27
Глава 3. БИОМОНИТОРИНГ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТОВЫХ ЛЕКАРСТВ.....	30
3.1. Подсемейство CYP1A .....	32
3.2. Подсемейство CYP3A .....	34
3.3. Подсемейство CYP2C.....	35
3.4. Подсемейство CYP2B.....	36
3.5. Подсемейство CYP2D .....	37
3.6. Подсемейство CYP2E.....	37
3.7. Комплексная оценка индивидуальных форм цитохрома P450 с использованием тестовых лекарств .....	38
Глава 4. ФЕРМЕНТЫ I-ой и II-ой ФАЗЫ МЕТАБОЛИЗМА КСЕНОБИОТИКОВ И ХИМИЧЕСКИЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ .....	40
4.1. Применение экзогенных продуктов аддуктов биологических макромолекул в биомониторинге .....	42
4.2. Генетический полиморфизм ферментов метаболизма ксенобиотиков и риск развития онкозаболеваний у человека.....	52
4.2.1. Эксперименты по изучению индуцибельности бензо[а]пиренгидроксилазы.....	57
4.2.2. Индуцибельность БПГ в лимфоцитах больных раком легкого .....	58
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	62
ЛИТЕРАТУРА.....	63
СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ .....	84
СОДЕРЖАНИЕ .....	85

Гуляева Людмила Федоровна  
Гришанова Алевтина Юрьевна  
Громова Ольга Аркадьевна  
Слынько Николай Мефодиевич  
Вавилин Валентин Андреевич  
Ляхович Вячеслав Валентинович

**МИКРОСОМНАЯ МОНООКСИГЕНАЗНАЯ СИСТЕМА ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ  
В БИОМОНИТОРИНГЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Аналитический обзор

Художник В.Н. Лебедев

Оригинал-макет подготовлен с помощью системы Xerox Ventura Publisher.

Гарнитура Times.

Верстка выполнена Н.П. Куколевой

Подписано к печати 24.10.94.      Формат 60x84/16

Бумага писчая.      Ротапринт.      Усл. печ. л. 5,8.

Уч.-изд. л. 8,5.      Тираж 400 экз.      Заказ N 504.

Цена договорная

ГПНТБ СО РАН. Новосибирск

ул. Восход, 15.