

# Корреляция чувствительности к гепатоканцерогенезу, индуцированному введением орто-аминоазотолуола, со степенью активации сигнальных путей Ahr и Car у мышей

Н.В. Багинская<sup>1</sup>, Е.В. Кашина<sup>1</sup>, М.Ю. Шаманина<sup>1</sup>, С.И. Ильницкая<sup>1</sup>, В.И. Каледин<sup>1</sup>, В.А. Мордвинов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», Новосибирск, Россия

Орто-аминоазотолуол (ОАТ) является сильным гепатоканцерогеном для большинства линий мышей. Ранее было показано, что введение ОАТ активирует в печени этих животных арил-гидрокарбонный рецептор (Ahr) и конститутивный рецептор андростанов (Car). Оба эти рецептора принимают непосредственное участие в процессе гепатоканцерогенеза. В данной работе были исследованы влияние хронического введения ОАТ на уровни экспрессии мРНК Ahr, Car и их генов-мишеней Cyp1a1 и Cyp2b10, а также корреляция их экспрессии со степенью воспалительной реакции у линий мышей DD/He (DD) и CC57BR/Mv (BR), контрастных по чувствительности к гепатоканцерогенезу. Самцам мышей обеих линий в течение 2 мес. четырехкратно вводили масляный раствор ОАТ в дозе 225 мг/кг веса тела. Контрольные животные получали эквивалентное количество растворителя. Мышей забивали через 1 и 4 сут после последнего введения ОАТ. Экспрессию генов в печени определяли методом ПЦР в реальном времени. Степень воспалительной реакции оценивали в те же сроки по концентрации фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ) в сыворотке крови. У резистентных мышей BR введение ОАТ индуцировало более выраженное и длительное повышение уровня экспрессии мРНК Cyp1a1, свидетельствующее о преимущественной активации Ahr у этих животных. В то же время у мышей чувствительной линии DD наблюдалось более выраженное повышение уровня экспрессии Cyp2b10, что указывает на преимущественную активацию Car. Также у мышей линии DD, в отличие от BR, наблюдалась сильная и длительная воспалительная реакция в ответ на введение ОАТ. Полученные результаты дают основания полагать, что преобладание активации сигнального пути Ahr над активацией сигнального пути Car может быть фактором резистентности к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу.

Ключевые слова: мыши; межлинейные различия; о-аминоазотолуол; Ahr; Car; ПЦР-РВ.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Багинская Н.В., Кашина Е.В., Шаманина М.Ю., Ильницкая С.И., Каледин В.И., Мордвинов В.А. Корреляция чувствительности к гепатоканцерогенезу, индуцированному введением орто-аминоазотолуола, со степенью активации сигнальных путей Ahr и Car у мышей. Вавилонский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):474-479. DOI 10.18699/VJ15.063

## HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Baginskaya N.V., Kashina E.V., Shamanina M.Yu., Ilnitskaya S.I., Kaledin V.I., Mordvinov V.A. Correlation of susceptibility to ortho-aminoazotoluene-induced hepatocarcinogenesis with Car and Ahr signaling pathway activation in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):474-479. DOI 10.18699/VJ15.063

DOI 10.18699/VJ15.063

УДК 57.021:616-006

Поступила в редакцию 23.06.2015 г.

Принята к публикации 10.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

e-mail: bagin@bionet.nsc.ru; mordvin@bionet.nsc.ru

## Correlation of susceptibility to ortho-aminoazotoluene-induced hepatocarcinogenesis with Car and Ahr signaling pathway activation in mice

N.V. Baginskaya<sup>1</sup>, E.V. Kashina<sup>1</sup>, M.Yu. Shamanina<sup>1</sup>, S.I. Ilnitskaya<sup>1</sup>, V.I. Kaledin<sup>1</sup>, V.A. Mordvinov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

Ortho-aminoazotoluene (OAT) is a potent hepatocarcinogen for most strains of mice. It has previously been shown that OAT application activates the aryl hydrocarbon receptor (Ahr) and the constitutive androstane receptor (Car) in the mouse liver. Both of these receptors are directly involved in the process of hepatocarcinogenesis. In this study, we investigated the effect of chronic OAT administration on the mRNA expression levels of Ahr, Car and their target genes Cyp1a1 and Cyp2b10 in the liver of DD/He (DD) and CC57BR/Mv (BR) mouse strains contrasting in sensitivity to hepatocarcinogenesis. The inflammatory response of these strains was also studied. Male mice of both strains received OAT oil solution at the dose of 225 mg/kg body weight four times within two months. Control animals received the equivalent solvent amount. Mice were sacrificed on days 1 and 4 after the last OAT administration. Gene expression levels in the liver were determined by real-time PCR. The inflammatory response was evaluated by serum concentration of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). In resistant BR mice, OAT induced a pronounced and prolonged increase in Cyp1a1 mRNA, showing primarily Ahr activation, while the DD strain displayed a more pronounced elevation of Cyp2b10 expression, indicative of Car activation. In addition, a strong inflammatory response to OAT was recorded in DD mice but not in BR. It is assumed that the prevalence of Ahr signaling pathway activation over Car signaling pathway activation is a factor of resistance to OAT-induced hepatocarcinogenesis.

Key words: mice; interlinear difference; o-aminoazotoluene; Ahr; Car; real-time PCR.

Гепатокарцинома – одна из наиболее часто встречающихся опухолей человека. Ее развитие зависит как от внешних условий (уровень загрязнения окружающей среды, стресс и др.), так и от генетических факторов (Chen, Chen, 2002; Feo et al., 2006). Инбредные линии мышей, различающиеся по чувствительности к гепатоканцерогенезу, являются хорошим объектом для изучения молекулярных механизмов и роли генетических факторов в гепатоканцерогенезе. В последнее время широко обсуждается ключевая роль в развитии опухолей печени транскрипционных факторов (ТФ), активируемых ксенобиотиками. Эти факторы, получившие название ксеносенсоров ввиду их непосредственного участия в процессах регуляции метаболизма ксено- и эндобиотиков, также могут влиять на гормональный статус, воспаление, апоптоз и пролиферацию как нормальных, так и опухолевых клеток (Kolaya et al., 1995; Xie et al., 2003; Marlowe, Puga, 2005). Активация ксеносенсоров, таких как конститутивный рецептор андростанов (Car, Nr1i3) и арил-гидрокарбонный рецептор (Ahr), стимулирует развитие опухолей печени у мышей и крыс (Moennikes et al., 2004; Yamamoto et al., 2004; Huang et al., 2005). В то же время в определенных условиях Ahr может играть роль опухолевого супрессора, благодаря его способности стимулировать апоптоз, подавлять пролиферацию клеток и воспаление (Mitchell et al., 2006; Fan et al., 2010; Hanieh, 2014). Известно, что хроническое воспаление является фактором гепатоканцерогенеза (Nakagawa, Maeda, 2012), причем его эффекты в значительной степени опосредуются через индукцию провоспалительных цитокинов, в частности ФНО $\alpha$  (Liedtke, Trautwein, 2012). Активация Ahr подавляет экспрессию ФНО $\alpha$  и других провоспалительных цитокинов, снижая тем самым степень воспаления (Hanieh, 2014). Ahr также может регулировать активность Car, повышая уровень его мРНК в печени мышей (Patel et al., 2007). Поэтому в экспериментальных моделях для лучшего понимания молекулярных механизмов канцерогенеза необходимо исследовать совместную деятельность этих рецепторов.

О-аминоазотолуол (ОАТ) является сильным гепатоканцерогеном для мышей, однако механизм его канцерогенного действия недостаточно ясен. Показано, что мыши инбредных линий A/Sn, A/He, SWR и DD/He высокочувствительны к его гепатоканцерогенному действию, в то время как мыши линий CC57BR/Mv и AKR резистентны (Каледин и др., 1990). Также установлено, что в печени мышей ОАТ активирует как Ahr (Cheung et al., 1994; Zacharova et al., 2003), так и Car (Smetanina et al., 2011). Активация Ahr индуцирует каскад ферментов метаболизма ароматических соединений и азобензолов, включая ОАТ. Таким образом, ОАТ индуцирует ферменты своего собственного метаболизма (Cheung et al., 1994; Mikhailova et al., 2005). В результате этого процесса происходит активация ОАТ, ведущая к образованию ДНК-аддуктов и, как следствие, к появлению мутаций и канцерогенезу (Miller, Miller, 1981). С другой стороны, тот же процесс может привести к ускоренному выведению ОАТ из организма, снижая его канцерогенный эффект. Такая возможность подтверждается, в частности, исследованиями Nebert с соавт. (2004), показавшими, что *in vivo* цитохромы Cyp1a1/2

у мышей выполняют преимущественно детоксифицирующую функцию. Показано, что ОАТ-индуцированный гепатоканцерогенез часто происходит на фоне хронического воспаления (Багинская и др., 2007), интенсивность которого зависит от активности ряда транскрипционных факторов, Car, Ahr, Ppara и других, а воспаление, в свою очередь, влияет на их активность (Glass, Saijo, 2010; Gerbal-Chaloin, 2013; Hanieh, 2014). Мы предположили, что в основе различий по чувствительности к гепатоканцерогенезу и особенностей воспалительного ответа у мышей разных линий могут лежать различия в уровне функционирования транскрипционных факторов Car и Ahr.

В данной работе исследовали влияние хронического введения ОАТ на уровень экспрессии мРНК Car, Ahr и их маркерных генов Cyp1a1 и Cyp2b10 в печени, а также на уровень ФНО $\alpha$  в крови у линий мышей DD/He и CC57BR/Mv, контрастных по чувствительности к гепатоканцерогенезу.

## Материалы и методы

В опытах использовали гепатоканцероген 2'-3-диметил-4-аминоазобензол (орто-аминоазотолуол, ОАТ) фирмы «ICN», США. Опыты были сделаны на самцах мышей инбредных линий CC57BR/Mv (BR) и DD/He (DD), полученных из вивария конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Эксперименты проводились в соответствии с рекомендациями, приведенными в руководстве по уходу и использованию лабораторных животных национальных институтов здравоохранения (Протокол № 17.3 от 17 июня 2013 г. комиссии по биоэтике ИЦиГ СО РАН). Мышей содержали группами по 6–8 особей в клетке в естественных условиях освещения. Животные получали комбикорм ПК 120-1 («Лабораторснаб», Москва) и воду *ad libitum*.

Экспериментальным животным начиная с двухмесячного возраста четырехкратно с интервалом в 2 нед вводили ОАТ в дозе 225 мг/кг веса тела внутривентриально. Контрольные животные получали соответствующее количество растворителя – оливкового масла. Еще одну контрольную группу составляли интактные животные. Через 1 и 4 сут после окончания введения канцерогена мышам забивали для забора образцов крови и ткани печени. Сыворотку крови хранили при температуре –20 °С. Ткань печени замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80 °С для дальнейшего использования.

Концентрацию фактора некроза опухоли (ФНО $\alpha$ ) в сыворотке крови определяли иммуноферментным способом с помощью набора реактивов Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit («eBioscience»).

## Выделение РНК и ПЦР анализ

Все стадии выделения и анализа РНК, а также получения кДНК проводили согласно протоколам фирм-производителей соответствующих наборов. РНК выделяли из 20–40 мг ткани печени с использованием набора AxyPrep™ Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences). Перед получением кДНК 1 мкг РНК подвергали ДНК-азной обработке согласно инструкции производителя (DNase I, RNase-free, «Fermentas Life Sciences»). Сохранность РНК после обработки ДНКазой проверяли с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer. Реакцию

**Таблица 1.** Структура праймеров исследуемых генов

Ген	Структура прямого праймера	Структура обратного праймера
Арил-гидрокарбонный рецептор ( <i>Ahr</i> )	ATAAACTCACAGTCCGCCATGG	AAGTCGGACGAATAGGTTTCATTG
Цитохром P450 1a1 ( <i>Cyp1a1</i> )	CTGAATGGCTTCTATATCCCAAG	AATGGTCTCTCCGATGCACTTTC
Цитохром P450 2b10 ( <i>Cyp2b10</i> )	CAGACCGTCAGTCTTTGCGC	AAGGTGGCCCTGTGCTTCTC
Конститутивный рецептор андростанов ( <i>Car</i> )	CCATAAAAACCTGAAAGGACTGC	TGCATACAGAAACCGACTTTGG
$\beta$ -актин ( <i>Actb</i> )	ACATGGCATTGTTACCAACTGG	CCTGGATGGCTACGTACATGG

**Таблица 2.** Фоновое содержание мРНК *Ahr*, *Car* и их генов-мишеней *Cyp1a1* и *Cyp2b10* в печени мышей двух линий

Линии мышей	Исследуемые гены			
	<i>Ahr</i>	<i>Cyp1a1</i>	<i>Cyp2b10</i>	<i>Car</i>
DD/He	1,70 ± 0,24	4,20 ± 1,3	2,90 ± 0,86	1,24 ± 0,09
CC57BR/Mv	1,62 ± 0,47	5,02 ± 1,10	1,28 ± 0,55	2,44 ± 0,33*

Относительное содержание мРНК было оценено с помощью ПЦР-РВ, нормализовано к уровню экспрессии *Actb* и выражено в виде кратных изменений относительно контрольной пробы интактной мыши линии DD/He. Достоверность различий между линиями мышей: \*  $p < 0,05$ . Количество животных в каждой группе – 3.

**Таблица 3.** Влияние хронического введения OAT на относительное содержание мРНК *Ahr* и *Car* у мышей двух линий

Линии мышей	Группы	<i>Ahr</i>		<i>Car</i>	
		1 сут <sup>a</sup>	4 сут	1 сут	4 сут
DD/He	Контроль	2,04 ± 0,44	1,25 ± 0,09	1,28 ± 0,16	1,03 ± 0,10
	OAT	2,37 ± 0,17	1,88 ± 0,39	2,5 ± 0,64	1,23 ± 0,22
CC57BR/Mv	Контроль	2,44 ± 0,5	1,46 ± 0,23	5,23 ± 0,7***	2,44 ± 0,21*
	OAT	2,12 ± 0,4	1,63 ± 0,13	2,02 ± 0,2 <sup>0</sup>	1,77 ± 0,22

OAT (225 мг/кг вт) вводили один раз в 2 нед 4-кратно. Контрольная группа получала эквивалентное количество оливкового масла. Относительное содержание мРНК было оценено с помощью ПЦР-РВ и нормализовано к уровню экспрессии *Actb* и выражено в виде кратных изменений относительно контрольной пробы интактной мыши линии DD/He. <sup>a</sup> – время после окончания введения OAT (сут). Достоверность различий между линиями мышей: \*  $p < 0,05$  и \*\*\*  $p < 0,001$ . Достоверность отличий от группы контроля: <sup>0</sup>  $p < 0,05$ . Количество животных в каждой группе – 3.

обратной транскрипции проводили с помощью набора «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» («Fermentas Life Sciences»). Экспрессию генов оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием «Набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии Sybr Green» (ЗАО «Синтол», г. Москва) на оборудовании ABI Prism 7000 («Applied Biosystems», США) с помощью SDS1.2.3.

Подбор праймеров осуществляли с помощью программ «Primer Express® Software» v2.0 («Applied Biosystems»). Предварительно отобранные пары праймеров верифицировали на специфичность с помощью программ «Primer-BLAST» (NCBI), «Genome Browser» (UCSC) и «In-silico PCR» (UCSC). Для проведения ПЦР-РВ пары праймеров подбирались таким образом, чтобы реакция проходила в унифицированных условиях для всех генов при одновременном сохранении высокой специфичности для каждого гена. Выбранные праймеры должны были детектировать максимальное количество известных вариантов сплайсинга. Отобранные по вышеперечисленным критериям пары характеризовались следующими параметрами: длина специфического ампликона 200 п. о. ± 5 %; температурный

диапазон отжига для всех пар праймеров –58 °C ... –61 °C. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

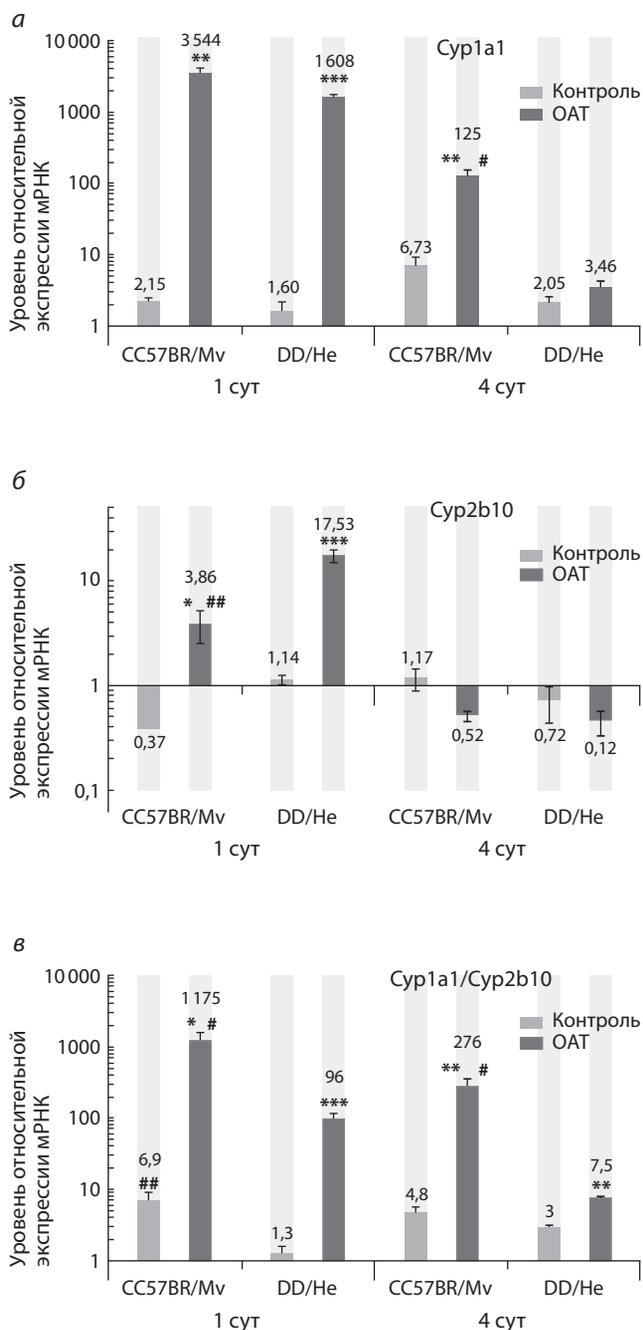
Уровень экспрессии генов был нормализован к уровню экспрессии  $\beta$ -актина (*Actb*). Уровень модуляции экспрессии мРНК дан относительно уровня контрольной пробы интактной мыши линии DD/He.

Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – стандартная ошибка среднего значения. Достоверность различий между исследуемыми группами животных оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

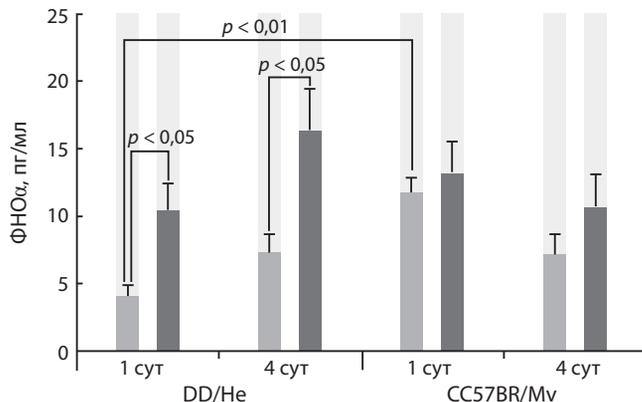
Фоновые уровни экспрессии мРНК *Ahr*, *Cyp1a1* и *Cyp2b10* в печени у мышей исследуемых линий существенно не различались, но содержание мРНК *Car* у резистентных мышей BR было почти в 2 раза выше, чем у DD (табл. 2).

Хроническое введение OAT не влияло на содержание мРНК *Ahr* у мышей обеих линий. В то же время уровень мРНК *Car* существенно снизился у мышей BR по сравнению с контролем через сутки после введения OAT (табл. 3). В конце эксперимента эти различия исчезли.



**Рис. 1.** Влияние хронического введения ОАТ на относительное содержание мРНК Cyp1a1 и Cyp2b10 в печени мышей DD/He и CC57BR/Mv.

ОАТ (225 мг/кг вт) вводили один раз в 2 нед 4-кратно. Контрольная группа получала эквивалентное количество оливкового масла. Относительное содержание мРНК было оценено с помощью ПЦР-РВ и нормализовано к уровню Actb. Данные представлены в виде кратных изменений экспрессии (а) Cyp1a1 и (б) Cyp2b10 относительно контрольной пробы интактной мыши линии DD/He; (в) Cyp1a1 относительно Cyp2b10. Темные столбики – группа животных, получавшая ОАТ, светлые столбики – контрольная группа. Достоверность отличий от группы контроля: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$ . Достоверность различий между линиями мышей #  $p < 0,05$  и ##  $p < 0,01$ . Количество животных в каждой группе – 3.



**Рис. 2.** Влияние хронического введения ОАТ на уровень ФНОα в сыворотке крови мышей DD/He и CC57BR/Mv.

ОАТ (225 мг/кг вт) вводили один раз в 2 нед 4-кратно. Контрольная группа получала эквивалентное количество оливкового масла. Уровень ФНОα определяли на 1-й и 4-й дни после окончания введения препаратов. Светлый столбик – контроль, темный столбик – группа ОАТ. Данные представлены в виде  $M \pm m$ . Количество животных в каждой группе – 6–8.  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  – значения *t*-критерия Стьюдента.

У мышей DD изменений в экспрессии Car не было обнаружено. Следует отметить, что у интактных животных так же, как и в контроле, содержание мРНК Car у мышей BR было выше, чем у DD (табл. 2, 3). Чем могут быть обусловлены такие межлинейные различия – вопрос дальнейших исследований.

Через сутки после введения канцерогена у обеих линий наблюдалось значительное увеличение экспрессии мРНК Cyp1a1 и Cyp2b10 – генов-маркеров активации Ahr и Car (Petrick, Klaassen, 2007) (рис 1, а, б). Это соответствует данным литературы о значительном повышении экспрессии этих генов в ответ на однократное введение ОАТ (Cheung et al., 1994; Zacharova et al., 2003; Smetanina et al., 2011). Отметим, что уровень экспрессии Cyp2b10 у чувствительных мышей DD был значительно выше, чем у резистентных мышей BR (рис. 1, б). Активация Car, как известно, промотирует развитие опухолей печени у мышей и крыс (Kolaya et al., 1995; Yamamoto et al., 2004; Huang et al., 2005), поэтому повышенная активация Car у DD может быть причиной их высокой чувствительности к гепатоканцерогенному действию ОАТ. В то же время более низкая индукция Cyp2b10 и снижение экспрессии Car в ответ на введение ОАТ (рис. 1, б, табл. 3) свидетельствуют об относительном подавлении сигнального пути Car у BR по сравнению с DD, что может быть одним из факторов резистентности линии BR.

Другим фактором, влияющим на канцерогенный процесс, является воспаление. В нашем эксперименте хроническое введение ОАТ привело к значительному повышению концентрации ФНОα в крови у мышей DD (рис. 2). Такой эффект наблюдался и через 1, и через 4 сут после окончания введения канцерогена. В отличие от DD, у BR уровень ФНОα не отличался от контроля (рис. 2). Ранее нами было показано, что однократное введение ОАТ вызывает воспалительную реакцию и у DD, и у BR, но у мышей DD продолжительность этой реакции больше

(Багинская и др., 2009). Возможно, хроническое введение канцерогена по-разному влияет на эти линии: вызывает привыкание у резистентных мышей BR, но не снижает воспалительные процессы у мышей DD.

Известно, что хроническое воспаление является фактором гепатоканцерогенеза (Nakagawa, Maeda, 2012), поэтому длительное повышение ФНО $\alpha$  в крови у мышей DD может быть еще одной причиной их высокой чувствительности к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу. Воспаление, как известно, подавляет экспрессию Car и его генов-мишеней (Beigneux et al., 2002; Gerbal-Chaloin, 2013), но в нашем эксперименте, несмотря на высокий уровень индукции ФНО $\alpha$  у мышей DD, подобных эффектов не отмечалось.

По литературным данным, было установлено, что однократное введение ОАТ индуцирует экспрессию *Cyp1a1* у мышей, но однозначных различий между чувствительными и резистентными линиями не было выявлено (Тимофеева и др., 2000; Zacharova et al., 2003). В нашем эксперименте через сутки после окончания введения ОАТ у мышей резистентной линии BR индукция экспрессии *Cyp1a1* была в 2 раза выше, чем у DD, а на 4-е сутки – в 30 раз выше, несмотря на общее снижение этого показателя у обеих линий (рис. 1, а). Это свидетельствует о значимых различиях в индукции *Cyp1a1* и, следовательно, в активации Ahг, между чувствительной и резистентными линиями.

Непрерывная активация Ahг, как известно, стимулирует развитие опухолей печени (Moennikes et al., 2004). Однако именно у резистентных мышей BR мы наблюдали значительное и длительное повышение этого рецептора. Возможно, что у BR были задействованы другие, чем у DD, гены-мишени каскада Ahг и регуляторных факторов, связанных с ним. Известно, что активация Ahг может оказывать антиканцерогенное действие путем ингибирования пролиферации клеток и стимуляции апоптоза (Mitchell et al., 2006; Fan et al., 2010), а также за счет модуляции воспалительных сигналов путем подавления экспрессии воспалительных цитокинов и прямого взаимодействия с RelB субъединицей NF- $\kappa$ B (Tian et al., 1999; Vogel, Matsumura, 2009; Hanieh, 2014). Возможно, подавление воспаления, вызванное активацией Ahг, является одним из факторов резистентности у BR. Другим фактором резистентности может быть повышение Ahг-опосредованной индукции ферментов метаболизма, в результате чего происходит преимущественная детоксикация и выведение ОАТ, но не его активация. Такая возможность описана в работе Неберта с соавт. (Nebert et al., 2004), в которой выдвинуто предположение о преобладании детоксификационной функции *Cyp1a* ферментов у мышей. Недавние данные по уменьшению числа и размеров опухолей печени после метаболической активации ОАТ подтверждают это предположение (Каледин, Ильницкая, 2011). Таким образом, наши результаты и данные литературы дают основания полагать, что значительная активация Ahг у мышей BR подавляет воспаление и ускоряет выведение ОАТ, что ведет к повышению их резистентности к гепатоканцерогенезу.

Мы предположили, что баланс между активностью сигнальных путей Ahг и Car влияет на чувствительность к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу. Показателем

этого может быть оценка экспрессии мРНК *Cyp1a1* относительно мРНК *Cyp2b10* (соотношение *Cyp1a1/Cyp2b10*). После введения ОАТ было отмечено значительное увеличение этого соотношения у обеих линий (рис. 1, в). Однако у BR этот показатель был достоверно выше, чем у DD, причем не только в группах с введением ОАТ, но и в контроле (рис. 1, в). Аналогичное соотношение было найдено и у интактных животных ( $1,52 \pm 0,33$  у DD против  $6,69 \pm 0,92$  у BR,  $p < 0,0004$ ). Эти данные свидетельствуют, что соотношение *Cyp1a1/Cyp2b10* может быть полезным для оценки чувствительности линий мышей к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу.

На основании полученных результатов можно предположить, что преобладание сигнального пути Ahг над сигнальным путем Car определяет резистентность к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу и что данный механизм опосредуется через регулирование интенсивности воспаления и скорость метаболизма ОАТ.

### Благодарности

Работа выполнена по базовым бюджетным проектам № VI.58.1.2 и VI.60.1.1 при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ № 11-04-00545-а.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Багинская Н.В., Ильницкая С.И., Никитенко Е.В., Каледин В.И. Промотирующее влияние орто-аминоазотолуола на гепатоканцерогенез сопровождается усилением воспалительных и пролиферативных процессов в ткани печени и снижением концентрации свободного тироксина в крови. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2007;144(12):672-676.
- Багинская Н.В., Перепечаева М.Л., Хоценко О.М., Душкин М.И. Влияние орто-аминоазотолуола на экспрессию генов PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , RXR- $\alpha$  и CAR в печени и уровень ИЛ-1 $\beta$  в крови у мышей контрастных по чувствительности к химическому гепатоканцерогенезу линий. Рецепция и внутриклеточная сигнализация. Пушино, 2009:1326-330.
- Каледин В.И., Серова И.А., Семенова Л.А. Неодинаковая предрасположенность к развитию спонтанных и индуцированных опухолей печени у мышей разных линий и их гибридов. Эксперим. онкология. 1990;12(4):28-30.
- Каледин В.И., Ильницкая С.И. Торможение метаболизма стимулирует, а активация метаболизма ингибирует канцерогенное действие орто-аминоазотолуола на печень мышей. Вopr. онкологии. 2011;57:216-220.
- Тимофеева О.А., Филипенко М.Л., Рыкова Н.А., Гуляева Л.Ф., Ляхович В.В. Экспрессия CYP1A в печени мышей линий A/SN и CC57BR, различающихся по чувствительности к гепатоканцерогенному действию о-аминоазотолуола. Биохимия. 2000;65(6): 842-847.
- Beigneux A.P., Moser A.H., Shigenaga J.K., Grunfeld C., Feingold K.R. Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. Biochem. Biophys Res. Commun. 2002;293:145-149.

- Chen C.J., Chen D.S. Interaction of hepatitis B virus, chemical carcinogen, and genetic susceptibility: Multistage hepatocarcinogenesis with multifactorial etiology. *Hepatology*. 2002;36:1046-1049.
- Cheung Y.L., Puddicombe S.M., Gray T.J., Ioannides C. Mutagenicity and CYP1A induction by azobenzenes correlates with their carcinogenicity. *Carcinogenesis*. 1994;15:1257-1263.
- Fan Y., Boivin G.P., Knudsen E.S., Nebert D.W., Xia Y., Puga A. The aryl hydrocarbon receptor functions as a tumor suppressor of liver carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010;70:212-220.
- Feo F., De Miglio M.R., Simile M.M., Muroli M.R., Calvisi D.F., Frau M., Pascale R.M. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006;1765:126-147.
- Gerbal-Chaloin S., Jankova I., Maurel P., Daujat-Chavanieu M. Nuclear receptors in the cross-talk of drug metabolism and inflammation. *Drug Metab. Rev*. 2013;45(1):122-144.
- Glass C.K., Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2010;10:365-376. DOI: 10.1038/nri2748
- Hanieh H. Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends. *Biomed. Res. Int*. 2014. DOI: 10.1155/2014/520763
- Huang W., Zhang J., Washington M., Liu J., Parant J.M., Lozano G., Moore D.D. Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol. Endocrinol*. 2005;19:1646-1653.
- Kolaya K.L., Stevenson D.E., Walborg Jr. E.F., Klaunig J.E. *Cancer Biology*: Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis. *Carcinogenesis*. 1995;17:947-954.
- Liedtke C., Trautwein C. The role of TNF and Fas dependent signaling in animal models of inflammatory liver injury and liver cancer. *Eur. J. Cell Biol*. 2012;91(6/7):582-589. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.10.001
- Marlowe J.L., Puga A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J. Cell Biochem*. 2005;96:1174-1184.
- Mikhailova O.N., Vasyunina E.A., Ovchinnikova L.P., Gulyaeva L.F., Timofeeva O.A., Filipenko M.L., Kaledin V.I. o-Aminoazotoluene does induce the enzymes of its own mutagenic activation in mouse liver. *Toxicology*. 2005;211:132-138.
- Miller E.C., Miller J.A. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*. 1981;47(10):2327-2345.
- Mitchell K.A., Lockhart C.A., Huang G., Elferink C.J. Sustained aryl hydrocarbon receptor activity attenuates liver regeneration. *Mol. Pharmacol*. 2006;70(1):163-170.
- Moennikes O., Loeppen S., Buchmann A., Andersson P., Itrich C., Poellinger L., Schwarz M.A. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res*. 2004;64:4707-4710.
- Nakagawa H., Maeda S. Inflammation- and stress-related signaling pathways in hepatocarcinogenesis. *World J. Gastroenterol*. 2012;18(31):4071-4081.
- Nebert D.W., Dalton T.P., Okey A.B., Gonzalez F.J. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem*. 2004;279:23847-23850.
- Patel R.D., Hollingshead B.D., Omiecinski C.J., Perdew G.H. Aryl hydrocarbon receptor activation regulates constitutive androstane receptor levels in murine and human liver. *Hepatology*. 2007;46:209-218.
- Patrick J.S., Klaassen C.D. Importance of hepatic induction of constitutive androstane receptor and other transcription factors that regulate xenobiotic metabolism and transport. *Drug Metab. Dispos*. 2007;35(10):1806-1815.
- Smetanina M.A., Pakharukova M.Y., Kurinna S.M., Dong B., Hernandez J.P., Moore D.D., Merkulova T.I. Ortho-aminoazotoluene activates mouse constitutive androstane receptor (mCAR) and increases expression of mCAR target genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2011;255:76-85.
- Tian Y., Ke S., Denison M.S., Rabson A.B., Gallo M.A. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J. Biol. Chem*. 1999;274:510-515.
- Vogel C.F., Matsumura F. A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family. *Biochem. Pharmacol*. 2009;77:734-745.
- Xie W., Yeuh M.F., Radomska-Pandya A., Saini S.P., Negishi Y., Bottruff B.S., Cabrera G.Y., Tukey R.H., Evans R.M. Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2003;100:4150-4155.
- Yamamoto Y., Moore R., Goldsworthy T.L., Negishi M., Maronpot R.R. The orphan nuclear receptor constitutive active androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. *Cancer Res*. 2004;64(20):7197-7200.
- Zacharova L.Yu., Gulyaeva L.F., Lyakhovich V.V., Mikhailova O.N., Timofeeva O.A., Filipenko M.L., Kaledin V.I. Cytochrome P4501A1 and 1A2 gene expression in the liver of 3-methylcholanthrene- and o-aminoazotoluene-treated mice: a comparison between PAH-responsive and PAH-nonresponsive strains. *Toxicol. Sci*. 2003;73:108-113.