

О.В. Максимчук, М.О. Чашин

Стресіндуковані зміни вмісту цитохрому P450 2E1 у печінці мишей при хронічному психоемоційному перенапруженні

Досліджено зміни експресії цитохрому P450 2E1 (CYP2E1) в печінці мишей, які зазнали психоемоційного стресу (ПЕС). Було показано дворазове відносно контролю зниження вмісту ферменту, який не повертався до норми навіть після відміни дії стресора. При цьому змін рівня мРНК Cyp2e1 не спостерігалось на жодному з етапів експерименту. Одночасно з цим виявлено достовірне зниження відносно контролю експресії hsp90 – одного з факторів, що визначає рівень деградації CYP2E1 у клітині. Показано також, що в печінці дослідних тварин розвивається оксидативний стрес, про що свідчить триразове збільшення вмісту малонового діальдегіду на тлі п'ятикратного зниження активності каталази. Зниження експресії цитохрому P450 2E1 у печінці мишей при ПЕС зумовлено інтенсифікацією пероксидних процесів і розвитком оксидативного стресу. При цьому зменшення вмісту білка CYP2E1, ймовірно, не пов'язано з hsp90-залежними процесами його деградації в клітині. Ключові слова: каталаза, цитохром P450 2E1, CYP2E1, mRNA Cyp2e1, hsp90, малоновий діальдегід, оксидативний стрес, психоемоційний стрес.

ВСТУП

Білок CYP2E1 є однією з ізоформ мікросомного цитохрому P450, що бере участь у біотрансформації ліпофільних речовин ендогенного та екзогенного походження. Цитохром P450 2E1-монооксигеназне окиснення гідрофобних ксенобіотиків призводить до утворення в їх молекулах реактивних груп. Активовані таким чином метаболіти кон'югують з молекулами глутатіону, спричинюючи утворення водорозчинних комплексів, що сприяє виведенню ксенобіотиків з організму. Варто зазначити, що завдяки реактивним групам ці метаболіти можуть взаємодіяти і з іншими біомолекулами, викликаючи різні структурно-функціональні пошкодження клітини [15].

Крім монооксигеназної, цитохром P450 2E1 виявляє також оксидазну активність у клітині, і, отже, є потужним клітинним прооксидантом [15]. Завдяки цьому він бере участь у підтриманні гомеостазу клітини, здійснюю-

чи регуляцію її прооксидантно-антиоксидантного балансу. Показано, що CYP2E1 генерує у своєму каталітичному циклі активні форми кисню (АФК), які викликають інтенсифікацію процесів пероксидного окиснення. Це може призводити до дисбалансу прооксидантно-антиоксидантних процесів і розвитку в клітині оксидативного стресу [10, 13, 15].

Такі CYP2E1-залежні процеси характерні головним чином для клітин печінки, оскільки саме в цьому органі спостерігається найвищий рівень експресії ферменту і здійснюється детоксикація більшості екзогенних речовин [13, 15]. Таким чином, CYP2E1 є не тільки одним з основних ферментів детоксикаційної системи, але і ключовою ланкою системи забезпечення гомеостазу клітин печінки, відіграючи важливу роль у регуляції багатьох фізіологічних процесів в організмі [8]. Тому зміни рівня експресії CYP2E1 в печінці можуть призводити до порушення функціонування організму як на клітинному,

© О.В. Максимчук, М.О. Чашин

так і на системному рівнях. Показано участь ферменту у розвитку багатьох локальних і системних патологій, таких як рак і цироз печінки, гепатит різної етіології, цукровий діабет, ожиріння тощо [10, 13, 15].

Рівень експресії CYP2E1 у клітинах печінки регулюється на всіх етапах його біосинтезу – від ініціації транскрипції до пострасляційних процесів [13]. На пострасляційному етапі вміст CYP2E1 у клітині контролюють молекулярні шаперони, зокрема hsp90. Так, в експериментах *in vitro* показано, що hsp90 сприяє протеасомній деградації ферменту, і специфічне його інгібування призводить до різкого збільшення вмісту білка CYP2E1 у клітині [12]. На експресію CYP2E1 можуть впливати різні фактори навколишнього середовища (хімічні, фізичні, біологічні тощо). Показано, що залежно від природи стресора спостерігається різний характер змін експресії CYP2E1 [5]. Останнім часом у зв'язку з прискоренням темпу життя надзвичайно актуальною є проблема психоемоційного перенапруження, що викликається хронічним впливом на організм психогенних факторів, внаслідок чого у людини розвивається психоемоційний стрес (ПЕС), і як результат – психосоматичні захворювання, які характеризуються дисфункціями практично всіх внутрішніх органів [1].

Відомо, що ПЕС сприяє інтенсифікації розвитку хронічних захворювань печінки [9, 16]. Вважається, що однією з найбільш імовірних причин такої прогресії захворювань може бути оксидативний стрес, який розвивається на клітинному рівні при дії різних стресорів [9, 16]. Показано, що в цих процесах ключову роль відіграє CYP2E1, підвищення активності якого може сприяти розвитку оксидативного стресу [10]. Водночас за умов оксидативного стресу інтенсифікація пероксидних процесів викликає зміни внутрішньоклітинного метаболізму, що в свою чергу змінює експресію ферменту в клітині [4].

Метою цієї роботи є дослідження змін

вмісту CYP2E1 у печінці мишей за хронічної дії психогенних стресорів з урахуванням факторів, що визначають його експресію – молекулярного шаперону hsp90 та рівня пероксидних процесів.

МЕТОДИКА

В експерименті було використано 20 самців мишей лінії C57Bl/6 віком 2,5 міс із середньою масою тіла 23 г розведення віварію Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ). Мишей утримували в стандартних умовах: інвертований добовий світловий режим, температура повітря – 18–20 °C та стандартна дієта. При моделюванні ПЕС у дослідних тварин відтворювали такі негативні емоції, як страх, тривога, агресія і т.д., тобто всі ті, що проявляються у людини, яка зазнала тривалого психоемоційного перенапруження [1]. Тварин було розділено порівну на чотири групи. I – контрольна, – тварини, які не зазнали дії стресора. Мишей – II, III, IV груп піддавали хронічному психоемоційному перенапруженню/стресу, здійснюючи щоденну чотиригодинну іммобілізацію протягом двох тижнів [7, 14]. При цьому тварин II групи декапітували на 7-му добу, а III – на 14-ту добу від початку експерименту. Мишей IV групи після двотижневої іммобілізації утримували ще 7 діб за стандартних умов. Декапітували мишей під легким ефірним наркозом згідно правил роботи з лабораторними тваринами [2].

Експресію генів *Cyp2e1* та *hsp90* на рівні мРНК досліджували за допомогою напівкількісного аналізу із застосуванням зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Для цього з печінки кожної тварини виділяли тотальну РНК [11], після чого на її матриці проводили синтез кДНК (для реакції використовували набір реагентів «First Strand cDNA Synthesis Kit», Fermentas, Литва). Для ПЛР були підібрані праймери, специфічні для генів *Cyp2e1*, *hsp90* та β -актину миші (останній використовува-

ли як внутрішній контроль). Таким чином праймери мали такий склад: для *Cyp2e1* – 5'AGGCTGTCAAGGAGGTGCTA3' (прямий) та 5'GGAAGTGTGCCTCTCTTTGG3' (зворотний), для *hsp90* – 5'AAAGGA GGCGGAATCTTCTC3' (прямий) та 5'TCTCTGTTGCTTCCCGACTT3' (зворотний), для β -актину – 5'ACTGCTCTGGCTCCTAGCAC3' (прямий) та 5'GAAAGGGTGTAAAACGCAGC3' (зворотний). В результаті ПЛР з використанням цих праймерів утворювалися продукти генів *Cyp2e1*, *hsp90* та β -актину довжиною 210, 200 та 212 пар нуклеотидів відповідно. У ПЛР усіх досліджуваних генів проводили первинну денатурацію при 94 °С протягом 1,5 хв з наступною циклічною реакцією, яка завершувалася тривалою елонгацією при 72 °С протягом 10 хв. Умови специфічних циклічних реакцій були такими: для *Cyp2e1* – 29 циклів склалися з етапів (кожен по 45 с) денатурації при 94 °С, віджигу при 54 °С та елонгації при 72 °С; для *hsp90* – 27 циклів: денатурація при 94 °С, віджиг при 55 °С і елонгація при 72 °С (кожен етап по 30 с); для β -актину – 27 циклів: денатурація при 94 °С, віджиг при 53 °С та елонгація при 72 °С (кожен етап по 40 с). ПЛР проводили на матриці кДНК (по 1,5 мкл) у реакційній суміші (об'ємом 25 мкл) такого складу: ПЛР-буфер (однократний), специфічні праймери (по 0,3 мкмоль/л кожного), суміш dNTP (0,2 ммоль/л), хлорид магнію (2,5 ммоль/л) та Taq-ДНК-полімераза (1 U). Продукти ПЛР розділяли в 2%-му агарозному гелі, фарбували бромистим етидієм та візуалізували за допомогою УФ-транслюмінатора. Рівні експресії CYP2E1 та *hsp90* на рівні мРНК представлено у відносних одиницях, які розраховували як відношення кількостей продуктів специфічних ПЛР *Cyp2e1* та *hsp90* до кількості продукту ПЛР β -актину.

Вміст білка CYP2E1 у тотальному лізаті печінки кожної тварини визначали за допомогою методу імуноблотингу [5]. При цьому використовували специфічні поліклональні антитіла: анти-CYP2E1 (отримані в нашій лабораторії) та анти-тубулін (Santa

cruz biotechnology, inc., США). Вміст білка CYP2E1 у кожному зразку печінки представлено у відносних одиницях, які розраховували як відношення кількості досліджуваного білка до кількості контрольного білка тубуліну. Кількість синтезованих у ЗТ-ПЛР продуктів генів, а також вміст білка у досліджуваних зразках оцінювали денситометричним методом за інтенсивністю люмінесценції/ забарвлення відповідних смуг, використовуючи спеціальну комп'ютерну програму Scion image 3.53.346.0. Рівень процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) визначали за вмістом у гомогенатах печінки малонового діальдегіду (МДА) [6]. Стан антиоксидантної системи оцінювали за рівнем активності каталази [3].

Для статистичної обробки результатів дослідження застосовували пакет програм Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США). Для оцінки відмінності між показниками, отриманими у дослідних та контрольній групах, використовували критерій t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ розглядали як критерій достовірної різниці. Результати представлено у вигляді середніх значень для $n = 5$ із зазначенням середніх квадратичних відхилень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведеного експерименту в печінці дослідних тварин було виявлено, що вміст МДА практично не змінювався через тиждень, але різко зростав (приблизно у 3 рази) через 2 тиж від початку дії стресора. При цьому активність каталази на 7-му добу знижувалася на 33% та значно зменшувалася (приблизно у 5 разів) на 14-ту добу дослідження (рис. 1).

Таким чином, отримані результати можуть свідчити про те, що в печінці дослідних тварин поетапно розвивається оксидативний стрес. При цьому різні його стадії мають певні особливості прооксидантно-антиоксидантних процесів. Перша стадія (7-ма доба експерименту) характеризується відносною

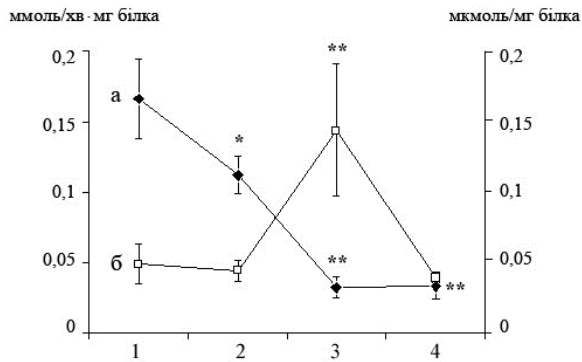


Рис. 1. Зміни активності каталази (а) та вмісту малонового діальдегіду (б) у печінці мишей при хронічній дії психо-емоційного стресора: 1 – контроль, 2 – 7 діб, 3 – 14 діб, 4 – 7 діб після відміни чотирнадцятиденної дії стресора. *P<0,05, **P<0,01 порівняно з контролем

компенсацією прооксидантних процесів, про що може свідчити нормальний рівень ПОЛ. Одночасно з цим активність каталази вже дещо знижена, що може вказувати на виснаження ресурсів антиоксидантної системи, які витрачаються на деактивацію АФК та підтримку процесів ПОЛ на фізіологічному рівні (див. рис. 1). На другій стадії (14-та доба експерименту) спостерігається значне порушення прооксидантно-антиоксидантного

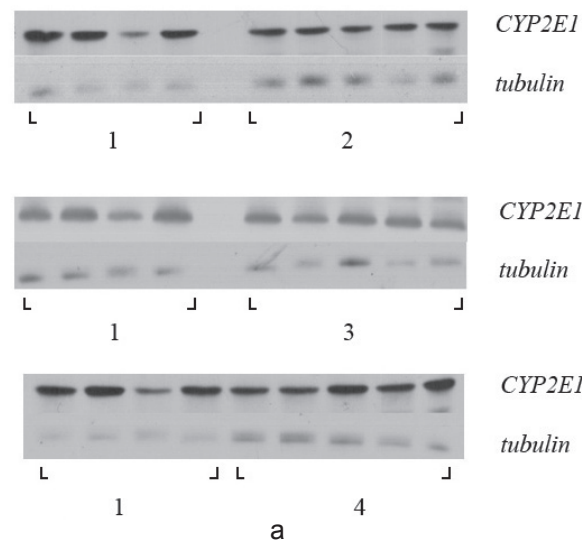
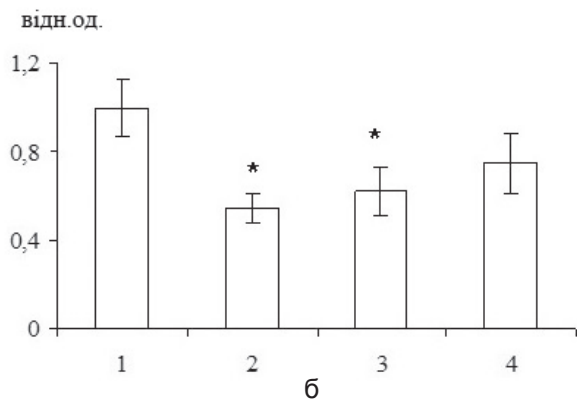


Рис. 2. Експресія CYP2E1 у печінці мишей при хронічній дії психоемоційного стресора: а – імуноблотинг тотальних лізатів печінки із використанням поліклональних антитіл до CYP2E1 та тубуліну (tubulin), б – середній вміст білка CYP2E1 у печінці мишей: 1 – контроль, 2 – 7 діб, 3 – 14 діб, 4 – 7 діб після відміни чотирнадцятиденної дії стресора. *P<0,05 порівняно з контролем

балансу в клітинах печінки. На виснаження антиоксидантних ресурсів вказує значне зниження активності каталази (див. рис. 1). При цьому, імовірно, стає неможливим підтримання прооксидантних процесів у фізіологічних межах. На це може вказувати різке збільшення вмісту МДА, яке спостерігається наприкінці другого тижня від початку дії стресора (див. рис. 1) та свідчить про високий рівень процесів ПОЛ у печінці мишей. Така інтенсифікація пероксидного окиснення може викликати глибоке виснаження ресурсів антиоксидантної системи, що в свою чергу призводить до накопичення вільних активних радикалів, які ушкоджують біомакромолекули та внутрішньоклітинні структури.

Після відміни двотижневої дії стресора активність каталази в печінці мишей залишається зниженою (див. рис. 1). Це може бути пов'язано із пригніченням біосинтетичних процесів, зокрема експресії каталази, внаслідок значних оксидативних ушкоджень, яких зазнали клітини печінки при хронічній дії стресора.

Розглянуті вище процеси не могли не позначитися на вмісті в клітині CYP2E1, який будучи мембранно-асоційованим білком, знаходиться в безпосередній близькості від епіцентру процесів ПОЛ. Дійсно, як видно з рис. 2, на першій стадії оксидативного стресу



спостерігається дворазове зниження вмісту білка СУР2Е1 в печінці тварин відносно контролю. Це, ймовірно, пов'язано з АФК-залежною «down-регуляцією», що призводить в умовах загрози порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу в клітині до зниження вмісту ферменту, який має потужні прооксидантні властивості [4].

На другій стадії оксидативного стресу вміст СУР2Е1 у клітинах печінки залишається таким самим (див. рис. 2), що вже може бути пов'язано з АФК-опосередкованими ушкодженнями внутрішньоклітинних структур і біомакромолекул. Цікаво, що на 7-му добу після відміни двотижневої дії стресора вміст білка СУР2Е1 дещо зростає, але не сягає контрольного рівня (див. рис. 2). Ймовірно, це пов'язано з процесами, які контролюють вміст прооксидантів у клітині в умовах все ще існуючої загрози порушення її прооксидантно-антиоксидантного балансу [4].

Як видно з рис. 3,а та 3,б вміст мРНК *Cyp2e1* протягом усього експерименту залишався в межах контрольних значень. Це свідчить про те, що зниження вмісту СУР2Е1 у печінці мишей, які зазнавали дії психогенного стресора, не пов'язано з інгібуванням транскрипції гена, а відбувається, ймовірно, внаслідок інтенсифікації процесів протеолізу білка.

Відомо, що у деградації СУР2Е1 активну роль відіграють молекулярні шаперони, зокрема hsp90 [1, 12]. Показано, що рівень експресії шаперонів змінюється при різних видах стресу, що є одним з адаптаційних процесів, спрямованих на нівелювання токсичних ефектів оксидативного стресу в клітині [1]. Нами були показані зміни експресії hsp90 у печінці мишей, які зазнали хронічного ПЕС: виявлено достовірне зниження у порівнянні з контролем вмісту мРНК hsp90 на всіх етапах експерименту (див. рис. 3). Отримані результати дають змогу припустити, що хронічна дія психогенного стресора не призводить до збільшення рівня hsp90 у клітині. Тому виявлене зниження вмісту СУР2Е1, ймовірно, не пов'язано з інтенсифікацією

hsp90-залежної деградації білка, а зумовлено посиленням пероксидних процесів.

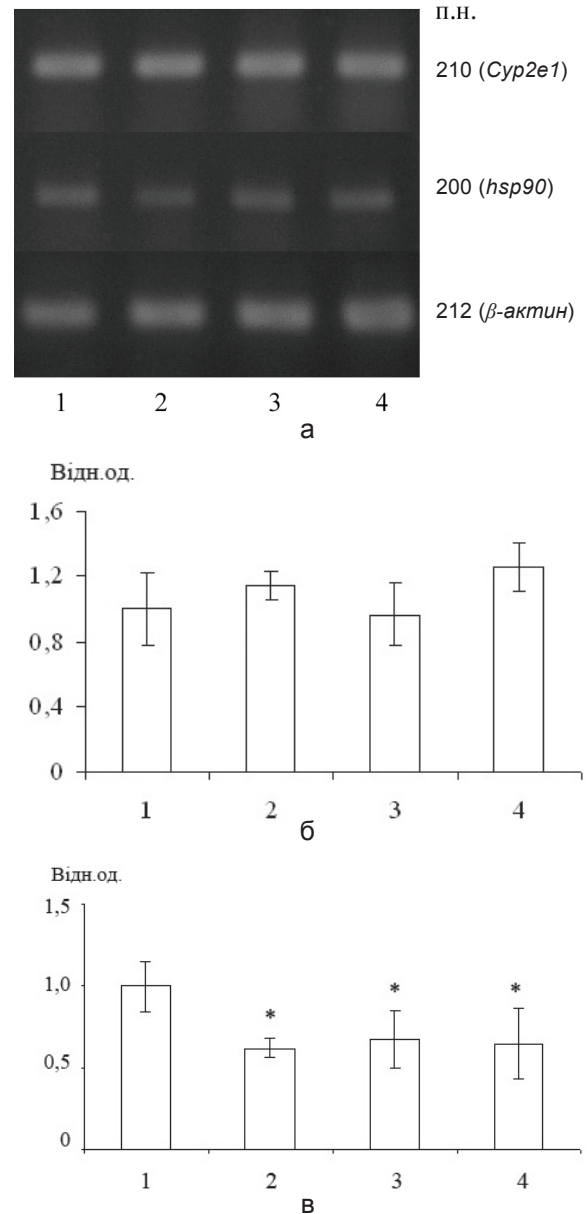


Рис. 3. Експресія генів *Cyp2e1* та *hsp90* у печінці мишей при хронічній дії психоемоційного стресора: а – електрофореграма продуктів *Cyp2e1* (210 п.н.), *hsp90* (200 п.н.)- та β -актин (212 п.н.)-специфічних зворотно-транскрипційних полімеразних ланцюгових реакцій (наведено дані одного з п'яти експериментів); б – середній рівень мРНК *Cyp2e1*; в – середній рівень мРНК *hsp90*: 1 – контроль, 2 – 7 діб, 3 – 14 діб, 4 – 7 діб після відміни чотирнадцятиденної дії стресора. * $P < 0,05$ порівняно з контролем; п.н. – пари нуклеотидів

Таким чином зниження рівня експресії цитохрому P450 2E1 у печінці тварин, які зазнали хронічного ПЕС, відбувається на тлі оксидативного стресу. Зниження вмісту ферменту зумовлено підвищенням рівня пероксидного окиснення, яке викликає інтенсифікацію процесів протеолізу. При цьому посилення протеолізу ймовірно не пов'язано з інтенсифікацією hsp90-залежних процесів деградації білка.

Автори статті вдячні провідному науковому співробітнику відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України А.М. Шиш та інженеру відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України І.В. Росохацькій за допомогу у проведенні біохімічних досліджень та в роботі з тваринами.

О. В. Максимчук, Н. А. Чашин

СТРЕССИНДУЦИРОВАННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОХРОМА P450 2E1 (CYP2E1) В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОМ ПЕРЕНАПРЯЖЕНИИ

Исследованы изменения экспрессии цитохрома P450 2E1 в печени мышей, испытывающих психоэмоциональный стресс (ПЭС). Было показано двукратное относительно контроля снижение содержания фермента, которое не приходило в норму даже после отмены действия стрессора. При этом изменений уровня мРНК *Cyp2e1* не наблюдалось ни на одном из этапов эксперимента. Одновременно с этим выявлено достоверное снижение относительно контроля экспрессии *hsp90* – одного из факторов, определяющих уровень деградации CYP2E1 в клетке. Показано также, что в печени опытных животных развивается окислительный стресс, о чем свидетельствует трехкратное увеличение содержания малонового диальдегида на фоне пятикратного снижения активности каталазы. Снижение экспрессии цитохрома P450 2E1 в печени мышей при ПЭС обусловлено интенсификацией перекисных процессов и развитием окислительного стресса. При этом уменьшение содержания белка CYP2E1, по-видимому, не связано с hsp90-зависимыми процессами его деградации в клетке. Ключевые слова: каталаза, цитохром P450 2E1, CYP2E1, мРНК *Cyp2e1*, *hsp90*, малоновый диальдегид, окислительный стресс, психоэмоциональный стресс.

O.V. Maksymchuk, M.O. Chashchyn

STRESS-INDUCED CHANGES IN THE CONTENT OF CYTOCHROME P450 2E1 IN THE LIVER OF MICE WITH CHRONIC PSYCHO-EMOTIONAL OVEREXERTION

In this work we investigated changes in the cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) expression level in the liver of mice that have been exposed to psycho-emotional stress (PES). It was shown twofold relative to control reduction of the enzyme, which does not normalize after termination of the stressor. The changes in level of *Cyp2e1* mRNA is not observed at any time point of the experiment. At the same time it was found a significant decrease in the expression level of *hsp90* – one of the factors determines of the level of CYP2E1 degradation in the cell. Also it was shown, the oxidative stress develops in the liver of experimental animals, and this is indicated by a 3-fold increase in the malondialdehyde level on the background of a 5-fold decrease in catalase activity. A decrease in the level of expression of cytochrome P450 2E1 in the liver of mice that have been exposed to psycho-emotional stress is due to the intensification of the peroxide process and the development of oxidative stress. Reduction of protein content of CYP2E1 is apparently not related to the hsp90-dependent processes of its degradation in the cell.

Key words: catalase, cytochrome P450 2E1, CYP2E1, *Cyp2e1* mRNA, *hsp90*, malondialdehyde, oxidative stress, psychoemotional stress.

Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А. Стресс: природа, біологічна роль, механізми. Исходы. – К.: Фітоцентр, 2006. – 424 с.
2. Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – К.: Авіцена, 2002. – 139 с.
3. Королюк М.А., Иванова А.И., Майорова И.Т., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.
4. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях // Бюл. СО РАМН. – 2005, –118, №4 – С. 7–12.
5. Максимчук О.В., Бездробна Л.К., Сидорик Л.Л., Кисельова О.К., Чашин М.О. Експресія цитохрому P-450 2E1 у печінці мишей за постійної та гострої дії γ -випромінювання // Укр.біохім. журн. – 2008. – 80, №4. – С. 59–65.
6. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. – В кн.: Современные методы биохимии / Под ред. Ореховича В.Н. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–67.
7. Шиш А.М., Кукоба Т.В., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Модифікація жирно кислотного складу мембран як

- фактор захисту міокарда при стресорному пошкодженні серця // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №2. – С. 17–23.
8. Arnold C., Konkel A., Fischer R., Schunck W. Cytochrome P450-dependent metabolism of -6 and -3 long-chain polyunsaturated fatty acids // Pharmacol. Rep. – 2010. – **62**, № 3. – P. 536–547.
 9. Chida Y., Sudo N., Kubo C. Does stress exacerbate liver diseases? // J Gastroenterol. Hepatol. – 2006. – **21**, № 1, Pt 2. – P. 202–208.
 10. Choi J., Ou J. H Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus // Amer J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2006. – **290**, № 5. – P. G847–851.
 11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal Biochem. – 1987. – **162**, № 1. – P.156–159.
 12. Goasduff T., Cederbaum A.I. CYP2E1 degradation by in vitro reconstituted systems: role of the molecular chaperone hsp90 // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – **2**. – P. 321–330.
 13. Gonzalez F. J. The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. CYP2E1 // Drug Metab Dispos. – 2007. – **35**, № 1. – P. 1–8.
 14. Ha H.Y., Kim K.S., Yeom Y.I., Lee J.K., Han P.L. Chronic restraint stress massively alters the expression of genes important for lipid metabolism and detoxification in liver // Toxicol. Lett. – 2003. – **146**, № 1. – P. 49–63.
 15. Tanaka E., Terada M., Misawa S. Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role // J. Clin. Pharm. Therap. – 2000. – **3**, № 25. – P. 165–175.
 16. Vere C.C., Streba C.T., Streba L.M., Ionescu A.G., Sima F. Psychosocial stress and liver disease status // World J. Gastroenterol. – 2009. – **15**, № 24. – P. 2980–2986.

Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
E.mail: prima@imbg.org.ua

Матеріал надійшов до редакції 31.07.2012