

## Експресія гена *Cyp2e1* у клітинах печінки мишей під впливом низьких доз радіації

О. В. Максимчук, І. М. Данко, І. В. Росохацька, М. О. Чашин

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

---

*Представлено результати стосовно особливостей експресії гена *Cyp2e1* у клітинах печінки мишей, що зазнали тривалого впливу низьких доз випромінювання. Показано, що рівень експресії гена *Cyp2e1* та відносний вміст цитохрому P450 знижуються при тривалій дії радіації. Виявлена різниця в рівні експресії гена *Cyp2e1* печінки у статевозрілих тварин обох статей дозволяє припустити, що регуляція експресії відбувається на транскрипційному або на посттранскрипційному рівні.*

---

Вступ. Завдяки великій кількості ізоформ цитохром P450 як основний елемент монооксигеназної системи бере участь у метаболізмі багатьох сполук ендо- та екзогенного походження. Особливо важливу роль він відіграє у знешкодженні продуктів вільнорадикального окислення, що утворюються під впливом тривалої дії іонізуючого випромінювання низької інтенсивності.

Головним компонентом мікосомного цитохрому P450 є ізофермент P450IIE1 (*Cyp2e1*) з молекулярною масою ~ 57 кДа [3]. Ген *Cyp2e1* складається з дев'яти екзонів та восьми інтронів, що становить приблизно 11 тис. п. н. Структурна ділянка гена *Cyp2e1* мишей має довжину 1482 п. н. [4, 5]. Рівень експресії гена *Cyp2e1* та активність ферменту залежать від типу тканин, віку та статі тварин [3, 6–8]. Максимальний рівень конститутивної експресії гена *Cyp2e1* та функціонально активного цитохрому P450 відмічено у клітинах печінки [3].

Встановлено, що у новонароджених тварин не виявляються ні мРНК, ні ферментативна активність гемопротеїду, але їхній рівень істотно зростає протягом перших тижнів післянатального розвитку і досягає максимуму у статевозрілому віці [6, 7]. Із збільшенням віку тварин рівень експресії гена та вміст ферменту знижуються [7, 8].

Внаслідок тривалого впливу низьких доз радіації виявлено дворазове підвищення рівня експресії

гена *Cyp2e1* у клітинах печінки дорослих щурів [9]. Встановлено також зниження вмісту мікосомного цитохрому P450 залежно від лінії та статі мишей [10].

Мета представленої роботи полягала в порівняльних дослідженнях рівнів експресії гена *Cyp2e1* та активності мікосомного цитохрому P450 у клітинах печінки мишей за дії низьких доз іонізуючого випромінювання Чорнобильського спектра.

Матеріали і методи. В роботі використано мишей ліній BALB/c, CC<sub>57</sub>W та C<sub>57</sub>Bl/6j масою 20–25 г. У дослідну групу входили тварини різного віку та статі, що народилися і певний час знаходилися в зоні відчуження під впливом постійного випромінювання низької інтенсивності (м. Чорнобиль). Тварини аналогічних ліній, віку та статі розведення віварію Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ), склали контрольну групу. В кожному досліді використано не менше шести тварин.

Вміст цитохрому P450 визначали в мікосомах печінки мишей за методом, що базується на здатності цитохрому P450 у відновленій формі зв'язуватися з СО і утворювати комплекс з максимумом поглинання при 450 нм [11]. Після декапітації тварин печінку промивали холодним 1,15 %-м розчином KCl. Мікосомну фракцію виділяли методом диференційного центрифугування. Постмітохондріальну фракцію центрифугували при 105000 g протягом 60 хв на центрифугу L5-50 («Beckman», Німеччина).

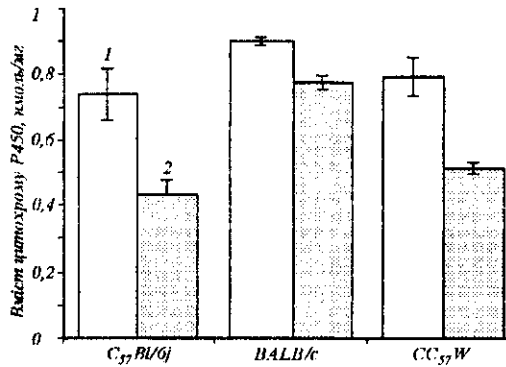


Рис. 1. Вміст функціонально активного цитохрому P450 у мікросомах печінки статевозрілих мишей різних ліній: 1, 2 — контрольні та чорнобильські тварини відповідно

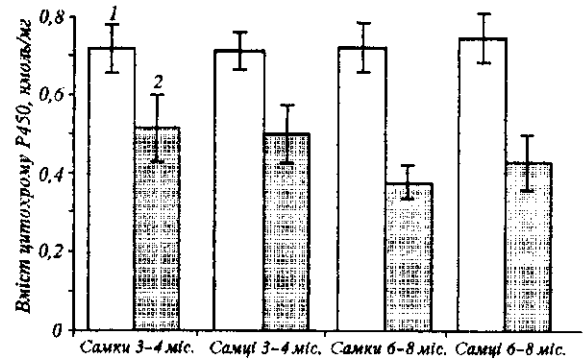


Рис. 2. Середній вміст функціонально активного цитохрому P450 у мікросомах печінки мишей лінії BALB/c: 1, 2 — контрольні та чорнобильські тварини відповідно

Вимірювання проводили в 100 мМ трис-НСІ-буфері (рН 7,4) на спектрофотометрі Specord M-40 («Carl Zeiss», Німеччина) при концентрації мікросомного білка 2 мг/мл. Цитохром відновлювали за допомогою дитіоніту ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Для розрахунку кількості цитохрому P450 використовували коефіцієнт молярної екстинкції, що дорівнює  $91 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Вміст гемопротейду виражали в наномолях на 1 мг мікросомного білка. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі в модифікації Петерсона [12].

Тотальну РНК виділяли з печінки мишей за допомогою гуанідинізоціанатного методу [13], кількість визначали спектрофотометрично. Електрофорез РНК (20 мкг) проводили у 0,8 %-му гелі агарози, що містив 3 % формальдегіду («Fluka», Швейцарія). Перенос РНК із гелю на нітроцелюлозні мембрани Hybond-N («Amersham Pharmacia Biotech», Велика Британія) здійснювали у розчині  $20 \times \text{SSC}$ .

Для гібридизації використано молекулярні зонди: ПЛР-продукт гена *Cyp2e1* та ген  $\beta$ -актину («Clontech», США), які мітили ( $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ )dCTP за допомогою набору реагентів «Rediprime» для мітки розсіяною затравкою («Amersham Pharmacia Biotech»). Питома активність ДНК-зондів складала  $\sim 1 \cdot 10^8$  імпл/хв на 1мкг ДНК.

Синтез кДНК проводили, використовуючи M-MuLV-ревертазу (20 од/мкл) та oligo(dT)<sub>18</sub>-праймер (0,5 мкг/мкл) з набору реагентів «First Strand cDNA Synthesis Kit» (MBI «Fermentas», Литва). Реакційна суміш (20 мкл) містила 10 мг тотальної РНК, oligo(dT)<sub>18</sub>-праймер — 0,025 мкг/мкл,  $10 \times$  реакційний буфер, інгібітор РНКаз — 1 од/мкл і M-MuLV ревертазу — 2 од/мкл. Отримана кДНК слугувала матрицею для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Ампліфікацію кДНК проводили за допомогою

рекомбінантної термостабільної Таq-полімерази з кінцевою концентрацією 0,025 од/мкл. Оптимальні умови проведення ПЛР: 30 циклів, температура синтезу 72 °С, денатурації — 92—94 °С, відпалювання — 66 °С. Як позитивний контроль при проведенні ПЛР використовували рMP<sub>202</sub> (кДНК *Cyp2e1* миші, клоновану в сайті *NotI* рBluescript IISK), одержану від д-ра Коліна Хендерсона з Шпиталю Данді Найнвелс (Велика Британія). Сенсовим праймером для ПЛР була олігонуклеотидна послідовність: 3'-GAATTC ATGGCGGTTCTTGGCATC-ACCGTTGC-5', антисенсовим — 5'-GGATCCTCA-TGAACGAGGAATGACACAGAG-3'.

Електрофорез продуктів ПЛР проводили у 1 %-му агарозному гелі. Необхідний фрагмент ДНК виділяли з гелю за допомогою набору реагентів («Geneclean III Kit» Bio 101, inc., США).

Передгібридизацію, гібридизацію та авторадіографію проводили згідно з протоколами Маніатіса [14]. Інтенсивність смуг на блятах оцінювали за допомогою спеціальної комп'ютерної програми «Scion image 1.6».

Результати і обговорення. Тривала дія низьких доз радіації призводить до розладу клітинного метаболізму і поступового виснаження антиоксидантної системи [15]. Зокрема, іонізуюче випромінювання є одним з факторів оточуючого середовища, що впливають на вміст та активність цитохрому P450 [10]. Оскільки максимальний рівень конститутивної експресії гена *Cyp2e1* спостерігається у печінці статевозрілих тварин [6, 7], то для досліджень використано 3—4- та 6—8-місячних мишей обох статей.

Із рис. 1, на якому представлено дані щодо зміни вмісту цитохрому P450 під впливом низьких доз випромінювання, видно значне зниження кількості активного ферменту залежно від лінії мишей

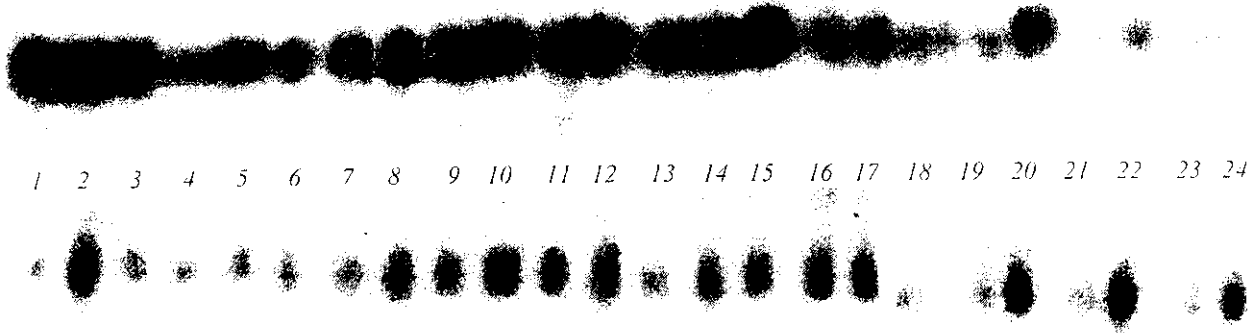


Рис. 3. Експресія мРНК гена *Cyp2e1* у печінці контрольних та чорнобильських мишей: а — Нозерн-блот-гібридизація з  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ дСТР ПЛР-продуктом гена *Cyp2e1*; б — контрольна Нозерн-блот-гібридизація відповідних блотів РНК з кДНК  $\beta$ -актину (самці: 1, 2 — контрольні тварини, 3—4 місяці; 3—5 — чорнобильські, 6—8 місяців; 6—11 — чорнобильські, 3—4 місяці; самки: 12—14 — контрольні тварини, 3—4 місяці; 15—17 — чорнобильські, 6—8 місяців; 18—24 — чорнобильські, 3—4 місяці)

(на 15—42 %). Найчутливішою до дії низьких доз радіації виявилася антиоксидантна система мишей ліній  $\text{CC}_{57}\text{W}$  та  $\text{BALB}/\text{c}$ , для яких встановлено зменшення вмісту ферменту на 42 та 36 % відповідно. Слід відзначити незначні індивідуальні коливання вмісту гемопротейду у контрольних тварин різних ліній.

В подальшому досліджували вплив низьких доз іонізуючого випромінювання на вміст цитохрому P450 у мишей різного віку та статі лінії  $\text{BALB}/\text{c}$  (рис. 2). Відносний вміст гемопротейду у контрольних тварин становить  $\sim 0,72$  нмоль/мг мікросомного білка. У мишей, що народилися і протягом 3—4 місяців знаходилися в зоні відчуження, спостерігалось зниження кількості мікросомного цитохрому P450 в середньому на 25 %. Зміна цього показника для самок складала 30 % порівняно з 21 % для самців, що свідчить про нижчу радіорезистентність самок.

Збільшення радіаційних навантажень за рахунок подовження часу перебування тварин на забрудненій радіонуклідами території призводить до істотнішого зменшення вмісту мікросомного цитохрому P450. Зокрема, у 6—8-місячних мишей-самців кількість ферменту знижується на 43 і 24 % порівняно з аналогічним показником для контрольних тварин та 3—4-місячних дослідних мишей відповідно. Суттєвіше зниження вмісту цитохрому P450 (приблизно на 46 %) зареєстровано у 6—8-місячних дослідних самок. Аналіз отриманих даних дозволяє зробити висновок, що антиоксидантна система самок є більш чутливою до дії низьких доз радіації.

Істотніше зниження вмісту цитохрому P450 у тварин, що зазнали тривалішого впливу іонізуючого випромінювання, можливо, пов'язане з інтенсифікацією процесу вільнорадикального окислення, гіперпродукцією та накопиченням токсичних про-

дуктів і певним виснаженням антиоксидантної системи. Отже, при збільшенні часу перебування на забрудненій радіонуклідами території знижуються як радіорезистентність тварин, так і вміст активних ферментів, що беруть участь у детоксикації клітин.

Слід відзначити неоднакову індивідуальну чутливість тварин до дії низьких доз іонізуючого випромінювання, про що свідчать коливання досліджуваного показника в межах окремих груп тварин. Виявлено, що для 3—4-місячних самок ці відміни істотніші порівняно з контрольними тваринами, 3—4-місячними самцями та 6—8-місячними мишами обох статей.

Оскільки цитохром P450 є основним ферментом, що бере участь у детоксикації продуктів окислення ненасичених жирних кислот, то зниження його вмісту свідчить про певну втрату здатності антиоксидантної системи метаболізувати гідропероксида та активні форми кисню, що утворюються при тривалій дії випромінювання низької інтенсивності. Зниження вмісту цитохрому P450 може бути наслідком як зменшення експресії гена *Cyp2e1*, так і результатом мутаційних змін у важливих (регуляторних чи структурних) ділянках гена.

Для пошуку механізмів, які контролюють зниження вмісту цитохрому P450, досліджено рівень експресії мРНК гена *Cyp2e1*. Для цього проведено гібридизацію тотальної РНК печінки з ПЛР-продуктом гена *Cyp2e1* (рис. 3). Аналіз отриманих даних показав, що рівень експресії гена *Cyp2e1* неоднаковий у тварин різного віку та статі. Максимальний рівень експресії зареєстровано у контрольних тварин. Лише у 6—8-місячних самців рівень експресії збільшений на 16 %, хоча ці дані статистично недостовірні. В той же час у самок аналогічного віку рівень експресії гена *Cyp2e1* дещо знижений (на 17 %). Значне зниження вмісту активного мікросомного цитохрому P450 у 6—8-

місячних тварин (на 43 % у самців та на 46 % у самок) при практично незмінному рівні експресії мРНК гена *Cyp2e1*, вірогідно, обумовлене не порушеннями на транскрипційному рівні, а, скоріше, є результатом посттрансляційних змін гемопротеїду та виснаження антиоксидантної системи при знешкодженні продуктів пероксидації ліпідів. Що стосується 3—4-місячних тварин, то для них зареєстровано зниження рівня експресії гена *Cyp2e1* приблизно на 32 %. Цей показник у самок в середньому вищий порівняно з самцями (36 та 28 % відповідно).

Слід зауважити, що зниження відносного вмісту цитохрому P450 у 3—4-місячних тварин практично відповідає рівню зменшення експресії мРНК гена *Cyp2e1*. Це може бути доказом того, що зміни вмісту активного ферменту у 3—4-місячних тварин обумовлені порушеннями в роботі механізмів, які контролюють синтез мРНК гена *Cyp2e1*.

Необхідно також відмітити значні індивідуальні відмінності в експресії гена *Cyp2e1* у клітинах печінки 3—4-місячних самок порівняно з контрольними та 6—8-місячними тваринами. Стабільніший рівень експресії мРНК гена *Cyp2e1* виявлено в межах групи дослідних самців аналогічного віку.

Отримані результати дозволяють припустити, що існують різні механізми, які контролюють вміст та активність цитохрому P450 на транскрипційному та посттрансляційному етапах, у тварин, що зазнали тривалого впливу низьких доз іонізуючого випромінювання.

*O. V. Maksymchuk, I. M. Danko, I. V. Rosohač'ka, M. O. Chaschyn*  
Gene *Cyp2e1* expression in mouse liver cells exposed to low-dose radiation

#### Summary

*This study presents results on gene Cyp2e1 expression peculiarities in mouse liver cells under continued exposure to low-dose radiation. The gene Cyp2e1 expression and cytochrome P450 relative content were shown to decrease under this exposure. Furthermore, the gene Cyp2e1 expression level was found to depend on the gender and age of animals. The differential expression levels of hepatic gene Cyp2e1 in the mature mice, suggest that regulation occurs at a transcriptional or posttranslational level*

*O. B. Максимчук, И. М. Данко, И. В. Росохацкая, Н. А. Чащин*  
Экспрессия гена *Cyp2e1* в клетках печени мышей под действием низких доз радиации

#### Резюме

*Представлены результаты, касающиеся особенностей экспрессии гена Cyp2e1 в клетках печени мышей, пребывавших длительное время под действием низких доз излучения. Показано, что уровень экспрессии гена Cyp2e1 и относительное содержа-*

*ние цитохрома P450 снижаются при долговременном действии радиации. Выявленные отличия в уровне экспрессии гена Cyp2e1 печени у половозрелых животных позволяют предположить, что регуляция экспрессии происходит на транскрипционном или посттрансляционном уровне.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Parke D. V., Joannides C., Lewis F.V. The role cytochromes P450 in the detoxication and activation of drags and other chemicals // *Can. J. Physiol. and Pharmacol.*—1991.—N 69.—P. 537—549.
2. Nebert D. W., Nelson D. R., Coon M. J. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature // *DNA Cell Biol.*—1991.—10.—P. 1—14.
3. Emoto C., Yamazaki H., Yamazaki S. Characterization of cytochrome P450 enzymes involved in drug oxidation in mouse intestinal microsomes // *Xenobiotica.*—2000.—30, N 10.—P. 943—953.
4. Freeman J. E., Stirling D., Russell A. L., Wolf R. cDNA deduced amino acid sequence, predicted gene structure and chemical regulation of mouse CYP2E1 // *Biochemistry.*—1992.—281.—P. 689—695.
5. Gonzalez F. J. Molecular genetics of the P450 superfamily // *Pharmacol. Ther.*—1990.—45.—P. 1—38.
6. Парамонова Г. И. Возрастные особенности изменения ферментов микросомального окисления печени крыс под влиянием барбитуратов // *Фармакология и токсикология.*—1981.—№ 1.—С. 98—101.
7. Arioshi T., Tsuboi K., Hamasaki K. Effects of age and sex on microsomal heme oxygenase and cytochrome P450 content in liver of rats // *J. Pharmacobiodyn.*—1981.—4, N. 9.—P. 664—669.
8. Porter T. D., Coon M. J. Cytochrome P450. Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. Minireview // *J. Biol. Chem.*—1991.—N 21.—P. 13469—13472.
9. Prima V. I., Glushakova L. G. Radiation-induced peculiarities of Cytochrome P450IIE1 and oncogenes mRNA accumulation in different rat tissues // *Biopolimery i kletka.*—1998.—14, N 6.—P. 540—544.
10. Глушакова Л. Г., Максимчук О. В., Данко И. М. Влияние факторов Чернобыльской зоны отчуждения на содержание цитохрома P450 в микросомах печени мышей // *Укр. биохим. журн.*—2000.—72, № 6. С. 63—66.
11. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes // *J. Biol. Chem.*—1964.—239, N 7.—P. 2370—2385.
12. Peterson G. L. Determination of total protein // *Meth. Enzymol.*—1983.—91.—P. 95—119.
13. Chomczynski P., Sacchi N. A simple and fast method to extract RNA from tissues, culture cells // *Biochemistry.*—1990.—9, N 6.—P. 5091—5094.
14. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbour Lab. press, 1982.—452 p.
15. Барабой В. А., Олійник С. А., Хмельєвський Ю. В. Стан антиоксидантної системи за дії іонізуючої радіації у низьких дозах та низької інтенсивності // *Укр. биохим. журн.*—1994.—66, № 4.—С. 3—18.

УДК 612.014.482:577.15.642  
Надійшла до редакції 28.12.2000