

Активність та експресія глутатіон S-трансферази P1 у плаценті людини залежно від генотипу та рівня експресії цитохрому P450 1A1

Н. М. Теплоук, Л. М. Лебедева, Л. Я. Сазонова, А. А. Самойленко,
М. С. Щербина, М. М. Перепелюк, М. Ю. Оболенська

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

E-mail: Obolenskaya@imbg.org.ua

Досліджено глутатіонтрансферазну активність цитозолу в зразках плаценти людини з різним генотипом цитохрому P450 1A1 і глутатіонтрансфераз класу P1 та M1, а також експресію глутатіонтрансферази P1 у культурі клітин хоріокарциноми людини за умов короткочасної індукції цитохрому P450 1A1 бензпіреном. Виявлено, що в клітинах плаценти у фізіологічних умовах і внаслідок короткочасної індукції цитохрому P450 1A1 глутатіонтрансферазна активність цитозолу та експресія глутатіонтрансферази позитивно корелюють з активністю/експресією цитохрому P450 1A1.

Вступ. Детоксикаційна система — це система ферментів, які здійснюють знешкодження ендogenous та численних чужорідних сполук (ксенобіотиків) і обумовлюють їхнє виведення з організму. Розрізняють дві послідовні стадії детоксикації — окислення мікросомними монооксигеназами, цитохромами P450 і кон'югацію продуктів окислення з такими речовинами, як глутатіон, глюкуронова, сірчана або оцтова кислоти під дією відповідно глутатіон S-трансфераз (ГТаз), UDP-глюкуронілтрансфераз, сульфотрансфераз або ацетилтрансфераз. На кожній стадії детоксикації вихідні сполуки залежно від їхньої природи можуть бути перетворені на менш реакційноспроможні, інактивовані або, навпаки, набувати більшої токсичності. Тому вища активність ферментів детоксикації не завжди є позитивною.

Для численних ксенобіотиків перша стадія детоксикації є активаційною, а друга — знешкоджуючою. Отже, співвідношення активностей фермен-

тів обох стадій є суттєвою складовою ефективності процесу детоксикації.

В організмі людини найактивніше детоксикація ксенобіотиків відбувається у печінці, меншою мірою — в інших органах, зокрема, в плаценті. Перебіг вагітності та стан здоров'я дитини залежать від ефективності детоксикації в цьому органі. В плаценті на відміну від інших тканин експресуються поодинокі ферменти детоксикації — цитохром P450 1A1, CYP1A1 і ГТаз класу π (GSTP1) і класу μ (GSTM1). Активність GSTP1 складає близько 95 % загальної ГТазної активності в плаценті. Через обмежену експресію ферментів детоксикації плаценту можна розглядати як надану природою модель для дослідження процесів детоксикації. Гени CYP1A1, GSTP1 та GSTM1 є поліморфними, що зумовлює індивідуальну каталітичну активність відповідних білків.

Мета роботи полягала в з'ясуванні питання, як узгоджується функціонування ферментів двох послідовних стадій детоксикації з огляду на поліморфність ферментів і їхню індукцибельність.

Показано, що ГТазна активність цитозолу в зразках з ізоформою CYP1A1 Ile/Val вища, ніж у

© Н. М. ТЕПЛОУК, Л. М. ЛЕБЕДЕВА, Л. Я. САЗОНОВА,
А. А. САМОЙЛЕНКО, М. С. ЩЕРБИНА, М. М. ПЕРЕПЕЛЮК,
М. Ю. ОБОЛЕНСЬКА, 2002

зразках з CYP1A1 Ile/Ile ізоформою. Короткочасна індукція експресії CYP1A1 супроводжується підвищенням ГТазної активності цитозолу.

Матеріали і методи. Техніку забору зразків зрілої плацентарної тканини, їхньої обробки та зберігання перед використанням для біохімічних аналізів, принципи складання персональних опитувальників описано раніше [1, 2]. Глутатіонтрансферазну активність цитозолу визначали в реакції з хлординітробензолом (ХДНБ) [3]. Генотип ферментів CYP1A1, GSTP1 та GSTM1 визначали за довжиною рестрикційних фрагментів відповідних ділянок ДНК, які було ампліфіковано за допомогою полімеразної ланцюгової реакції [4–6].

Клітини хоріокарциноми людини лінії BeWo (ATCC) культивували в рекомендованих умовах (у 30 мл Ham's F12 середовища (PAA Laboratories GmbH, Німеччина) з 10 % ембріональної телячої сироватки (PAA), 2 мМ L-глутаміном («Serva», Німеччина), 0,0064 %-м пеніциліном («Serva»), 0,0117 %-м стрептоміцином («Serva») та 0,001 %-м ципробаном («Serva») у флаконах об'ємом 650 мл (Sarstedt Inc., США) з вентиляційною кришкою при 37 °С, 16 % O₂, 5 % CO₂ та вологості 95 %. Середовище змінювали раз на 2 доби, клітини трипсинізували та пересівали кожні 5–7 діб.

Для експерименту клітини висівали на чашки. Після росту протягом доби середовище змінювали на свіже і додавали бензо(а)пірен («Sigma», США) у 0,001 % диметилсульфоксиді (ДМСО) до кінцевої концентрації 50 мкМ (у контролі — лише 0,001 % ДМСО). Після 48 год інкубації з бензо(а)піреном клітини промивали двічі Na-фосфатним буфером, знімали шкребком та використовували для Вестерн- і Нозерн-аналізів за стандартними протоколами [7, 8].

У процесі Вестерн-аналізу гібридизацію фільтрів проводили протягом ночі при температурі 4 °С з антисироваткою до CYP1A1 людини (BIOTREND

Chemikalien GmbH, Німеччина), яку розводили 1/1000 у буфері 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ NaCl та 0,1 %-й Tween 20 з 5 %-м молочним порошком. Гібридизаційні сигнали підсилюючої хемілюмінесцентної системи виявляли за допомогою ECL+ («Amersham», Велика Британія). Гібридизацію фільтрів здійснювали з кДНК-зондом до GSTP1 людини, що був люб'язно наданий д-ром Кано (Японія).

Результати розраховували за допомогою програми Gel-Pro Analyzer версії 3.1 (Media Cybernetics, L. P. in Silver Spring, MD, USA, 1993–97). Дані Нозерн-аналізу нормалізували за результатом гібридизації з β-актином. Для Вестерн-аналізу кількість білка в пробі визначали за Бредфордом [9].

Результати і обговорення. В зразках зрілої плаценти від породіль із центральної України нами визначено характер поліморфізму генів CYP1A1, GSTP1 та GSTM1 у положеннях основ/амінокислот, наведених у таблиці, а також ГТазну активність цитозолу із штучним субстратом ХДНБ. Результати ферментативної активності проаналізовано залежно від характеру генотипу ферментів. ГТазна активність цитозолу знижується в ряду Ile/Ile-, Ile/Val- та Val/Val-ізоформ білка GSTP1, що узгоджується з даними літератури [10]. ГТазна активність цитозолу не виявляє залежності від генотипу GSTM1, ймовірно, за рахунок меншої присутності цієї ізоформи у плаценті.

У носіїв гетерозиготної форми Ile/Val білка CYP1A1 ГТазна активність цитозолу достовірно вища, ніж у носіїв гомозиготної форми Ile/Ile (56,5±17,4 проти 22,1±2,4 нмоль/мг білка за 1 хв, p < 0,01). Оскільки вищезазначена різниця зберігається серед осіб, у яких відсутня GSTM1, то це наводить на думку, що активність GSTP1 — ферменту другої стадії детоксикації якимось чином залежить від генотипу ферменту першої стадії де-

Ферменти детоксикації у плаценті людини та їхній генетичний поліморфізм

Ген	Фермент	Мутації		Каталітична активність	Алельні варіанти	Генотип
		в гені	в білку			
CYP1A1	Цитохром P450 1A1	4889: A → G	AMK462: Ile → Val	Val > Ile	Ile, Val	Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val
GSTP1	Глутатіонтрансфераза P1	1403: A → G	AMK104: Ile → Val	Val < Ile (субстрат ХДНБ)	Ile, Val	Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val
GSTM1	Глутатіонтрансфераза M1	Делеція	Відсутні	Відсутня	(+), (-)	GSTM1 (+), GSTM1 (-)

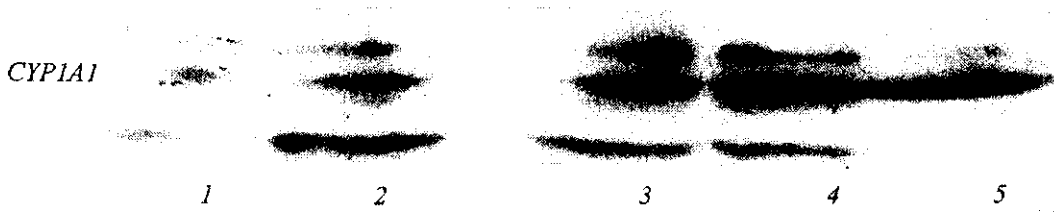


Рис. 1. Індукція CYP1A1 білка за даними Вестерн-аналізу: 1, 2 — білки з культури клітин BeWo після 48 год інкубації з 0,001 % ДМСО; 3–4 — після 48 год інкубації з 50 мкМ бензо(а)піреном у 0,001 % ДМСО; 5 — білки з культури HepG2 клітин як позитивний контроль



Рис. 2. Індукція GSTP1 мРНК за даними Нозерн-гібридизації: 1 — тотальна РНК з культури клітин BeWo після 48 год інкубації з 0,001 % ДМСО; 2 — після 48 год інкубації з 50 мкМ бензо(а)піреном у 0,001 % ДМСО; 3 — РНК з культури HepG2 клітин як негативний контроль

токсикації CYP1A1. Дані щодо каталітичної активності/експресії Ile- та Val-форм CYP1A1 суперечливі, але більшість з них свідчить про вищу активність/експресію Val-форми [11–13]. Це означає, що на I стадії детоксикації утворюється більше продуктів реакції. Вони, в свою чергу, є субстратами ферментів II стадії детоксикації, а іноді й індукторами генів, що кодують ці ферменти. Такі речовини, що індукують ферменти обох стадій детоксикації (на рівні транскрипції їхніх генів), називають біфункціональними індукторами.

Раніше було встановлено, що наявність функціональних цитохрома P450 та Ah рецептора необхідна для активації генів деяких ферментів II стадії (як, наприклад, GSTYа щура або N-квінон редуктази миши) біфункціональними індукторами, але не потрібна для індукції їх окисленими похідними. Через це була запропонована схема, згідно з якою не самі біфункціональні індуктори активують

гени ферментів II стадії, а їхні метаболіти — продукти перетворення цитохромом P450 [14–16].

Щоб з'ясувати, чи є продукти монооксигеназної реакції за участю CYP1A1 індукторами гена GSTP1 у плаценті людини, нами проведено дослід з клітинами хоріокарциноми людини BeWo, які культивували за присутності 50 мкМ бензо(а)пірену, типового субстрата та індуктора білка CYP1A1. Через 48 год від початку культивування клітин виявлено підвищення в 3,4 разу вмісту білка CYP1A1 (за даними Вестерн-блот аналізу (рис. 1), що узгоджується з даними [17], а також у 5 разів вищий вміст GSTP1-специфічної мРНК (за нормалізованими результатами Нозерн-гібридизації) (рис. 2).

Отже, в клітинах плаценти людини як за фізіологічних умов, так і внаслідок короточасної дії бензо(а)пірену вища активність CYP1A1 супроводжується вищою експресією/активністю GSTP1. Роль індукторів GSTP1 можуть виконувати або продукти окислення вихідних сполук, або побічні продукти монооксигеназної реакції — супероксидний радикал та його мішені. За нашими попередніми результатами, у носіїв Ile/Val-форм CYP1A1 вміст продуктів перекисного окислення ліпідів вищий, ніж у носіїв Ile/Ile-форм, а також нижчий рівень відновлених низькомолекулярних тіолів [1]. Тобто участь супероксидного радикала і зсуву окисно-відновлювального потенціалу в кислотний бік в індукції GSTP1 вельми вірогідна.

З огляду на наведені в цій роботі результати виникає потреба в обговоренні даних щодо зниження ГТазної активності цитозолу в зразках плаценти, які було отримано в хімічно забрудненому (переважно бензо(а)піреном) Запоріжжі [2]. Зниження носило зворотний характер і ГТазна активність поверталася до норми *in vitro* відновлюючим агентом дитіотрейтолом [2]. Білок GSTP1 містить дві легко окислювальні SH-групи цистеїну і відомо, що при їхньому окисленні фермент зворотно інактивується [18]. Отже, у випадку хронічного впливу ксенобіотиків, на відміну від коротко-

часного впливу, фермент інактивується і, можливо, за рахунок окислення SH-груп.

Так само можна пояснити і той факт, що куріння протягом вагітності призводить до значної індукції CYP1A1, але не змінює або навіть дещо пригнічує ГТазну активність у плаценті людини [19], адже основним ксенобіотиком, який потрапляє до організму при курінні, є бензо(а)пірен.

Нарешті є літературні дані про індукцію ГТазної активності в плаценті щурів, що отримували бензо(а)пірен з їжею протягом вагітності, та пригнічення активності наприкінці вагітності [20]. Натомість детоксикацію у тварин не можна повністю розглядати як модель детоксикації у людини через велику різницю у паттерні експресії та регуляції детоксикаційних ферментів (зокрема GSTP1) між цими видами.

Таким чином, вірогідно, що ГТазна активність у плаценті людини залежить серед інших факторів від довготривалості впливу ксенобіотиків та від індивідуальних особливостей генотипу CYP1A1 та GSTP1, що має бути враховано при оцінюванні стану детоксикаційної спроможності не лише плаценти, але й організму в цілому.

N. M. Teplyuk, L. M. Lebedeva, L. Ya. Sazonova, A. A. Samoilenko, M. S. Scherbina, M. M. Perepelyuk, M. Yu. Obolenskaya

Glutathione S-transferase P1 activity and expression in human placenta depending on CYP1A1 genotype and expression level

Summary

The cytosolic glutathione S-transferase activity was studied in human placenta samples of different CYP1A1, GSTP1 and GSTM1 genotypes. The GSTP1 gene expression was also detected in human choriocarcinoma cells (BeWo) under conditions of the CYP1A1 short-time induction by benzo(a)pyrene. There was a positive correlation between GSTP1 activity/expression and CYP1A1 activity/expression in full-term human placenta under physiological conditions as well as upon the short-time CYP1A1 induction in BeWo cells.

H. H. Теплок, Л. М. Лебедева, Л. Я. Сазонова, А. А. Самоїленко, М. С. Щербина, М. М. Перепелюк, М. Ю. Оболенская

Активность и экспрессия глутатион-S-трансферазы P1 в плаценте человека в зависимости от генотипа и уровня экспрессии цитохрома P450 1A1

Резюме

Исследована глутатионтрансферазная активность цитозоля в образцах плаценты человека с разными генотипами цитохрома P450 1A1 и глутатионтрансфераз класса P1 и M1, а также экспрессия глутатионтрансферазы P1 в культуре клеток хориокарциномы человека в условиях кратковременной индукции цитохрома P450 1A1 бензо(а)пиреном. Обнаружено, что в клетках плаценты при физиологических условиях и в

результате кратковременной индукции цитохрома P450 1A1 глутатионтрансферазная активность цитозоля и экспрессия глутатионтрансферазы позитивно коррелируют с активностью/экспрессией цитохрома P450 1A1.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Теплок Н. М., Лебедева Л. М., Коломиец Л. И., Буткевич Д. М., Хоронжи М. Р., Пуарье М. С., Оболенская М. Ю. Фено- и генотипирование дезинтоксикационной системы плаценты в экологически неблагоприятных районах Украины // Укр. біохім. журн.—2001.—73, № 3.—С. 126—134.
2. Оболенська М. Ю., Чайковська Т. Л., Лебедєва Л. М., Теплок Н. М., Коломієць Л. І., Іванська Н. В., Діденко Л. В., Некрич В. В., Бурлак Г. Ф. Дезінтоксикаційна функція плаценти у породіль з екологічно несприятливих районів України // Укр. біохім. журн.—1997.—70, № 2.—С. 89—97.
3. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione-S-transferase // J. Biol. Chem.—1974.—249, N 22.—P. 7130—7139.
4. Shields P. G., Bowman E. D., Harrington A. M., Doan V. T., Weston A. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes // Cancer Res.—1993.—53, N 15.—P. 3486—3492.
5. Harries L.-W., Stubbins M.-J., Forman D., Howard G. C. W., Wolf P. R. Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase P1 locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer // Carcinogenesis—1997.—18, N 4.—P. 641—644.
6. Comstock K. E., Sanderson B. J. S., Clafin G., Henner W.-D. GST1 gene deletion determined by polymerase chain reaction // Nucl. Acids Res.—1990.—18, N 12.—P. 3670.
7. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem.—1987.—162, N 1.—P. 156—159.
8. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—Vol. 1.—P. 7.39—7.52; Vol. 3.—P. 18.60—18.73.
9. Bradford M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.—1976.—72.—P. 248—254.
10. Zimniak P., Nanduri B., Pikula S., Bandorowicz-Pikola J., Singhal S. S., Srivastava S. K., Awasthi S., Awasthi Y. C. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP 1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzyme properties // Eur. J. Biochem.—1994.—224, N 3.—P. 893—899.
11. Kawajiri K., Nakachi K., Imai K., Watanabe J., Hayashi S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility // Crit. Rev. Oncol./Hematol.—1993.—14, N 1.—P. 77—87.
12. Landi M. T., Bertazzi P. A., Clark G., Lucier G. W., Garte S. J., Cosma G., Shields P. G., Caporaso N. E. Susceptibility markers in normal subjects: a pilot study for the investigation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin related diseases Chemosphere.—1993.—27.—P. 375—381.
13. Crofts F., Taioli E., Trachman J., Cosma G. N., Currie D., Toniolo P., Garte S. J. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes // Carcinogenesis.—1994.—15, N 12.—P. 2961—2963.
14. Prochaska H. J., Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver // Cancer Res.—1988.—48, N 17.—P. 4776—4782.

15. *Friling R. S., Bensimon A., Tichauer Y., Daniel V.* Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 16.—P. 6258—6262.
16. *De Long M. I., Santamaria A. B., Talalay P.* Role of cytochrome P₁-450 in the induction of NAD(P)H: quinone reductase in a murine hepatoma cell line and its mutants // *Carcinogenesis.*—1987.—8, N 10.—P. 1549—1553.
17. *Zhang L., Connor E. E., Chegini N., Shiverick K. T.* Modulation by benzo[a]pyrene of epidermal growth factor receptors, cell proliferation, and secretion of human chorionic gonadotropin in human placental cell lines // *Biochem. Pharmacol.*—1995.—50, N 8.—P. 1171—1180.
18. *Ricci G., Del Boccio G., Pennelli A., Lo Bello M., Petruzzelli R., Caccuri A. M., Barra D., Federici G.* Redox forms of human placenta glutathione transferase // *J. Biol. Chem.*—1991.—266, N 32.—P. 21409—21415.
19. *Manchester D. K., Jacoby E. H.* Glutathione S-transferase activities in placentas from smoking and non-smoking women // *Xenobiotica.*—1982.—12, N 9.—P. 543—547.
20. *Cervello I., Giralt M., Nogues M. R., Ortin F., Puerto A. M., Mallo J.* Modifications of glutathione S-transferase (GST) activity in the last period of pregnancy in rats treated with benzo(a)pyrene (BP) // *Placenta.*—1994.—15, N 4.—P. 431—440.

УДК 577.152.28

Надійшла до редакції 23.01.02