

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА НА СОДЕРЖАНИЕ P-4502E1 В МИКРОСОМАХ И ФРАКЦИЯХ ЛИЗОСОМ НА ФОНЕ ИНДУКЦИИ ИЗОНИАЗИДОМ

Л. В. Вохминцева¹

Исследовали влияние адреналина на содержание цитохрома P-4502E1 в микросомах и лизосомах печени крыс Вистар на фоне индукции изониазидом. Введение адреналина привело к усилению аутофагоцитоза и деградации цитохрома P-4502E1 в вакуольно-лизосомальном аппарате печени. Индукция изониазидом снижала содержание и активность цитохрома P-4502E1 в лизосомах как низкой, так и высокой плотности. Адреналин, введенный на фоне индукции изониазидом, повышал содержание P-4502E1 в лизосомах за счет усиления аутофагоцитоза.

Ключевые слова: цитохром P-4502E1, адреналин, изониазид, лизосомы

ВВЕДЕНИЕ

Цитохром P-4502E1 конститутивно экспрессируется в печени и других тканях и метаболизирует химические соединения различной структуры, включая потенциальные канцерогены. Кроме того, цитохром P-4502E1 обладает уникальной способностью восстанавливать молекулярный кислород до высокоактивных метаболитов кислорода, инициируя перекисное окисление липидов, конечные продукты которого не только стимулируют выработку иммунными клетками провоспалительных цитокинов, но и приводят к образованию белковых агрегатов, запуская аутоиммунные процессы [4]. Регуляция экспрессии цитохрома P-4502E1 является комплексной и осуществляется на различных этапах белкового синтеза и катаболизма белка. Деградация цитохрома P-4502E1 происходит при участии убиквитина и протеасом [7]. В настоящее время остаются невыясненными механизмы гормональной регуляции лизосомального протеолиза цитохром P-450-зависимых монооксигеназ при изменении уровня адаптивных гормонов. Целью настоящего исследования явилось изучение роли отдельных фракций лизосом в деградации цитохрома P-4502E1 и особенности его протеолиза в условиях повышенного уровня адреналина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на самках линии Вистар массой 180–220 г (виварий Института биохимии СО РАН, Новосибирск). Животные получали полноценный общевиварный рацион и воду *ad libitum*. Перед забоем в течение 12 ч животных лишали пищи. Индукцию ферментов микросомальной системы окисления (цитохром P-4502E1) вызывали введением животным изониазида в течение трех дней в дозе 250 мг/кг внутривнутрибрюшинно. С целью изучения влияния адреналина на деградацию ци-

тохрома P-4502E1 гормон вводили за 1 ч до опыта однократно подкожно в дозе $5,5 \cdot 10^{-6}$ моль/кг, характерной для состояния напряжения при ответе организма на действие чрезвычайных факторов среды [1].

Количество животных в группах — 12. Все болезненные процедуры выполняли согласно Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Контролем служил материал от интактных животных ($n = 16$) соответствующего возраста, находящихся на общевиварном рационе.

В микросомах печени крыс оценивали содержание общего цитохрома P-450, изоформы P-4502E1 и активность п-нитрофенолгидроксилазы (п-НФ-гидроксилаза). Отсутствие активности маркерных лизосомальных ферментов кислой фосфатазы и катепсина Д свидетельствовало о чистоте микросомальной фракции. Из гомогената печени получали фракции легких ($d = 1,1 - 1,12$ г/см²) и тяжелых лизосом ($d = 1,19 - 1,21$ г/см²), в которых определяли содержание общего цитохрома P-450 и цитохрома P-4502E1, активность п-НФ-гидроксилазы, общую активность маркерного фермента лизосом — кислой фосфатазы. Отсутствие активности маркерного фермента эндоплазматического ретикулаума глюкозы-6-фосфатазы свидетельствовало о чистоте фракций лизосом.

Общее содержание P-450 оценивали по методу Т. Omura и R. Sato (1964). Определение содержания цитохрома P-450PE1 в микросомах и лизосомах проводили с помощью иммуноферментного анализа, используя поликлональные антитела (AT2E1), полученные в Институте молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН [9]. Содержание белка в гомогенате определяли по методу J. N. Lowry и соавт. (1951). Определение активности кислой фосфатазы проводили по методу C. de Duve и соавт. [6]. Активность п-НФ-гидроксилазы определяли по скорости образования 4-нитрокатахола [12].

При статистическом анализе данных использовали методы вариационной статистики. Определение достоверности различий сравниваемых параметров между разными выборками проводили с использованием непарного

¹ Кафедра биологической химии (зав. — проф. В. И. Шарапов) ГОУ ВПО “Новосибирский государственный медицинский университет”, Новосибирск, 630091, Красный проспект, 52.

критерия Стьюдента (достоверным считали различия при $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Деградация внутриклеточных белков, в том числе белков эндоплазматического ретикулума, осуществляется двумя основными путями — вакуольно-лизосомальным и с участием протеасом. Соотношение этих путей деградации в разных клетках организма различно. Полагают [3], что протеасомам принадлежит основная роль в деградации внутриклеточных белков. Результаты наших исследований показали наличие цитохрома P-450 в лизосомах у интактных животных, что согласуется с данными зарубежных авторов об участии лизосом в деградации белков эндоплазматического ретикулума [11].

Изучение лизосомального протеолиза цитохрома P-450 и цитохрома b_5 проводили в субпопуляциях лизосом. Содержание общего цитохрома P-450 в лизосомах низкой плотности превышало таковое в лизосомах высокой плотности и составило $0,1 \pm 0,01$ нмоль/мг (лизосомы низкой плотности) и $0,06 \pm 0,004$ нмоль/мг (лизосомы высокой плотности).

Цитохром P-450E1, подвергаясь предварительной убиквитинизации, разрушается в 26S протеасомах [7]. Причем возможна деградация как предварительно инактивированного фермента, так и нативного [11]. Различия в экспериментальных данных участия протеасом и лизосом в деградации внутриклеточных белков, возможно, найдут объяснение в работах, появившихся в последние годы и выявляющих взаимосвязь двух основных путей внутриклеточного протеолиза. Протеасомы участвуют в начальном этапе лизосомальной деградации мембранных белков — секвестрации клеточного материала. Кроме того, присоединение убиквитина к белковым молекулам, является не только сигналом к деградации в цитозольном мультиферментном комплексе — протеасомах, но и также необходимо для направленного транспорта белков в лизосомы с последующим их разрушением в этом компартменте клетки [5].

Использование иммуноферментного метода показало наличие цитохрома P-450E1 в лизосомах. Распределение данной изоформы было аналогично распределению общего цитохрома P-450 в субпопуляциях лизосом печени крыс. Оценка п-НФ-гидроксилазной активности, специфичной для цитохрома P-450E1, показало преобладание таковой в лизосомах высокой плотности (табл. 1).

Введение животным изониазида не сопровождалось изменением количества общего цитохрома P-450 в микросомах ($0,75 \pm 0,02$ нмоль/мг), но наблюдалось повышение содержания цитохрома P-450E1 и п-НФ-гидроксилазной активности в микросомах (табл. 2) и снижение деградации данной изоформы в лизосомах.

Данные исследования показали уменьшение количества цитохрома P-450E1 и п-НФ-гидроксилазной активности в лизосомах разной плотности (табл. 1). В основе индукции изониазидом цитохрома P-450E1 и уменьшение его деградации лежит стабилизация молекулы фермента субстратом [10].

Экспрессия внутриклеточных белков находится под регуляторным контролем многих факторов, в том числе и гормонов. Представляется важным исследовать влияние адреналина, включающегося одним из первых в процесс адаптации, на лизосомальную деградацию цитохрома P-450. В предварительных экспериментах было показано, что адреналин усиливает аутофагоцитоз в клетках печени, о чем свидетельствует повышение активности кислой фосфатазы в лизосомах с плотностью $1,12 - 1,15$ г/см², которые соответствуют аутофаголизосомам. Под влиянием адреналина содержание цитохрома P-450 в микросомах печени крыс незначительно повысилось до $0,94 \pm 0,01$ нмоль/мг ($p < 0,05$), что привело к усилению захвата белка вакуольно-лизосомальным аппаратом клеток печени, о чем свидетельствует повышение цитохрома P-450 в лизосомах высокой плотности. Активацию лизосом также подтверждает перераспределение содержания цитохрома P-450E1 в лизосомах и снижение активности п-НФ-гидроксилазы во фракциях лизосом, сопровождающееся увеличением продуктов протеолиза цитохрома P-450E1 меньшей молекулярной массы, выявленных иммуноблоттингом, во фракции лизосом высокой плотности (табл. 1).

В следующей серии эксперимента исследовали влияние адреналина на деградацию белков эндоплазматического ретикулума на фоне введения животным изониазида. Результаты показали, что в этих условиях адреналин не оказывал влияния на содержания общего цитохрома P-450 в микросомах ($0,69 \pm 0,02$ нмоль/мг, $p > 0,05$). По данным иммуноферментного анализа адреналин вызвал незначительное понижение содержания цитохрома P-450E1 и активности п-НФ-гидроксилазы в микросомах печени (табл. 1, 2) по сравнению с группой животных, которым вводили только изониазид. На фоне индук-

Таблица 1. Влияние изониазида и адреналина на содержание и ферментативную активность цитохрома P-450E1 в лизосомах печени крыс

Группа	Фракции лизосом	Цитохром P-450E1, пкмоль/мг	п-Нитрофенол-гидроксилаза, нмоль/мин · мг
Контроль	Низкой плотности	$14,7 \pm 1,10$	$1,20 \pm 0,020$
	Высокой плотности	$10,6 \pm 1,55$	$2,95 \pm 0,400$
Изониазид	Низкой плотности	$8,9 \pm 0,60^*$	$0,85 \pm 0,030^*$
	Высокой плотности	$7,7 \pm 0,93^*$	$0,95 \pm 0,030^*$
Адреналин	Низкой плотности	$9,8 \pm 0,23^*$	$0,75 \pm 0,030^*$
	Высокой плотности	$11,2 \pm 0,44$	$0,80 \pm 0,020^*$
Изониазид Адреналин	Низкой плотности	$14,0 \pm 1,10^\#$	$1,15 \pm 0,040^\#$
	Высокой плотности	$9,9 \pm 1,25$	$4,80 \pm 0,060^{*\#}$

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы: * — с контролем при $p < 0,05$; # — с группой животных, которым вводили изониазид, при $p < 0,05$.

Таблица 2. Влияние изониазида и адреналина на содержание и ферментативную активность цитохрома P-4502E1 в микросомах печени крыс

Группа	Цитохром P-4502E1, пкмоль/мг	<i>n</i> -Нитрофенолгидроксилаза, нмоль/мин · мг
Контроль	25,2 ± 1,80	0,14 ± 0,008
Изониазид	41,3 ± 2,11*	0,61 ± 0,054*
Адреналин	22,1 ± 1,92	0,15 ± 0,010
Изониазид, адреналин	34,9 ± 2,21*#	0,54 ± 0,048*#

ции изониазидом адреналин привел к повышению количества цитохрома P-4502E1 в большей степени в лизосомах низкой плотности (в 1,6 раза), однако его активность, напротив, более значительно возросла в лизосомах высокой плотности (в 6 раз), по сравнению с животными, которым вводили только изониазид (табл. 1).

В условиях напряжения организма изменение метаболизма, контролируемое адаптивными гормонами, в том числе адреналином, характеризуется усилением липолиза и повышенной продукцией кетоновых тел, которые не только являются субстратами цитохрома P-4502E1, но и снижают белковую деградацию фермента [2]. Увеличение уровня фермента, локализованного преимущественно в печени, неизбежно приводит к усилению выработки в условиях стресса активных метаболитов кислорода в печени, избыточная продукция которых является причиной развития оксидативного стресса и клеточного повреждения. Одним из механизмов защиты клеток печени от оксидативного стресса является усиление экспрессии ферментов антиоксидантной защиты [4]. По-видимому, другим важным механизмом, снижающим выработку активных метаболитов кислорода служит усиление деградации цитохрома P-4502E1 — одного из основных продуцентов активных метаболитов кислорода в гепатоцитах. В работе [10] показано участие адреналина в регуляции протеолиза цитохрома P-4502E1. Одним из возможных механизмов влияния адреналина и других гормонов на деградацию цитохрома P-4502E1 является фосфорилирование Ser¹²⁹, которое служит сигналом к денатурации и потере гема с последующей деградацией апопротеина в аутофаго-лизосомальном пути. Сигналом к фосфорилированию и деградации служит увеличение концентрации цАМФ, являющегося посредником передачи гормонального сигнала, в том числе и адреналина [8]. В условиях стабилизации цитохрома P-4502E1 изониазидом повышается концентрация фермента и усиливается продукция активных метаболитов кислорода, что является

причиной повреждения клеток печени. В условиях стабилизации фермента субстратом адреналин сохраняет свое регулирующее действие на деградацию цитохрома P-4502E1. Таким образом, в условиях функционального напряжения организма, сопровождающихся повышенной продукцией эндогенных субстратов цитохрома P-4502E1 (кетоновых тел), как и в условиях стабилизации фермента изониазидом клеткам необходимо обеспечить антиоксидантную защиту, в том числе и за счет усиления деградации фермента.

ВЫВОДЫ

1. Белок эндоплазматического ретикулума цитохром P-4502E1 обнаруживается во фракциях лизосом клеток печени крыс.
2. Адреналин незначительно влияет на общее содержание цитохрома P-450 в микросомах, однако, оказывает выраженный эффект на их содержание в лизосомах.
3. Изониазид повышает содержание цитохрома P-4502E1 в микросомах печени и снижает его концентрацию во фракциях лизосом.
4. Адреналин на фоне индукции изониазидом повышает содержание цитохрома P-4502E1 в лизосомах печени крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Е. Панин, Т. К. Климентьева, Н. Н. Маянская, *Проблемы эндокринологии*, **28**(1), 70 – 73, (1982).
2. M. A. Abdelmegeed, N. J. Carruthers, K. J. Woodcroft, et. al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**(1), 203 – 213 (2005).
3. H. Aveliovich and D. J. Klionsky, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**(3), 463 – 479 (2001).
4. A. I. Cederbaum, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **3**, 22 – 25 (2006).
5. A. d'Azzo, A. Bongiovanni, and T. Nastasi, *Traffic*, **6**(6), 429 – 441 (2005).
6. C. de Duve, B. C. Pressman, and E. A. Gianetto, *Biochem. J.*, **60**(4), 604 – 617 (1955).
7. S. W. French, et. al., *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **25**(5), 225S – 229S (2001).
8. Z. Q. Gouillon, K. Miyamoto, T. M. Donohue, et. al., *Front Biosci.*, **4**, A16 – A25 (1999).
9. A. Yu. Grishanova and V. V. Lyakhovich, *Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics*, Moscow, 525 – 527 (1992).
10. D. Koop and D. J. Tierney, *BioAssays*, **12**, 429 – 435 (1990).
11. B. P. Murray, V. G. Zgoda, and M. A. Correia, *Mol. Pharmacol.*, **61**(5), 1146 – 1153 (2002).
12. L. A. Reinke and M. J. Moyer, *Drug Metab. Dispos.*, **13**, 548 – 552 (1985).

Поступила 29.11.07

EFFECT OF EPINEPHRINE ON THE CYTOCHROME P4502E1 CONTENT IN MICROSOMAL AND LYSOSOMAL RAT LIVER FRACTIONS ON THE BACKGROUND OF ISONIAZID INDUCTION

L. V. Vokhmintseva

Novosibirsk State Medical University, Krasnyi prospekt 52, Novosibirsk, 630091, Russia

Cytochrome P4502E1 levels in microsomal and lysosomal liver fractions was studied in Wistar rats treated with epinephrine (5.5×10^{-6} mole/g, i.p., 1 h before test) on the background of isoniazid administration (daily dose 250 mg/kg, i.p., for 3 days). Epinephrine administration resulted in increased cytochrome P4502E1 level in the vacuole/lysosome apparatus of rat liver. On the background of isoniazid administration, cytochrome P4502E1 level and *p*-nitrophenol-hydroxylase activity in both low- and high-density lysosomes were decreased. Epinephrine administration under these conditions increased the cytochrome P-4502E1 level in lysosomes due to autophagy.