ВЛИЯНИЕ НА ЕТАНОЛОВ ИЗВЛЕК ОТ ДЪРВЕСИНА НА ЧЕРНИЦА ВЪРХУ ТРАНСКРИПЦИОННИТЕ НИВА НА ГЕНИ, СВЪРЗАНИ С ОКСИДАТИВНИЯ СТАТУС

Милка Нашар, Милена Пашева, Десислава Иванова, Диана Иванова

*Катедра по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика
Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна*

EFFECT OF MULBERRY HEARTWOOD ETHANOL EXTRACT ON THE TRANSCRIPTIONAL LEVELS OF GENES RELATED TO OXIDATIVE STATUS

Milka Nashar, Milena Pasheva, Desislava Ivanova, Diana Ivanova

*Department of Biochemistry, Molecular Medicine and Nutrigenomics
Medical University “Prof. Dr. Paraskev Stoyanov” - Varna*

РЕЗЮМЕ

Оксидативният стрес в мастната тъкан е ключов фактор в патогенезата на хронични метаболитни нарушения като затлъстяване, метаболитен синдром и диабет тип 2. В настоящото изследване е приложен модел на оксидативен стрес при преадипоцитна клетъчна линия, с цел да се проучи ефектът на етанолов екстракт от дървесина на *Morus nigra* (черница) върху генната експресия на ензими, свързани с вътреклетъчната антиоксидантна защита – гама-глутамилцистеин лигаза и глутатион пероксидаза. Получените резултати дават основание да се предполага, че в условия на оксидативен стрес екстрактът проявява антиоксидантни свойства чрез модулиране експресията на двата гена и вероятно има протективно действие върху нивата на клетъчния глутатион. В заключение, екстрактът от дървесина на черница би могъл да има благоприятен ефект в превенцията и контрола на метаболитни нарушения, възникващи в резултат на оксидативен стрес.

Ключови думи: *Morus nigra*, оксидативен стрес, преадипоцити, гама-глутамилцистеин лигаза, глутатион пероксидаза

ABSTRACT

Oxidative stress in adipose tissue is a key factor in the pathogenesis of chronic metabolic disorders such as obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. In the present study a model of oxidative stress in a preadipocyte cell culture was developed in order to investigate the effect of *Morus nigra* (mulberry) heartwood ethanol extract on the gene expression of two antioxidant enzymes – gamma-glutamylcystein ligase and glutathione peroxidase. The results revealed the potential of the extract to modulate the expression of both genes and probably to maintain intracellular glutathione levels. In conclusion, the mulberry heartwood ethanol extract could have a beneficial effect in the prevention and control of oxidative stress-based metabolic disorders.

Keywords: *Morus nigra*, oxidative stress, preadipocytes, gamma-glutamylcysteine ligase, glutathione peroxidase

ВЪВЕДЕНИЕ

Оксидативният стрес е в основата на редица хронични заболявания и метаболитни нарушения като атеросклероза, затлъстяване и свързаните с него метаболитен синдром и диабет (3, 6, 7, 9). Пептидът глутатион (GSH) е най-мощният вътреклетъчен антиоксидант (8). Промени в съотношението редуциран/окислен глутатион (GSH/GSSG) са показателни за способността на клетките да реагират на оксидативни стресови промени на средата. Полифенолите в растителните екстракти могат да влияят върху клетъчния редокс баланс чрез повлияване генната експресия на ензими, свързани с обмяната на глутатиона, такива като γ -глутамилцистеин лигаза (GCL) и глутатион пероксидаза (GPx) (5).

Morus nigra L. (черница) е растение, което традиционно се прилага в народната медицина при различни неразположения и заболявания. Добре известно е, че препарати от плодовете, листата и кората на корените притежават противовъзпалителни, диуретични, хипогликемични и хипотензивни свойства (2,11,17). Освен като лечебно растение черницата намира и други традиционни приложения - сърцевината на дървесината се използва като материал за бъчви, за съхранение и отлежаване на алкохолни напитки. Въпреки че алкохолните екстракти от дървесина на черница имат специфичен фитохимичен състав (4), все още няма данни за техните биологични ефекти. Наскоро беше установено, че етанолов екстракт от дървесина на черница проявява изразена антиоксидантна активност, ясно корелираща с високо полифенолно съдържание (16).

Целта на настоящото изследване е да се установи как 40% етанолов екстракт от дървесина на черница би повлиял върху експресията на гените за GCL и GPx-4 (глутатион пероксидаза-4) в модел на клетъчен оксидативен стрес в преадипоцити.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Обработка на дървесината и приготвяне на екстракта

Дървесината беше обработена по популярната технология на „опушване“, при която треските се варят 10 минути, след което се накисват в студена вода за 24 часа и се сушат за 15 минути при температура 150-190°C. За приготвяне на извлеките е спазена пропорцията от традиционната рецепта за оцветяване на високоалкохолни напитки: 2g дървесина се поставят в 1 литър 40%

етанол. Разтворът престоява в тъмни стъклени бутилки в продължение на 40 дни.

Дизайн на експеримента

Клетъчните линии, използвани в експериментите, са закупени от ATCC (American Type Culture Collection) – САЩ.

Клетки от преадипоцитна 3T3-L1 клетъчна линия (Swiss albino *Mus musculus*) бяха култивирани в DMEM хранителна среда (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza), с добавени към нея пеницилин/стрептомицин (100 U/ml крайна концентрация) и фетален телешки серум с крайна концентрация 10%. След инкубиране на тъмно при 37°C, 5% CO₂ и достигане на 70-80% конfluентност, клетките бяха засяти в 6-ямкови фласки с първоначална гъстота 2x10⁵ кл/ямка и бяха подложени на различни третириания.

Бяха приготвени по три разреждания от екстракта от *M. nigra* (M) или 40% етанол (Et) в DMEM (без фенол ред), както следва: 6,25 μ l, 12,5 μ l или 25 μ l в 2 ml хранителна среда, съответно до крайна концентрация 0,3%, 0,6% и 1,25%. За индуциране на оксидативен стрес беше приложен третичен бутилов хидропероксид (tB), както е описано по-рано (19).

В зависимост от третирането бяха определени следните групи: група C (контрола нетретиранни клетки в хранителна среда), група tB (клетки с добавен оксидант в хранителната среда), групи M 0.3/0.6/1.25 и M 0.3+tB/0.6+tB/1.25+tB (клетки, третиран с крайна концентрация на екстракт от *M. nigra*, съответно 0.3, 0.6 и 1.25%, без или в присъствието на оксидант), група Et 0.3/0.6/1.25 и Et 0.3+tB/0.6+tB/1.25+tB (клетки, третиран с крайна концентрация етанол, съответно 0.3, 0.6 и 1.25%, без или в присъствието на оксидант). След 24 часа инкубиране със съответното третиране клетките бяха подготвени за изолиране на РНК.

Генна експресия

Изолирането на обща РНК от клетките беше извършено с помощта на TriReagent, като при изпълнение на лабораторния протокол бяха следвани указанията на производителя (Ambion). С цел отстраняване замърсяването от геномната ДНК беше извършено ДНКазно третиране с DNase I RiboPure™-Blood Kit (Sigma). След получаване на чиста РНК беше осъществена реакция на обратна транскрипция за синтез на копии ДНК (кДНК) с помощта на Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Амплификация на получената кДНК беше осъществена с количествен Real-Time PCR анализ в реално време (RT-PCR) с помощта на ген-специфични прайме-

при. Праймерите са съставени с помощта на Real-Time PCR gene expression design tool със свободен достъп в интернет и са синтезирани от Sigma-Aldrich и Integrated DNA Technologies. Нуклеотидната последователност на праймерите, използвани за анализ на нивото на генната експресия на избрани гени, са представени в Таблица 1. Като ендогенна контрола, спрямо която се нормализират стойностите на флуоресценция, беше използван β -актин. Всички измервания бяха извършени в три повторения. Нивата на генната експресия са изчислени по $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода (12) и са представени в относителни единици, в сравнение с нетретираната контрола, при която нивото на експресия на анализирания ген се приема за единица.

Таблица 1. Нуклеотидна последователност на праймерите, използвани за RT-PCR анализ

ГЕН	НУКЛЕОТИДНА СЕКВЕНЦИЯ
β -actin	F: 5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'
	R: 5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAG-3'
GCLc	F: 5'-AATGGAGGCGATGTTCTTGGAG-3'
	R: 5'-CAGAGGGTCGGATGGTTGG-3'
GPx-4	F: 5'-CCCCACTGCGCTCATGA-3'
	R: 5'-GGCACACCGGAGACCAAA-3'

Статистически анализ

Получените стойности са представени като средна стойност от минимум три измервания $\pm$ стандартна грешка на средната стойност (Mean $\pm$ SEM). Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA), последван от Dunnett's multiple comparison post test. Сравнение между всеки две независими групи е извършено със Student's t-test. За статистически достоверни се приемат стойности при $p < 0.05$. За статистическия анализ и графичното представяне на резултатите е използвана статистическата програма GraphPadPrism (v. 5.00, GraphPad Software Inc.).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

С цел да проучим потенциалния антиоксидантен ефект на етанолов извлек от дървесина на *M. nigra*, изследвахме ефекта му върху транскрипционните нива на два гена, свързани с обмяната на глутатиона в условия на индуциран оксидативен стрес. За установяване на евентуална зависимост на тези ефекти от концентрацията, приложихме три нарастващи концентрации,

подбрани въз основа на предварително проведен тест за цитотоксичност (15). Наред с това бяха приложени и същите концентрации етанол или етанол + оксидант, с цел да се разграничат ефектите на екстрахираните активни компоненти от тези на самия етанол като разтворител. Третичният бутилов хидропероксид широко се използва за индуциране на клетъчен оксидативен стрес. Неговият метаболизъм се асоциира с пероксидация на мембранните липиди и изчерпване нивата на глутатион в клетката (10,13,18).

На фигури 1 и 2 са обобщени резултатите от промяна в транскрипционните нива на гените за GCL и GPx-4 респективно, под действието на изследвания екстракт. Приложеният оксидант предизвика значително повишаване нивата на иРНК и на двата изследвани ензима в сравнение с нетретираните контроли.

Фигура 1. Експресия на гена за GCL в 3T3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес; *** $p < 0.001$ и ** $p < 0.01$ спрямо C; # $p < 0.01$ спрямо M 0.3 и M 0.6; ^{aa} $p < 0.01$ спрямо Et 1.25; ^{bb} $p < 0.001$ спрямо M 1.25

Както е показано на фиг. 1, и трите концентрации на самостоятелно приложения извлек значително стимулират експресията на GCL в сравнение с нетретираните клетки, като силата на ефекта е в правопрпорционална зависимост от концентрацията. Освен това в най-голямата си концентрация (M1.25) екстрактът има много по-изразен стимулиращ ефект върху експресията в сравнение със същата концентрация етанол ($p < 0.01$) и в сравнение със същата концентрация екстракт, приложен в условия на оксидативен стрес (M1.25+tB).

Описаните резултати са в съответствие с данните от други изследвания, в които е установе-

но, че полифенолите, съдържащи се в екстракти или самостоятелно приложени, могат да индуцират експресията на гена за GPx-4, като при тези ефекти индуциращата сила на екстрактите е значително по-изразена в сравнение с етаноловите контроли (1,14). Богатите на полифеноли растителни екстракти биха могли да намалят съотношението GSH/GSSG поради изчерпването му в хода на тяхната биотрансформация. От друга страна, в ролята си на мощни екзогенни антиоксиданти полифенолите могат да играят компенсаторна роля при състояния на оксидативен стрес. В предишно наше изследване беше показано, че екстрактът от дървесина на черница има изразена *in vitro* антиоксидантна активност, корелираща с високо полифенолно съдържание (16). Може да се предположи, че приложен в условията на оксидативен стрес, изследваният екстракт има протективен ефект върху нивата на клетъчния глутатион, с което се обясняват по-ниските нива на иРНК за ензима в групата M1.25+tB.

Фигура 2. Експресия на гена за GPx-4 в 3T3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOOH индуциран оксидативен стрес; *** $p < 0.001$ спрямо C; ### $p < 0.001$ спрямо M 0.3+tB; ^{⊕⊖} $p < 0.01$ спрямо M 0.6+tB; ^a $p < 0.01$ спрямо tB; ^b $p < 0.05$ спрямо Et 1.25+tB

Както изследваният извлек, приложен самостоятелно, така и контролата етанол не повлияха експресията на гена за GPx-4 в 3T3-L1 преадипоцити (фиг. 2). Двете по-ниски концентрации на екстракта (M 0.3 и M 0.6) не оказаха влияние върху индуцираните от оксиданта нива на иРНК на ензима (групи M0.3+tB и M0.6+tB съответно). За разлика от тях обаче най-високата концентрация оказва значителен инхибиращ ефект върху експресията на гена. Този резултат

също би могъл да е в подкрепа на допускането, че полифенолите, екстрахирани в екстракта, влияйки в ролята на антиоксиданти, предпазват клетката от изчерпване на глутатиона и съответно понижават необходимото количество ензими, свързани с неговия метаболизъм.

ИЗВОДИ

На базата на получените резултати може да се обобщи, че етаноловият извлек от дървесина на черна черница има модулиращ ефект върху генната експресия на ензими от метаболизма на глутатион. В условия на индуциран оксидативен стрес екстрактът проявява изразен антиоксидантен ефект, чрез който оказва протективно действие върху нивата на клетъчния глутатион. От гледна точка на това, че оксидативният стрес в мастна тъкан се асоциира с нискостепенно възпаление и произтичащи от него метаболитни нарушения, може да се очаква, че екстрактът от дървесина на черница е потенциален източник на активни компоненти в превенцията на свързаните хронични заболявания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселова-Кънева, Й. Проучване на антиоксидантната активност на български лечебни растения. Автореф Дисерт ОНС Доктор, Варна, МУ-Варна, 2011.
2. Chan KC, Yang MY, Lin MC, Lee YJ, Chang WC, Wang CJ. Mulberry leaf extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and in cultured aortic vascular smooth muscle cells. *J Agric Food Chem.* 2013; 61(11):2780–2788
3. Csiszar A, Podlutzky A, Wolin MS, Losonczy G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:3128–44.
4. De Rosso MD, Cancian D, Panighe A, Vedova AD, Flamini R. Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: volatile compounds and polyphenols. *Wood Sci Tech.* 2009;43: 375–385
5. Dunninga S, Rehmana A, Tieboscha MH, Hannivoorta RA, Haijera FW, Woudenberg J, van den Heuvel FAJ et al. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary

- roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Molec Basis Dis* 2013;1832(12): 2027–2034
6. Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J*. 2006;70(11):1437-42.
7. Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *J Nutr Biochem*. 2008;19(8):491-504.
8. Jurkovič S, Osredkar J, Marc J. Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. *Biochemia Medica* 2008;18(2):162-74
9. Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(3):434-9.
10. Kučera O., Endlicher R., Roušar T., Lotková H., Garnol T., Drahotka Z., and Červinková Z.,. The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; Article ID 752506, 12 pages
11. Kumar A, Chauhan PK, Bhardwaj VS, Kumar R, Tyagi A. In vitro antioxidant and phytochemical investigations of ethanolic extracts of *Viola serpens* and *Morus nigra*. *J Chem Pharm Res*. 2011;3(4):166-171.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402-408
13. Martín C, Martínez R, Navarro R, Ruiz-Sanz JJ, Lacort M, Ruiz-Larrea MB.. tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(6):705-12
14. Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(5):386-93.
15. Pasheva M, Pavlov D, Tasinov O, Nashar M, Kiselova-Kaneva Y, Ivanova D. Cytoprotective and cytoproliferative effects of ethanol infusions from *Morus nigra* and *Cotinus coggygria* heartwood in 3T3-L1 preadipocytes. *Scripta Scientifica Medica*, 2013; 45, suppl. 6: 25-28
16. Pasheva M, Nashar M, Pavlov D, Slavova S, Ivanov D, Ivanova D. Antioxidant capacity of different woods traditionally used for coloring hard alco-holic beverages in Bulgaria.-*J. Sci. Technol*. 2013;3 (1): 123-127
17. Pawlowska AM, Oleszek W, Braca A. Qualitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *J Agric Food Chem*. 2008;56: 3377–3380
18. Roy A, Sil PC. Tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative damage in mice erythrocytes: Protection by taurine. *Pathophysiology* 2012;19 (2): 137–148
19. Tasinov O, Kiselova-Kaneva Y, Ivanova D. *Sambucus ebulus* L. fruit aqueous infusion modulates GCL and GPx4 gene expression. *Bulg J Agricult Sci* 2013;19 (2): 143-146

Адрес за кореспонденция:

Милка Аспарухова Нашар
Катедра по биохимия, молекулярна медицина и
нутригеномика
Медицински университет – Варна
ул. Марин Дринов №55
9002, Варна, България
e-mail: milka.nashar@mu-varna.bg