

О. В. Максимчук

## Вплив $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот на експресію ферментів про- та антиоксидантної системи в печінці щурів

*Омега-3 поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) через модуляцію активності транскрипційних факторів включаються у регуляцію багатьох фізіологічних процесів у клітині. Проте малодослідженими залишаються властивості цих сполук щодо впливу на про- та антиоксидантні процеси в клітинах печінки. Метою роботи є дослідження змін експресії цитохрому P450 2E1 (CYP2E1), який проявляє потужну прооксидантну активність, та гемоксигенази-1 (HO-1; від англ. heme-oxygenase), що характеризується антиапоптотичними та протизапальними властивостями, а також оцінка активності ферментів-антиоксидантів у печінці експериментальних тварин при дії  $\omega$ -3 ПНЖК. У результаті проведеного експерименту в печінці щурів, яким щоденно протягом 4 тиж до стандартного раціону додавали  $\omega$ -3 ПНЖК, було виявлено значне підвищення вмісту цитохрому P450 2E1 та HO-1. Разом з тим не було виявлено достовірних змін відносно контролю активності ферментів-антиоксидантів – супероксиддисмутази і каталази. Імовірно, збільшення вмісту цитохрому P450 2E1 через залежну від активних форм кисню активацію сигнальних шляхів призводить до індукції експресії таких ферментів із цитопротекторними властивостями, як HO-1. Така CYP2E1-залежна активація експресії HO-1 може бути одним з механізмів прояву антиоксидантних, антиапоптотичних і протизапальних властивостей  $\omega$ -3 ПНЖК.*

*Ключові слова: цитохром P450 2E1,  $\omega$ -3 поліненасичені жирні кислоти, гемоксигеназа-1, каталаза, супероксиддисмутаза.*

### ВСТУП

Підтримання про- та антиоксидантного балансу або фізіологічної рівноваги процесів окиснення/відновлення і утворення/нівелювання активних форм кисню (АФК) та їхніх метаболітів за постійної наявності молекулярного кисню в клітині є надзвичайно важливим критерієм її гомеостазу [1]. У гепатоцитах реакції окиснення та генерування АФК відбуваються з високою інтенсивністю, і тому постійно існує загроза зрушення балансу у оксидативний бік, а також розвитку оксидативного стресу. Але на противагу цьому функціонує потужна антиоксидантна система, ресурси якої (за рівнем експресії ферментів-антиоксидантів) у гепатоцитах чи не найвищі порівняно із іншими клітинами.

Така особливість регуляції про-та антиоксидантного балансу в печінці головним чином визначається її детоксикаційною функцією. Відомо, що першим етапом детоксикації є окиснення субстратів, що супроводжується вивільненням АФК та утворенням радикальних сполук. Останні на другому етапі детоксикації знешкоджуються, що відбувається за безпосередньої участі ферментів системи антиоксидантного захисту [2–4]. До ферментів детоксикаційної системи, що проявляють прооксидантні властивості, належить цитохром P450-монооксигеназа (КФ 1.14.14.1), зокрема, одна з його ізоформ P450 2E1 (CYP2E1). Монооксигеназна активність ферменту щодо окиснення ксенобіотиків супроводжується вивільненням високореактивних радикальних сполук та утворенням

© О. В. Максимчук

АФК [3, 4]. Крім того, цитохром P450 2E1 виявляє високу оксидазну активність – за відсутності субстратів здійснює неповне відновлення молекули кисню до його активних форм [4]. Утворені при функціонуванні ферменту АФК, зокрема пероксид водню, – це біологічноактивні молекули, які є вторинними месенджерами у внутрішньоклітинних сигнальних шляхах, які контролюють різноманітні фізіологічні процеси [5, 6]. Таким чином, цитохром P450 2E1 долучається до створення фізіологічного вмісту АФК у клітині, що потрібно для регуляції багатьох внутрішньоклітинних механізмів, зокрема підтримки про- та антиоксидантного балансу, апоптозу, запалення тощо. Разом з тим підвищення рівня експресії цитохрому P450 2E1 спричиняє надлишкове утворення АФК та їхніх метаболітів, що може призвести до виснаження системи антиоксидантного захисту, посилення пероксидних процесів і розвитку оксидативного стресу в клітині [4, 7].

Серед ферментів системи антиоксидантного захисту клітин печінки найбільш досліджуваними є супероксиддисмутаза – СОД (КФ 1.15.1.1), яка каталізує перетворення супероксид-аніон-радикала до пероксиду водню, та каталаза (КФ 1.11.1.6), що розкладає останній на воду та молекулярний кисень [2]. Проте за останні роки все більше вивчають антиоксидантні властивості й іншого ферменту – гемоксигенази-1 (КФ 1.14.99.3). Відомо, що гемоксигеназа-1 (НО-1; від англ. hemoxygenase) належить до родини білків теплового шоку. Цей фермент розщеплює молекулу гему до монооксиду вуглецю, білівердину та двовалентного заліза [8]. НО-1 визначає вміст у клітинах гемовмісних білків, до яких, зокрема, належать цитохром P450 і його ізоформи. Виявлено, що в клітинах печінки транскрипція гена НО-1, як і інших стресових білків, індукується у відповідь на хімічні і фізичні чинники, а також при підвищенні концентрацій цитокінів та при оксидативному стресі [9], тобто за умов, при яких ресструється надлишковий вміст АФК

та їхніх метаболітів. При цьому підвищення експресії НО-1 навіть розглядають як адаптивну відповідь клітини на порушення її гомеостазу, спричинене будь-якими стресовими факторами. І за таких умов цитопротекторний вплив цього ферменту складається у супресії АФК-індукованих механізмів апоптозу та запалення [8, 9].

Отже про- та антиоксидантний баланс у клітинах печінки підтримується завдяки функціонуванню певних ферментів детоксикаційної системи, що мають про- та антиоксидантні властивості. Їхня експресія регулюється багатьма зовнішніми та внутрішніми чинниками, які діють на всіх етапах біосинтезу – від ініціації транскрипції генів до пострансляційних модифікацій білків. Серед таких чинників розглядають дію органічних сполук, зокрема поліненасичених жирних кислот, які можуть проявляти властивості біологічно активних речовин і значно впливати на метаболічні процеси [10].

За останні роки зріс науково-практичний інтерес щодо досліджень властивостей  $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), а також можливості використання цих речовин як біодобавок та лікарських засобів для профілактики та лікування цілої низки захворювань. Найбільш досліджуваними представниками цієї групи речовин є  $\alpha$ -ліноленова, ейкозапентаєнова і докозагексаєнова кислоти.  $\omega$ -3 ПНЖК – незамінні органічні речовини. Вони не синтезуються *de novo* у власних клітинах ссавців, тому повинні постійно надходити в організм ззовні [11]. Після потрапляння до клітин печінки  $\omega$ -3 ПНЖК вбудовуються у фосфоліпідний шар біомембран, що значно поліпшує трансмембранний транспорт і функціонування комплексів мембранно-асоційованих ферментів [10, 11]. Вільні  $\omega$ -3 ПНЖК через активування або пригнічення експресії певних транскрипційних факторів залучаються у регуляцію багатьох метаболічних процесів у печінці [10]. При цьому малодослідженими залишаються властивості  $\omega$ -3 ПНЖК щодо впливу на про- та

антиоксидантні процеси в клітинах цього органа.

Мета нашої роботи – дослідження змін експресії цитохрому P450 2E1 та HO-1, а також оцінка активності ферментів-антиоксидантів СОД та каталази у печінці експериментальних тварин при довготривалому введенні  $\omega$ -3 ПНЖК.

## МЕТОДИКА

В експерименті було використано 12 самців шурів лінії Вістар віком 3 міс із масою тіла 200–250 г розведення віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ). Щурів утримували у стандартних умовах: інвертований добовий світловий режим при 18–20 °С. Тварин було розподілено порівну на контрольну та дослідну групи. Дослідним тваринам щоденно протягом 4 тиж до стандартного раціону додавали  $\omega$ -3 ПНЖК (препарат епадол, що містить 45 % суміші  $\omega$ -3 ПНЖК тваринного походження, виробництва Київського вітамінного заводу). Добова доза препарату становила 0,1 мг / 100 г [12]. Дослідження проводили згідно з вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986).

Вміст білків CYP2E1 та HO-1 у печінці визначали методом імуноблотингу, використовуючи специфічні поліклональні антитіла: anti-CYP2E1 (отримані у відділі молекулярної онкогенетики ІМБГ НАН України), anti-HO-1 та anti- $\beta$ -actin (“Sigma”, США). Тотальний лізат клітин печінки та білковий екстракт отримували за методикою, описаною в роботі [13].

Тотальний білок кожного зразка (по 50 мкг) розділяли за допомогою електрофорезу у 12%-му поліакриламідному гелі за наявності 0,1% додецилсульфату натрію за методом Лемлі [14]. Імуноблотинг із застосуванням anti-CYP2E1 здійснювали як описано в роботі [13], а з використанням anti-HO-1 та anti- $\beta$ -actin проводили згідно з рекомендаціями фірми виробника (“Sigma”, США). Результати

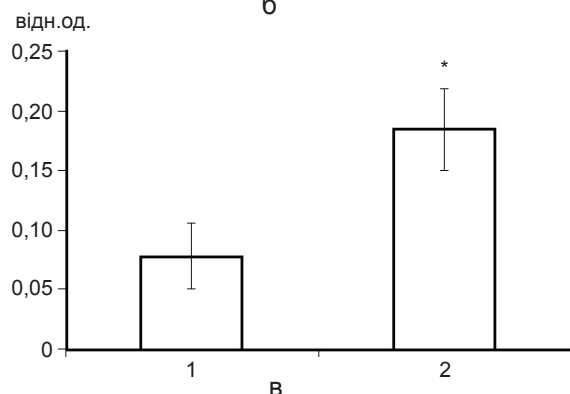
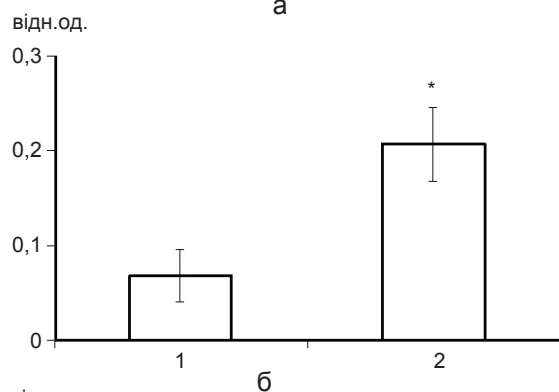
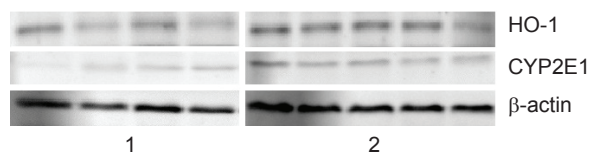
візуалізували та обраховували за допомогою спеціального обладнання ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software (“Bio-Rad”, США). Вміст білків CYP2E1 та HO-1 у печінці тварин було представлено у відносних одиницях, що вираховували як відношення кількості досліджуваних білків до білка  $\beta$ -актин в одному і тому зразку. Білок  $\beta$ -актин було використано як внутрішній контроль завантаження тотального білка до гелю.

Активність ферментів каталази та СОД вимірювали згідно методів [15, 16]. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи пакет програм Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США). Достовірність визначали за критерієм t Стьюдента. Відмінності вважали достовірними при  $P \leq 0,05$ . Результати представлено у вигляді середніх значень для  $n = 4-6$  із зазначенням середніх квадратичних відхилень.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що у печінці дослідних шурів, яким упродовж 4 тиж до стандартного раціону додавали  $\omega$ -3 ПНЖК, було виявлено підвищення вмісту прооксидантного ферменту цитохрому P450 2E1 більш ніж у 2,5 раза порівняно із контролем (рисунок, а, в). Це могло бути спричинено змінами експресії ферменту на всіх етапах регуляції його біосинтезу. Імовірно,  $\omega$ -3 ПНЖК можуть впливати на транскрипцію гена цитохрому через активацію певних транскрипційних факторів, що індукують експресію ферментів мікосомного окиснення жирних кислот [10], до яких, як відомо, і належить CYP2E1. Отже, така індукція транскрипції гена цитохрому може призводити до збільшення його вмісту в клітині. Крім того, можливо,  $\omega$ -3 ПНЖК, як і інші субстрати, стабілізують молекулу CYP2E1, що спричинює накопичення ферменту в клітині [17]. Про це можуть свідчити дані відносно того, що  $\omega$ -3 ПНЖК виявляються ефективними альтернативними субстратами у шляхах CYP-залежного метаболізму

арахідонової кислоти у гепатоцитах [11]. Водночас у печінці дослідних тварин було виявлено триразове збільшення вмісту HO-1 (див. рисунок, а, б). Це, можливо, пов'язано зі спричиненою  $\omega$ -3 ПНЖК активацією транскрипційного фактора Nrf2 (від англ. nuclear



Експресія цитохрому P450 2E1 (CYP2E1) і гемоксигенази-1 (HO-1) у печінці експериментальних щурів: а – імуноблотинг з використанням специфічних антитіл: anti-HO-1, anti-CYP2E1 та anti- $\beta$ -actin, б – середній вміст HO-1, в – середній вміст цитохрому P450 2E1. 1 – контроль, 2 –  $\omega$ -3 ПНЖК. \* $P \leq 0,05$

factor erythroid 2-related factor 2), який, як відомо, позитивно регулює транскрипцію багатьох генів ферментів антиоксидантної системи, до яких належить HO-1 [18, 19]. Але не було виявлено достовірних змін відносно контролю активності інших ферментів-антиоксидантів – СОД і каталази (таблиця). Подібні результати були отримані й іншими авторами при дослідженні впливу  $\omega$ -3 ПНЖК на рівень експресії маркерів оксидативного стресу у адипоцитах [18]. Ймовірно, підвищення експресії саме HO-1 попереджує значне порушення про- та антиоксидантного балансу та пов'язані з цим зміни активності СОД і каталази.

Відомо, що збільшення вмісту цитохрому P450 2E1 супроводжується посиленням генерування активних форм кисню, надлишкове накопичення яких у клітині може призвести до виснаження системи антиоксидантного захисту та інтенсифікації процесів пероксидного окиснення [4, 5, 7]. Водночас на культурі НерG2 E47, яка характеризується підвищеним рівнем експресії цього ферменту було показано, що CYP2E1-залежне збільшення вмісту АФК в клітинах спричиняє активацію внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, зокрема деяких протеїнкіназних каскадів MAPK (від англ. mitogen-activated protein kinase) [5]. Це у свою чергу призводить до модуляції активності цілої низки редоксчутливих транскрипційних факторів, зокрема до підвищення експресії Nrf2 [5, 6]. В наслідок цього в клітині збільшується вміст антиоксидантних факторів, зокрема стресових білків [5, 7]. Такий ефект і було показано в умовах нашого експерименту – в печінці дослідних щурів виявлено значне збільшення вмісту HO-1.

#### Активність ферментів антиоксидантної системи у гомогенатах печінки експериментальних тварин ( $M \pm m$ )

Схема досліджу	Каталаза, мкмоль/хв · мг білка	Супероксидисмутаза, ум.од./мг білка
Контроль	439,8 $\pm$ 53,4	3,50 $\pm$ 0,61
Тварини, яким додавали $\omega$ -3 поліненасичені жирні кислоти	480,1 $\pm$ 42,4	2,67 $\pm$ 0,85



Отже, в печінці щурів, яким щоденно протягом 4 тиж до стандартного раціону додавали  $\omega$ -3 ПНЖК, було виявлено значне підвищення вмісту цитохрому P450 2E1 та HO-1. Разом з тим не було показано достовірних змін відносно контролю рівня активності ферментів антиоксидантної системи – СОД і каталази.

Використовуючи отримані результати та дані літератури можна зробити таке припущення. Довготривале введення  $\omega$ -3 ПНЖК збільшує вміст цитохрому P450 2E1 у печінці експериментальних тварин, що посилює генерування активних радикальних сполук (АФК та їхніх метаболітів) в клітинах. Кисневі радикали у свою чергу через активацію МАРК-сигнальних шляхів підвищують активність транскрипційного фактора Nrf2, що призводить до індукції експресії ферментів із цитопротекторними властивостями, зокрема HO-1. Отже, така СYP2E1-залежна індукція експресії HO-1 може бути одним з механізмів прояву антиоксидантних, антиапоптотичних і протизапальних властивостей  $\omega$ -3 ПНЖК.

*Автор статті висловлює подяку провідному науковому співробітнику відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України А.М. Шиш за допомогу у проведенні біохімічних досліджень та у роботі з тваринами.*

**О. В. Максимчук**

### **ВЛИЯНИЕ $\omega$ -3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ЭКСПРЕССИЮ ФЕРМЕНТОВ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС**

Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) путем модуляции активности транскрипционных факторов включаются в регуляцию многих физиологических процессов в клетке. Однако малоисследуемыми остаются свойства этих соединений влиять на про- и антиоксидантные процессы в клетках печени. Целью работы является исследование изменений экспрессии цитохрома P450 2E1 (CYP2E1), который проявляет мощную прооксидантную активность, и гемоксигеназы 1 (HO-1; от англ. hemoxygenase), для которой характерны антиапопто-

тические и противовоспалительные свойства, а также оценка активности ферментов-антиоксидантов в печени экспериментальных животных при действии  $\omega$ -3 ПНЖК. В результате проведенного эксперимента в печени крыс, которым ежедневно на протяжении 4 нед к стандартному рациону вивария добавляли  $\omega$ -3 ПНЖК, было выявлено значительное повышение содержания цитохрома P450 2E1 и HO-1. Одновременно с этим, не было выявлено достоверных изменений относительно контроля активности ферментов-антиоксидантов – супероксиддисмутазы и каталазы. Вероятно, увеличение содержания цитохрома P450 2E1 путем зависимой от активных форм кислорода активации определенных сигнальных путей приводит к индукции экспрессии таких ферментов с цитопротекторными свойствами, как HO-1. Эта CYP2E1-зависимая активация экспрессии HO-1, возможно, является одним из механизмов проявления антиоксидантных, антиапоптотических и противовоспалительных свойств  $\omega$ -3 ПНЖК.

Ключевые слова: цитохром P450 2E1,  $\omega$ -3 полиненасыщенные жирные кислоты, гемоксигеназа 1, каталаза, супероксиддисмутаза.

**O. V. Maksymchuk**

### **THE INFLUENCE OF OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ON THE EXPRESSION OF ENZYMES OF THE PRO-OXIDANT AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN THE RAT LIVER**

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are involved in the regulation of many physiological processes by modulating the activity of transcription factors. However, the properties of the compounds to influence the pro - antioxidant processes in liver are poorly investigated. We aimed to study the changes in expression of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) with a strong prooxidant activity, and heme oxygenase 1 (HO-1), which is characterized by anti-apoptotic and anti-inflammatory properties, and evaluation of the activity of antioxidant enzymes in the liver of experimental animals under the action of omega-3 PUFAs. It was shown a significant increase in cytochrome P450 2E1 and heme oxygenase 1 expression in the liver of rats treated with the omega-3 PUFAs (per os, daily for 4 weeks). At the same time, there were no changes in the activity of antioxidant enzymes - superoxide dismutase and catalase. Probably an increase of the level of cytochrome P450 2E1 leads to induction of expression of enzymes with cytoprotective properties, such as heme oxygenase-1, by ROS-dependent activation of certain signaling pathways. Such CYP2E1-dependent activation of expression of HO-1 is one of the possible mechanisms of manifestation of antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory properties of omega-3 PUFAs. Key words: Cytochrome P450 2E1, omega-3 polyunsaturated fatty acids, heme oxygenase-1, catalase, superoxide dismutase.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv*

## REFERENCES

1. Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*. 1999 Sep 15;342 (Pt 3):481-96.
2. Kuznetsova EE, Gorokhova VG, Gorokhov AG, Sergeyeva AS, Kuril'skaya TE, Pivovarov YuI, Runovich AA. Microsomal oxidation in physiological and pathologic processes. *Bulletin ESSC SB RAMS*. 2007; 56(4):170-180. Russian
3. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2001 May;58(5-6):737-47.
4. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res*. 2005 Jan 6;569(1-2):101-10.
5. Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. Increased expression of cytochrome P450 2E1 induces heme oxygenase-1 through ERK MAPK pathway. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):29693-700.
6. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 1999 Jan;11(1):1-14.
7. Cederbaum A.I. Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Oct;21 Suppl 3:S22-5.
8. Origassa C, Câmara N. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury. *World J Hepatol*. 2013 Oct 27;5(10):541-549.
9. Abdalla MY, Mathahs MM, Ahmad IM. Protective role of heme oxygenase-1 in liver. *Biologia*. 2012 Aug;67(4):623-28.
10. Jump D.B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Jun;19(3):242-7.
11. Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck WH. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep*. 2010 May-Jun;62(3):536-47.
12. Shysh AM, Kukoba TV, Tumanov's'ka LV, Moïbenko OO. Phospholipid membrane modification as a protection factor of the myocardium during stress injury. *Fiziol Zh*. 2005;51(2):17-23. Ukrainian
13. Maksymchuk OV, Chashchyn MO. Stress-induced changes in the content of cytochrome P450 2E1 in the liver of mice with chronic psychoemotional overexertion. *Fiziol Zh*. 2013;59(4):67-73. Ukrainian
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
15. Koroliuk M, Ivanova L, Maiorova I, Tokarev V. A method of determining catalase activity. *Lab Delo*. 1988;(1):16-9. Russian
16. Stephanov OV, editor. *Preclinical studies of drugs*. Kyiv: Avicena: 2001.
17. Kitam VO, Maksymchuk OV, Chashchyn MO. The possible mechanisms of CYP2E1 interactions with HSP90 and the influence of ethanol on them. *BMC Struct Biol*. 2012 Dec 17;12:33. doi: 10.1186/1472-6807-12-33. Cited in PubMed; PMID:23241420
18. Kusunoki C, Yang L, Yoshizaki T, Nakagawa F, Ishikado A, Kondo M, Morino K, Sekine O, Ugi S, Nishio Y, Kashiwagi A, Maegawa H. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jan 4;430(1):225-30.
19. Yang YC, Lii CK, Wei YL, Li CC, Lu CY, Liu KL, Chen HW. Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF- $\kappa$ B pathways. *J Nutr Biochem*. 2013 Jan;24(1):204-12.

*Ин-т молекул. біології і генетики НАН України, Київ*  
*E-mail: o.maksymchuk@ukr.net*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 23.12.2013*