

## ВПЛИВ $\omega$ -3 ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ НА ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС ТА ЕКСПРЕСІЮ ЦИТОХРОМУ P450 2E1 В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ

О. В. МАКСИМЧУК

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;  
e-mail: prima@imbg.org.ua; o.maksymchuk@ukr.net*

Поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), зокрема  $\omega$ -3, входять до складу фосфоліпідного шару біомембран, що є важливим для здійснення трансмембранного транспорту та функціонування комплексів мембраноасоційованих ензимів. Вільні  $\omega$ -3 ПНЖК впливають на рівень експресії багатьох генів, і, таким чином, регулюють метаболічні процеси, зокрема ліпідний та вуглеводний обмін у клітинах печінки. Цитохром P450 2E1 (1.14.14.1) здійснює біотрансформацію ліпофільних речовин екзогенного та ендогенного походження, а також залучається в гомеостатичні процеси як на клітинному, так і на системному рівнях. У роботі досліджували зміни експресії цитохрому P450 2E1, а також стану антиоксидантної системи та рівня пероксидних процесів у печінці експериментальних тварин за довготривалого введення  $\omega$ -3 ПНЖК. Виявлено більш ніж дворазове підвищення вмісту цитохрому P450 2E1 в печінці щурів, яким щоденно протягом 4 тижнів до стандартного раціону додавали  $\omega$ -3 ПНЖК. Разом із цим, такі зміни експресії ензиму не призводили до порушення балансу про-/антиоксидантних процесів у клітинах досліджуваного органу.

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

Відомо, що печінка виконує провідну роль у біотрансформації і детоксикації більшості речовин ендогенного та екзогенного походження. В той самий час у клітинах цього органу відбуваються процеси системного метаболізму жирів та вуглеводів. Від структурно-функціонального стану гепатоцитів залежить існування всього організму, який знаходиться в умовах постійної дії різноманітних факторів зовнішнього та внутрішнього середовища, що змінюються протягом життя. Зокрема, печінка забезпечує швидку адаптацію організму до змін раціону, а саме вмісту в продуктах харчування певних органічних речовин [1]. До таких, у тому числі, належать поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), які виконують важливу структурно-функціональну роль у клітинах організму ссавців. Основними представниками цієї групи речовин є  $\omega$ -6 (лінолева і арахідонова кислоти) та  $\omega$ -3 ПНЖК ( $\alpha$ -ліноленова, ейкозапентаєнова і докозагексаєнова кислоти).  $\omega$ -3 ПНЖК є незамінними органічними кислотами – вони не синтезуються *de novo* у власних клітинах

ссавців – тому мають постійно надходити в організм іззовні [1]. Після потрапляння до клітин ці речовини вбудовуються у фосфоліпідний шар біомембран, при цьому частково заміщуючи собою  $\omega$ -6 поліненасичені жирні кислоти. Це має значний біологічний ефект [2, 3], який полягає в покращенні функціональних властивостей певних спеціалізованих клітин, зокрема нормалізації передачі імпульсів між кардіоміоцитами. У гепатоцитах  $\omega$ -3 ПНЖК також входять до складу фосфоліпідного шару біомембран, що забезпечує здійснення трансмембранного транспорту та функціонування комплексів мембраноасоційованих ензимів [2]. Вільні  $\omega$ -3 ПНЖК залучаються в регуляцію багатьох метаболічних процесів: через активізування або пригнічення експресії певних транскрипційних факторів впливають на метаболізм ліпідів та вуглеводів, а також регулюють запальні процеси в тканинах печінки [4].

Метаболізм вільних  $\omega$ -3 ПНЖК у клітинах печінки відбувається за участю різних ензимних систем, зокрема системи цитохрому P450

[2]. Одна з ізоформ цитохрому P450 (1.14.14.1) – P450 2E1 (CYP2E1) – здійснює біотрансформацію ліпофільних речовин екзогенного та ендogenousного походження та залучається в процеси підтримання про-/антиоксидантного балансу в клітинах [5]. У гепатоцитах CYP2E1 бере активну участь у процесах детоксикації ксенобіотиків, а також метаболізує певні органічні речовини, в тому числі ПНЖК [2, 6]. Показано, що цитохром P450 2E1 каталізує окислення ПНЖК, внаслідок чого утворюються біологічно активні метаболіти, які регулюють функціонування окремих систем організму (серцево-судинної та системи зсідання крові) [2]. Відомо також, що CYP2E1 може виявляти оксидазну та пероксидазну активність, що супроводжується генеруванням активних форм кисню (АФК) та утворенням пероксидних радикальних сполук у клітинах [7]. Отже, підвищення експресії цього ензиму призводить до надлишкового утворення вільних радикалів, що може спричинювати виснаження системи антиоксидантного захисту та посилення пероксидних процесів. При цьому відбувається порушення про-/антиоксидантного балансу в клітинах та розвивається оксидативний стрес, який супроводжується різноманітними структурно-функціональними ушкодженнями печінки [8].

На сьогодні препарати, що містять  $\omega$ -3 ПНЖК, широко застосовуються в медичній практиці для лікування та профілактики різних захворювань, головним чином патологій серцево-судинної системи. Проте вплив таких речовин на функціональний стан клітин печінки, зокрема на рівень експресії цитохрому P450 2E1, як однієї з ключових ланок детоксикаційної системи та системи підтримання про-/антиоксидантного балансу гепатоцитів, залишається маловивченим.

Мета роботи – дослідження змін експресії цитохрому P450 2E1, оцінка стану антиоксидантної системи та рівня пероксидних процесів у печінці експериментальних тварин під час довготривалого введення  $\omega$ -3 ПНЖК.

### Матеріали і методи

В експерименті було використано 12 щурів-самців лінії Wistar розведення віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (м. Київ) віком 3 місяці із масою тіла 150–200 г. Тварин утримували в стандартних

умовах: інвертований добовий світловий режим та температура повітря 18–20 °С. Щурів було розподілено порівну на дві групи: дослідну та контрольну. Дослідним тваринам, на відміну від контрольних, щоденно протягом 4 тижнів 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 складала 0,1 мг на 100 г маси тіла тварини [3]. Експерименти проводили згідно з вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986) та правил роботи з лабораторними тваринами [9].

Рівень протеїну CYP2E1 у печінці визначали методом Вестерн-блот аналізу, використовуючи специфічні поліклональні антитіла: anti-CYP2E1 (одержані у відділі молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України раніше) та anti- $\beta$ -actin (Sigma, США). Тотальний лізат клітин печінки та екстракт сумарного протеїну одержували за методикою, описаною в роботі [10]. Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі [11].

Сумарний протеїн кожного зразка (по 50 мкг) розділяли за допомогою електрофорезу в 12%-му поліакриламідному гелі в присутності 0,1%-го DSNa за методом Леммлі [12]. Перенесення протеїну на нітроцелюлозні мембрани здійснювали за допомогою напівсухого електротрансферу при 200 мА впродовж 40 хв. Вестерн-блот аналіз проводили, обробляючи мембрани 4%-им розчином знежиреного молока (Sigma, США) у PBST-буфері, після чого впродовж 1 год інкубували в розчині поліклональних anti-CYP2E1. Після відмивання PBST-буфером мембрани інкубували із вторинними anti-Rabbit антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (Sigma, США). Результати Вестерн-блотингу візуалізували та обраховували за допомогою спеціального обладнання ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software (Bio-Rad, США). Вестерн-блот аналіз із використанням anti- $\beta$ -actin проводили згідно з рекомендаціями фірми виробника (Sigma, США). Вміст протеїну CYP2E1 у печінці тварин представляли у відносних одиницях, вираховуючи його як відношення кількості протеїну CYP2E1 до референс-протеїну  $\beta$ -actin в одному і тому самому зразку.

Рівень процесів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) визначали за вмістом у гомогена-

тах печінки малонового діальдегіду (МДА) [13]. Стан антиоксидантної системи оцінювали за рівнем активності ензимів: каталази (1.11.1.6) та супероксиддисмутази (1.15.1.1) [13, 14].

Для статистичної обробки результатів дослідження застосовували пакет програм STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США). Для оцінки відмінності між показниками, одержаними в досліджуваних групах, використовували *t*-критерій Стьюдента. Значення  $P \leq 0,05$  розглядали як критерій вірогідної різниці. Результати представлено у вигляді середніх значень для  $n = 4-6$  із зазначенням середніх квадратичних відхилень.

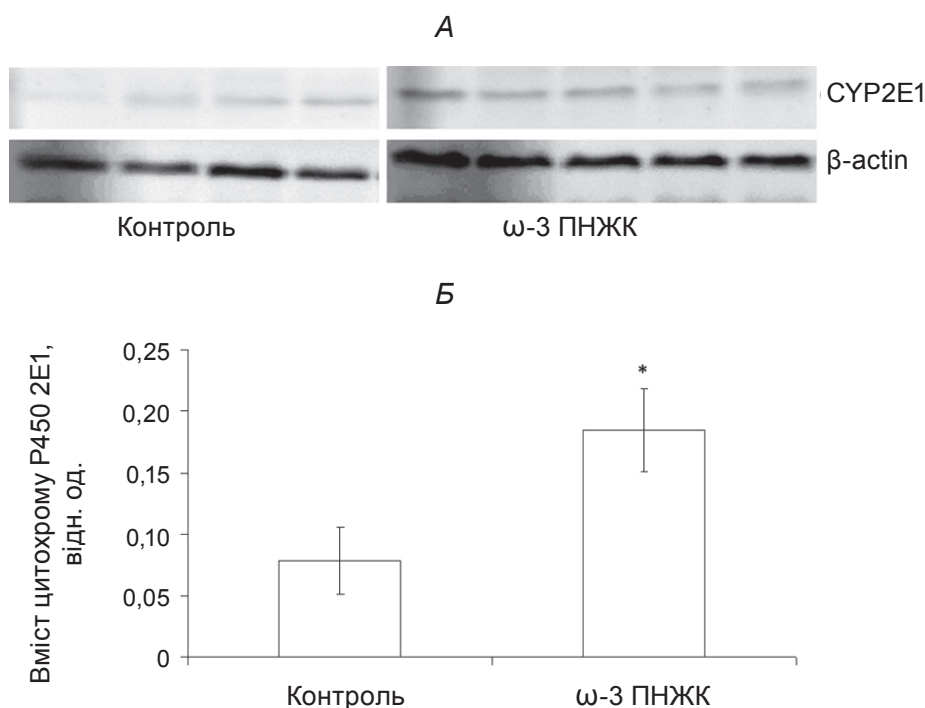
### Результати та обговорення

Внаслідок проведених експериментів у печінці дослідних щурів, яким впродовж 4 тижнів до стандартного раціону додавали  $\omega$ -3 ПНЖК, було виявлено підвищення вмісту цитохрому P450 2E1 більш ніж у 2,5 раза порівняно із контролем (рис.). Це може бути спричинено змінами експресії гена ензиму на всіх етапах регуляції його біосинтезу. Відомо, що в клітинах печінки  $\omega$ -3 ПНЖК виконують провідну роль у регуляції процесів ліпідного та вуглеводно-

го обміну. Така регуляція здійснюється через модулюючий вплив ПНЖК на експресію певних транскрипційних факторів, зокрема PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor). Показано, що  $\omega$ -3 ПНЖК активують PPAR $\alpha$ . Це призводить до індукції експресії генів, які кодують ензими мітросомного окислення жирних кислот [1, 4, 15]. Саме до таких ензимів і належить мітросомний цитохром P450 2E1 [2]. Тобто  $\omega$ -3 ПНЖК можуть індукувати транскрипцію гену CYP2E1, що призводить до збільшення кількості протеїну в клітині.

Разом з цим,  $\omega$ -3 ПНЖК можуть впливати на вміст CYP2E1 і на посттрансляційному рівні регуляції його експресії, взаємодіючи із активним центром ензиму, та, як й інші субстрати, стабілізуючи його молекулу [16]. На це вказують дані відносно того, що  $\omega$ -3 ПНЖК виявляються ефективними альтернативними субстратами в шляхах CYP-залежного метаболізму арахідонової кислоти в клітинах печінки [2]. При цьому стабілізація  $\omega$ -3 ПНЖК молекули цитохрому, ймовірно, призводить до накопичення CYP2E1 у клітинах печінки.

Відомо, що збільшення вмісту цитохрому P450 2E1 зумовлює посилення генерування



Експресія цитохрому P450 2E1 у печінці контрольних та експериментальних щурів. А – вестерн-блот аналіз із використанням специфічних антитіл: anti-CYP2E1 та anti- $\beta$ -actin (як референс-контроль). Б – середній вміст цитохрому P450 2E1. \* $P \leq 0,05$

Вміст малонового діальдегіду та рівень активності ензимів антиоксидантної системи в гомогенатах печінки контрольних та експериментальних тварин ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Групи тварин	Вміст малонового діальдегіду, мкМ/мг протеїну	Активність ензимів:	
		Каталаза, мкМ/хв·мг протеїну	Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну
Контроль	0,702 ± 0,071	439,8 ± 53,4	3,50 ± 0,61
ω-3 ПНЖК	0,738 ± 0,070	480,1 ± 42,4	2,67 ± 0,85

активних кисневих радикалів, надлишкове накопичення яких у клітині може призвести до виснаження системи антиоксидантного захисту та інтенсифікації процесів пероксидного окислення. Завдяки цьому відбувається порушення про-/антиоксидантного балансу та розвивається оксидативний стрес [7, 8]. Із метою виявлення ознак такого стану в печінці експериментальних тварин було проведено дослідження рівня активності каталази і супероксиддисмутази як ключових ензимів системи антиоксидантного захисту та вмісту МДА як маркера пероксидних процесів.

Внаслідок проведеного дослідження в печінці дослідних щурів, які впродовж 4 тижнів споживали ω-3 ПНЖК, не було виявлено вірогідних відносно контролю змін вмісту МДА та рівня активності ензимів-антиоксидантів – супероксиддисмутази і каталази (табл.). Одержані дані можуть свідчити про те, що рівень пероксидних процесів у клітинах печінки в умовах експерименту залишається близьким до фізіологічної норми. Разом з цим, не зазнавало змін і функціонування системи антиоксидантного захисту. Хоча підвищення експресії такого потужного прооксидантного ензиму, як цитохром P450 2E1, мало би спричинити посилення пероксидних процесів та виснаження системи антиоксидантного захисту, але в умовах проведеного експерименту такий ефект не спостерігався. Це може свідчити про те, що рівень про-/антиоксидантних процесів у клітині, ймовірно, залишається у фізіологічних межах. Крім того, в регуляцію вмісту АФК у клітині можуть робити внесок і самі ω-3 ПНЖК, оскільки, як було показано раніше, вони виявляють певні антиоксидантні властивості [1]. Отже, за довготривалого вживання ω-3 ПНЖК у клітинах печінки дослідних щурів не виявляється ознак оксидативного стресу, а зберігається

фізіологічний рівень про-/антиоксидантних процесів.

Таким чином, внаслідок проведеного експерименту в печінці щурів, які впродовж 4 тижнів споживали ω-3 ПНЖК, виявлено більш ніж дворазове підвищення вмісту цитохрому P450 2E1. Проте такі зміни експресії ензиму не призводять до порушення балансу про-/антиоксидантних процесів у клітинах досліджуваного органа.

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

### **ВЛИЯНИЕ ω-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ЭКСПРЕССИЮ ЦИТОХРОМА P450 2E1 В ПЕЧЕНИ КРЫС**

*О. В. Максимчук*

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;  
e-mail: prima@imbg.org.ua; o.maksymchuk@ukr.net

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), в частности ω-3, входят в состав фосфолипидного слоя биомембран, что является важным для осуществления трансмембранного транспорта и функционирования комплексов мембраноассоциированных энзимов. Свободные ω-3 ПНЖК влияют на уровень экспрессии многих генов, и, таким образом, регулируют метаболические процессы, в частности липидный и углеводный обмен в клетках печени. Цитохром P450 2E1 (1.14.14.1) осуществляет биотрансформацию липофильных веществ экзогенного и

ендогенного походження, а також включається в гомеостатическі процеси як на клітинному, так і на системному рівні. В роботі досліджували зміни експресії цитохрому P450 2E1, а також стан антиоксидантної системи і рівня пероксидних процесів в печині експериментальних тварин при тривалому введенні  $\omega$ -3 ПНЖК. Виявлено більш ніж двократне збільшення вмісту цитохрому P450 2E1 в печині крыс, котрим на протязі 4 тижнів щодня до стандартного раціону виварювання додавали  $\omega$ -3 ПНЖК. В той же час таке змінення експресії ферменту не привело до порушення балансу про-/антиоксидантних процесів в клітинках досліджуваного органу.

**Ключеві слова:** цитохром P450 2E1,  $\omega$ -3 поліненасичені жирні кислоти, малоновий діальдегід, каталаза, супероксиддисмутаза.

### INFLUENCE OF $\omega$ -3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ON OXIDATIVE STRESS AND CYTOCHROME P450 2E1 EXPRESSION IN RAT LIVER

*O. V. Maksymchuk*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: prima@imbg.org.ua; o.maksymchuk@ukr.net

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs),  $\omega$ -3 ones in particular, form phospholipid layer of biological membranes, which provides normal functioning of membrane-associated complexes of enzymes and transmembrane transport. Free  $\omega$ -3 PUFAs regulate the transcription of many genes, and thereby have an effect on the level of metabolic processes, particularly control of lipid and carbohydrate metabolism in the liver. Cytochrome P450 2E1 (1.14.14.1) causes the transformation of lipophilic exogenous and endogenous substances, as well as involvement in homeostasis, both at the cellular and systemic levels. The aim is to study changes in expression of cytochrome P450 2E1, and to assess the antioxidant system and the level of peroxidation processes in the liver of experimental animals under the chronic action of  $\omega$ -3 PUFAs. During experiment more than two-fold increase in the content of cytochrome P450 2E1 was observed in the liver of

rats which additionally received  $\omega$ -3 PUFAs for 4 weeks in the standard daily diet. At the same time, such changes in the enzyme expression did not lead to an imbalance of pro- and antioxidant processes in the liver.

**Key words:** cytochrome P450 2E1,  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids, malondialdehyde, catalase, superoxide dismutase.

### References

1. Di Minno M., Russolillo A., Lupoli R, Ambrosino P., Di Minno A., Tarantino G. Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease // *World J. Gastroenterol.* – 2012. – **18**, N 41. – P. 5839–5847.
2. Arnold C., Konkel A., Fischer R., Schunck W. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids // *Pharmacol. Rep.* – 2010. – **62**, N 3. – P. 536–547.
3. Shysh A. M., Kukoba T. V., Tumanovs'ka L. V., Moïbenko O. O. Phospholipid membrane modification as a protection factor of the myocardium during stress injury // *Fiziol. Zh.* – 2005. – **51**, N 2. – P. 17–23. (In Ukrainian).
4. Jump D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2008. – **19**, N 3. – P. 242–247.
5. Anzenbacher P., Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2001. – **58**, N 5–6. – P. 737–747.
6. French S., Morimoto M., Reitz R., Koop D., Klopfenstein B., Estes K., Clot P., Ingelman-Sundberg M., Albano E. Lipid peroxidation, CYP2E1 and arachidonic acid metabolism in alcoholic liver disease in rats // *J. Nutr.* – 1997. – **127**, N 5 (Suppl). – P. 907S–911S.
7. Gonzalez F. J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1 // *Mutat. Res.* – 2005. – **569**, N 1–2. – P. 101–110.
8. Robertson G., Leclercq I., Farrell G. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. – **281**, N 5. – P. G1135–1139.
9. Kozhemyakin Yu. M., Chromov O. S., Filonenko M. A., Sayfedinova G. A. Scientific and

- practical recommendations of the maintenance of laboratory animals and working with them. – K.: Avicena, 2002. – 156 p. (In Ukrainian).
10. *Maksymchuk O. V., Bezdrobna L. K., Sidorik L. L., Kiseleva O. K., Chaschyn M. O.* Cytochrome P450 2E1 expression in mice liver under exposure of continuous and acute  $\gamma$ -radiation // *Ukr. Biochem. J.* – 2008. – **80**, N 4. – P. 59–65. (In Ukrainian).
  11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
  12. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**, N 5259. – P. 680–685.
  13. *Stalnaya I. D., Garishvili T. G.* Method for the determination of malondialdehyde with thiobarbituric acid. In book: *Modern methods in biochemistry.* Orikhovich V. N., editor. – M.: Medicine, 1977. – P. 66–68. (In Russian).
  14. *Koroliuk M., Ivanova L., Maiorova I., Tokarev V.* A method of determining catalase activity // *Lab. Delo.* – 1988. – N 1. – P. 16–19. (In Russian).
  15. *Clarke S. D.* Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome // *J. Nutr.* – 2001. – **131**, N 4. – P. 1129–1132.
  16. *Kitam V. O., Maksymchuk O. V., Chashchyn M. O.* The possible mechanisms of CYP2E1 interactions with HSP90 and the influence of ethanol on them // *BMC Struct. Biol.* – 2012. – 12:33. doi: 10.1186/1472-6807-12-33. Cited in PubMed; PMID:23241420.

Отримано 26.12.2013