

А.М. Шиш, С.П. Каплінський, В.С. Нагібін, В.Є. Досенко, О.О. Мойбенко

## Дослідження механізмів протизапальної дії омега-3 поліненасичених жирних кислот

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ

**Ключові слова:** жирні кислоти, транспортний білок вільних жирних кислот, антагоніст рецептора інтерлейкіна-1, лейкотриєн  $C_4$ , тромбоксан  $B_2$ .

Виявлено стимулюючий вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот на експресію генів FATP та IL-1ra, що збільшується у 2,25 та 8,4 рази відповідно в серцях дорослих тварин. Також спостерігали збільшення експресії мРНК FATP в 2,5 рази, а мРНК IL-1ra в 8,1 рази в ізольованих кардіоміоцитах щурів. Показано, що в умовах ішемії-реперфузії ізольованого серця під впливом омега-3 поліненасичених жирних кислот зменшується вміст LTC<sub>4</sub> і TxB<sub>2</sub>.

### Исследование механизмов противовоспалительного действия омега-3 полиненасыщенных жирных кислот

А.М. Шиш, С.П. Каплинский, В.С. Нагибин, В.Е. Досенко, А.А. Мойбенко

Виявлено стимулююче вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот на експресію генів FATP та IL-1ra, которая увеличивается в 2,25 и 8,4 раз соответственно в сердцах взрослых животных. Также наблюдалось увеличение экспрессии мРНК FATP в 2,5 раза, а мРНК IL-1ra в 8,1 раз в изолированных кардиомиоцитах крыс. Показано, что в условиях ишемии-реперфузии изолированного сердца под влиянием омега-3 полиненасыщенных жирных кислот уменьшается содержание LTC<sub>4</sub> и TxB<sub>2</sub>.

**Ключевые слова:** жирные кислоты, транспортный белок свободных жирных кислот, антагонист рецептора интерлейкина-1, лейкотриен  $C_4$ , тромбоксан  $B_2$ .

**Патология.** – 2011. – Т.8, №3. – С. 74–77

### Investigation of anti-inflammatory mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids

A.M. Shysh, S.P. Kaplinsky, V.S. Nagibin, V.E. Dosenko, A.A. Moibenko

It was shown that  $\omega$ -3 PUFA stimulated FATP and IL-1ra mRNA gene expression which increases by 2,25 and 8,4 times correspondently in adult rats' hearts. In isolated cardiomyocytes mRNA expression of FATP was augmented by 2.5 times, IL-1ra – by 8,1 times. Ischemia-reperfusion of isolated rat's heart in omega-3 group was accompanied by reduced leukotriene  $C_4$  and thromboxane  $B_2$  production.

**Key words:** fatty acids, fatty acid transport protein, interleukin-1 receptor antagonist, leukotriene  $C_4$ , thromboxane  $B_2$ .

**Pathologia.** 2011; 8(3): 74–77

Останнім часом більшість дослідників відстоюють думку, що омега-3 поліненасичені жирні кислоти ( $\omega$ -3 ПНЖК) формують адекватну відповідну реакцію клітин організму на дію зовнішніх патогенних факторів, регулюють ліпідний обмін, запобігають розвитку запалення, утворення тромбів, порушення серцевого ритму [3,6,9]. Крім того, ПНЖК мають гіпотензивну й антиаритмічну дію, знижуючи чутливість до агоністів адренорецепторів. Встановлено, що  $\omega$ -3 ПНЖК здатні конкурентно заміщувати у фосфоліпідах клітинних мембран арахідонову кислоту (АК) [5,9]. Продукти перетворення АК – лейкотриєни, простагландини та тромбоксани мають потужні біологічні ефекти та можуть впливати на перебіг патологічних процесів, зокрема виявляють протромботичну, проагрегантну, прозапальну та вазоконстрикторну дію. Накопичується все більше доказів, що рецептори, що активуються проліфераторами пероксисом (PPAR), зокрема  $\omega$ -3 ПНЖК, мають протизапальні ефекти [2,9]. Доведено наявність генів, експресія яких практично повністю залежить від активації PPAR. До таких генів належить ген, що кодує транспортний білок вільних жирних кислот (FATP) і природний антагоніст рецептора інтерлейкіна-1 (IL-1ra). Однак багато питань, що стосуються механізмів впливу  $\omega$ -3 ПНЖК на продукцію ейкозаноїдів та експресію генів, залишаються не з'ясованими.

### Мета роботи

Визначення впливу  $\omega$ -3 ПНЖК на експресію двох генів-мішеней PPAR (FATP, IL-1ra) в ізольованих неонатальних кардіоміоцитах і в серці дорослих щурів; дослідження їх впливу на продукцію ейкозаноїдів.

### Матеріали і методи дослідження

Експерименти проведені на щурах-самцях лінії Вістар масою 280–300 г. Тварин розподілено на 2 групи по 6 щурів у кожній: контрольна група (контроль) – утримувана на стандартному раціоні віварію; дослідна група – тварини, до раціону яких протягом 4 тижнів додавали  $\omega$ -3 ПНЖК (препарат «Епадол», 0,1 мг на 100 г). Щурів забивали під уретановим наркозом (1,9 г/кг), швидко вилучали серця та перфузували ретроградно за класичним методом Лангендорфа з 20-хвилинною тотальною ішемією та наступною 40-хвилинною реперфузією [1]. Тканину серця використовували для біохімічних досліджень.

Для отримання неонатальних кардіоміоцитів з модифікованим жирнокислотним спектром мембран до раціону самок щурів лінії Вістар протягом 1 тижня додавали  $\omega$ -3 ПНЖК, спарювали та продовжували додавати до раціону  $\omega$ -3 ПНЖК (дослідна група) до та ще 3 дні після народження щурят. Контрольну групу склали самки, яких утримували на стандартному раціоні віварію та спарювали. 2–3-денних щурят евтаназували та використовували шлуночки серця для виділення кардіоміоцитів.

Виділення РНК з тканин серця та ізолюваних кардіоміоцитів проводили шляхом фенол-хлороформової екстракції з використанням набору Trizol RNA-prep (Isogen, Росія). Зворотню транскрипцію проводили із застосуванням M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Литва), застосовуючи 300–500 нг загальної РНК з ізолюваних кардіоміоцитів та 2–2,5 мкг з тканин серця та рандомний гексамерний праймер. Проводили полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (RT-PCR) із застосуванням відповідних пар праймерів для визначення експресії гену IL-1 $\alpha$  та бета-актину (внутрішній контроль) відповідно.

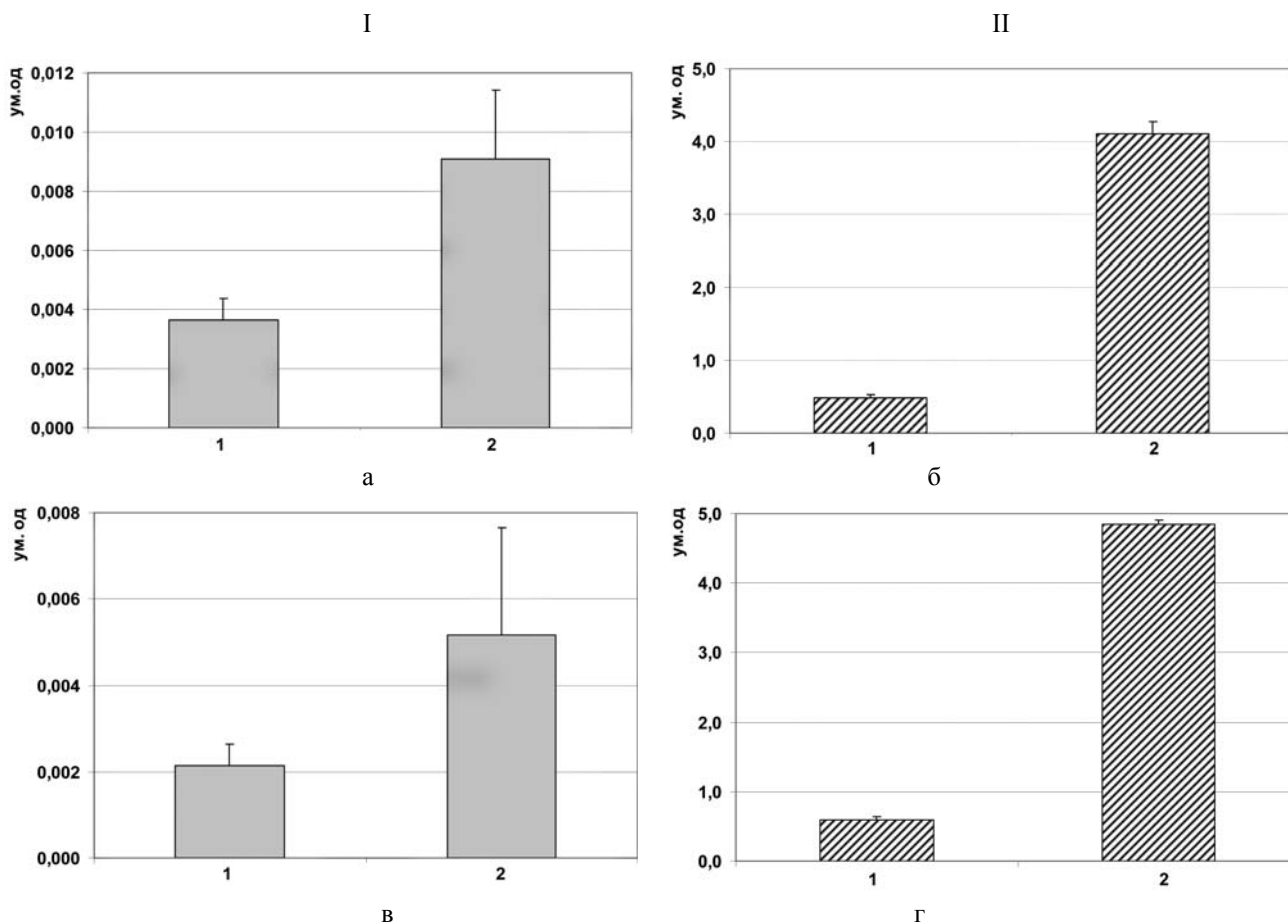
Вміст ЛТС<sub>4</sub> і ТхВ<sub>2</sub> в тканині серця визначали за допомогою РІА-методу з використанням добірки реактивів фірми «Du pont» і «Amersham» ([<sup>3</sup>H]-ЛТС<sub>4</sub> та [<sup>3</sup>H]-ТхВ<sub>2</sub> RIA kit відповідно).

Отримані дані оброблювали статистично з використанням програм Origin 7.0 та Excel 2000.

### Результати та їх обговорення

Раніше показано, що застосування препаратів  $\omega$ -3 ПНЖК призводить до модифікації жирнокислотного складу клітинних мембран, зокрема до зменшення вмісту  $\omega$ -6 ПНЖК та збільшення вмісту  $\omega$ -3 ПНЖК у фосфоліпідах клітинних мембран [1].

Результати кількісної оцінки експресії генів-мішеней PPAR у тканинах серця та ізолюваних кардіоміоцитах свідчать про односпрямований стимулюючий вплив  $\omega$ -3 ПНЖК. Так, у серці дорослих щурів експресія мРНК FATP зростає у 2,25 рази (P=0,07), а гена IL-1 $\alpha$  – у 8,4 рази (P<0.00001). На *рис. 1* видно, що експресія гена FATP у серці значно поступається експресії мРНК IL-1 $\alpha$  (0,0038 $\pm$ 0,0007 та 0,489 $\pm$ 0,037 відповідно), що, можливо, пояснює менш виражений вплив  $\omega$ -3 ПНЖК на експресію першого. В культивованих кардіоміоцитах експресія мРНК FATP зростає у 2,5 рази (P=0,22), а експресія мРНК IL-1 $\alpha$  збільшується у 8,1 рази (P<0,00001, *рис. 1*). На нашу думку, важливо, що спостерігаються практично однакові зміни експресії вивчених генів, як у серці, так і в ізолюваних кардіоміоцитах, і це підтверджує специфічність впливу  $\omega$ -3 ПНЖК. За результатами хроматографічного аналізу встановлено, що у фосфоліпідах мембран неонатальних кардіоміоцитів щурят, народжених від самок, яких годували зазначеним препаратом, змінюється жирнокислотний склад мембран. Так, вміст альфа-ліноленової та докозагексаєнової кислоти збільшується в 3,6 та 2 рази порівняно з контролем. Це свідчить про проникнення  $\omega$ -3 ПНЖК через плацентарний бар'єр і вбудовування їх у мембрани клітин плода.



*Рис. 1.* Зміни експресії мРНК гена FATP (I) та IL-1 $\alpha$  (II) у тканинах серця (а, б) і культивованих неонатальних кардіоміоцитах (в, г) за впливу  $\omega$ -3 ПНЖК. 1 – контроль, 2 –  $\omega$ -3 поліненасичені жирні кислоти, ум. од. – відносний рівень мРНК досліджуваного гена до рівня мРНК актину.

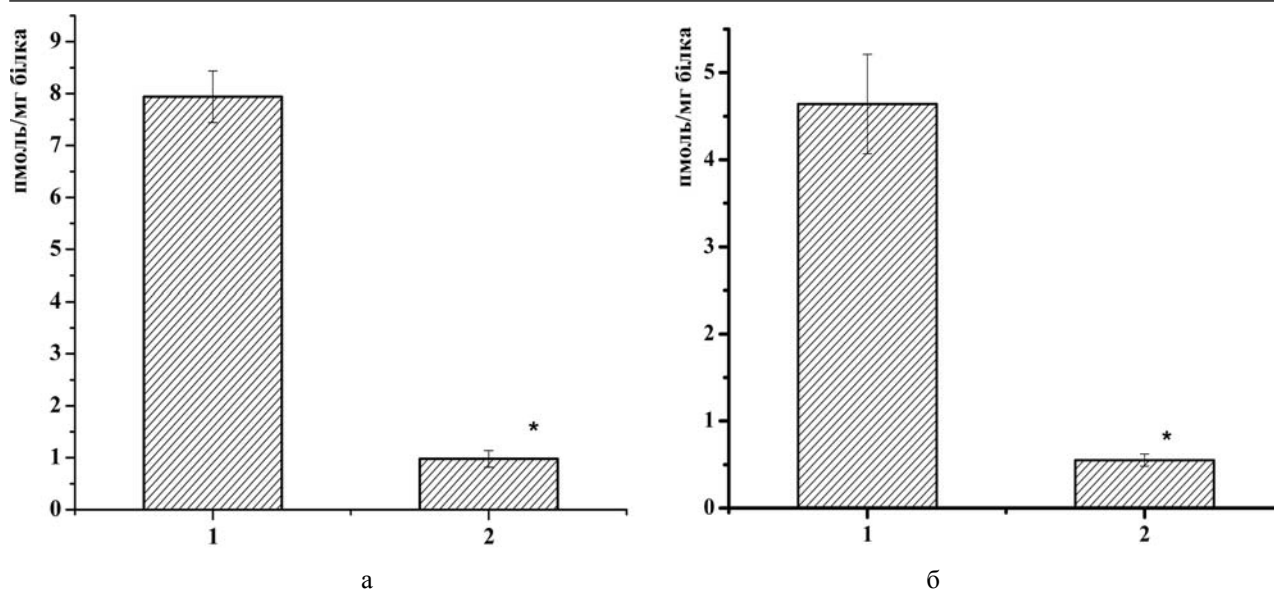


Рис. 2. Вміст тромбоксану В<sub>2</sub> (а) і лейкотриєну С<sub>4</sub> (б) (пмоль/мг білка) у гомогенаті тканини міокарда щурів. 1 – ішемія-реперфузія, 2 – ішемія-реперфузія+ ω-3 ПНЖК; \* – вірогідно у порівнянні з ішемією; p<0,05.

Зважаючи на виражений вплив ω-3 ПНЖК на експресію гена, що кодує антагоніст рецептора ІЛ-1, слід думати, що ω-3 ПНЖК опосередковано через PPARγ можуть мати протизапальний ефект, пов'язаний зі зменшенням впливу ІЛ-1 на свої рецептори. Велика кількість досліджень свідчить про негативний вплив ІЛ-1 та інших прозапальних цитокінів на міокард при ішемії-реперфузії та інфаркті міокарда [7,9]. У дослідженні А. Bonetti et al. [4] доведено, що при інфаркті міокарда збільшується вміст ІЛ-1га в цитоплазмі клітин серця та інтерстиції, що розглядається як захисна реакція кардіоцитів на ішемічне ушкодження, що супроводжується аутокринним впливом ІЛ-1. Більш того, рекомбінантний ІЛ-1га запобігає апоптозу кардіоцитів при ішемії серця [2]. Зважаючи на отримані дані, можна стверджувати, що кардіопротективна дія ω-3 ПНЖК може бути, зокрема, пов'язана зі стимуляцією продукції цього натурального антицитокіну. Відомо, що при підвищенні вмісту поліненасичених жирних кислот у раціоні зменшується рівень прозапальних цитокінів: ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-10, TNFα, молекул клітинної адгезії та хемокінів [6,7]. Тобто відзначено виражений протизапальний ефект, що реалізується й на рівні експресії генів названих цитокінів.

За допомогою радіоімунного методу показано зменшення ТхВ<sub>2</sub> і LTC<sub>4</sub> у серцях тварин під впливом ω-3 ПНЖК. Так, після ішемії-реперфузії ізольованого серця на фоні модифікації жирнокислотного складу мембран зменшується вміст активних метаболітів – LTC<sub>4</sub> у 8,4 рази і ТхВ<sub>2</sub> у 8 разів (рис. 2). Як відомо, метаболіти АК мають значні прозапальні, вазоконстрикторні та проагрегантні властивості, тоді як лейкотриєнам і тромбоксанам, що утворюються з ω-3 ПНЖК, притаманна не лише менша біологічна активність, але й інша спрямованість біологічних ефектів [3,5]. Утворення цитокінів і продукція ейкозаноїдів перебувають у тісному взаємозв'язку.

На нашу думку, механізми дії ω-3 ПНЖК зумовлені вбудовуванням їх у фосfolіпідний шар клітинних мембран, що супроводжується пригніченням синтезу ейкозаноїдів, а також активацією рецепторів PPAR, що, в свою чергу, модулюють місцеві та системні реакції запалення. Існують дані, що деякі простагландини та лейкотриєни є природними агоністами рецепторів PPAR [8].

#### Висновки

Отримані дані дозволяють стверджувати, що ω-3 ПНЖК знижують утворення продукції арахідонової кислоти та її прозапальних похідних лейкотриєну С<sub>4</sub> і тромбоксану В<sub>2</sub> та впливають на експресію генів, що регулюють активність метаболічних процесів та імунної відповіді. Слід вважати, що широке клінічне застосування ω-3 ПНЖК виявить додаткові сприятливі фармакотерапевтичні ефекти цієї групи препаратів, а подальше поглиблене дослідження молекулярних механізмів їх дії на рівні сигнальних каскадів клітини дозволить розкрити нові механізми їх кардіопротекторного та протизапального ефектів.

#### Література

1. Шиш А.М. Модифікація жирнокислотного складу мембран фосfolіпідів клітин омега-3 поліненасиченими жирними кислотами / Шиш А.М., Кукоба Т.В., Харченко О.В. // Доп. НАНУ. – 2004. – №11. – С. 184–188.
2. Abbate A. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction / Abbate A., Salloum F.N., Vecile E., et al. // Circulation. – 2008. – Vol. 117, №20. – P. 2670–2683.
3. Ayalew-Pervanchon A.P. Long-term effect of dietary α-linolenic acid or decosahexaenoic acid of incorporation of decosahexaenoic acid in membranes and its influence on rat heart in vivo / Ayalew-Pervanchon A.P., Grynberg A. // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2007. – Vol. 293. – P. H2296–H2304.
4. Bonetti A. Immunolocalization of interleukin-1 receptor antagonist in healthy and infarcted myocardium / Bonetti A.,

- 
- Marchini M., Ortolani F. // *Histol. Histopathol.* – 2008. – Vol. 23, №9. – P. 1093–1102.
5. *Breslow Jan L.* n-3 Fatty acids and cardiovascular disease / Breslow Jan L. // *American Journal of Clinical Nutrition.* – 2006. – Vol. 83, №6. – P. S1477–1482S.
6. *Calder P.C.* Polyunsaturated fatty acids and inflammation / Calder P.C. // *Biochem. Soc. Transactions.* – 2005. – Vol. 33, Part 2. – P. 423–427.
7. *Dinarello C.A.* Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process / Dinarello C.A. // *American Journal of Clinical Nutrition.* – 2006. – Vol. 83. – P. 447S–455S.
8. *Forman B.M.* Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta / Forman B.M., Chen J., Evans R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 4312–4317.
9. *Hooper L.* Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review / Hooper L., Thompson R. L., Harrison R. A., et al. // *B.M.J.* – 2006. – Vol. 332. – P. 752–760.
10. *Knouff C.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology / Knouff C., Auwerx J. // *Endocr. Rev.* – 2004. – Vol. 25. – P. 899–918.
- 

**Відомості про авторів:**

Шиш А.М., к. біол. н., провідний наук. співробітник відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Каплінський С.П., аспірант відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Нагібін В.С., к. мед. н., ст. наук. співробітник відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Досенко В.Є., д. мед. н., професор, провідний наук. співробітник відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Мойбенко О.О., д. мед. н., професор, Академік НАН України, зав. відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

**Адреса для листування:**

Шиш Анжела Михайлівна. 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4, відділ загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

E-mail: angela@biph.kiev.ua