

БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГЕПАТОСТЕАТОЗУ ПРИ ВІДСУТНОСТІ ЗАПАСІВ ВІТАМІНУ А

І. О. ШМАРАКОВ, В. Л. БОРЩОВЕЦЬКА, О. М. КОБИЛЯНСЬКА

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
 Інститут біології, хімії та біоресурсів, вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
 e-mail: igor.shmarakov@gmail.com

Робота присвячена дослідженню особливостей розвитку гепатостеатозу та інсулінорезистентності при відсутності запасів вітаміну А. Для створення вітамін-А дефіцитного стану в експерименті використали трангенних мишей, не здатних етерифікувати ретинол у печінці внаслідок нокауту гена лецитин: ретинолацилтрансферази ($Lrat^{+/-}$), а тому позбавлених печінкових ретиніл ефірів. Гепатостеатоз індукували шляхом утримання експериментальних тварин протягом 16-тижнів на високожировій дієті, збагаченій транс-жирами та з високим вмістом фруктози. Оцінку розвитку гепатостеатозу проводили на основі кількісного визначення рівня триацилгліцеролів та холестеролу в сироватці крові та тканині печінки (із попередньою екстракцією ліпідної фракції за методом Фолча), якісного (з використанням методу електрофорезу) та кількісного аналізу ліпопротеїнів сироватки крові. Біохімічний аналіз інсулінорезистентності проводили на основі визначення показників рівня глюкози натще та сповільненні темпів її кліренсу, визначених у тесті толерантності до глюкози, та рівня глікозильованого гемоглобіну. Результати проведених досліджень показали, що утримання тварин дикого типу на високожировій дієті, призводить до розвитку гепатостеатозу, що виражається у зростанні рівня триацилгліцеролів і холестеролу в печінці та сироватці крові тварин. Проведений якісний та кількісний аналіз ліпопротеїнів сироватки крові виявив зростання ліпопротеїнів низької густини на 50 %. Одночасно виявлене нами зростання рівня загального холестеролу на 30 % свідчило про накопичення його атерогенної форми. Супутнім проявом гепатостеатозу виявляється інсулінорезистентність та розвиток діабету II типу, які проявляються у достовірно вищих показниках рівня глюкози натще, сповільненні темпів її кліренсу, визначених у тесті толерантності до глюкози, та у зростанні рівня глікозильованого гемоглобіну на 30 %. Відсутність ендогенно-депонованих ретиноїдів у мишей $Lrat^{+/-}$, забезпечувала резистентність щодо розвитку неалкогольного ожиріння печінки. Зокрема досліджувані показники: рівень триацилгліцеролів і холестеролу в печінці та сироватці крові тварин не відрізнялись від величин, характерних для тварин, яких утримували на стандартній дієті. Водночас у тварин нокаутів не спостерігалася поява ознак інсулінорезистентності, а рівень глікозильованого гемоглобіну у толерантності до глюкози не відрізнялись від величин, характерних для тварин, яких утримували на стандартній дієті.

Ключові слова: гепатостеатоз, ретиноїди, інсулінорезистентність, неалкогольна жирова хвороба печінки.

Вступ. На сьогодні зростає частка нутрієнтних патологій, супутнім проявом яких виступає неалкогольна жирова хвороба печінки (англ. *nonalcoholic fatty liver disease, NAFD*) – інтегральне, багатofакторне ураження печінки при ожирінні та метаболічному синдромі (Tomita et al., 2014). Актуальність проблеми неалкогольного ожиріння печінки зумовлена прогресуванням цієї патології від гепастеатозу, що виникає внаслідок порушення транспорту, акумуляції та метаболізму нейтральних жирів, до неалкогольного стеатогепатиту, прогресуючого фіброзу, цирозу та гепатоцелюлярної карциноми (Tetri et al., 2008; Targher et al., 2007).

Патогенез *NAFD* тісно пов'язаний із синдромом інсулінорезистентності, що характеризується низьким рівнем поглинання глюкози периферичними інсулінзалежними

тканинами, і супроводжується розвитком низки клінічних проявів – гіперглікемії, гіперінсулінемії, дисліпідемії, артеріальної гіпертензії та ожиріння (Pooranaperundevi, 2010; Saini, 2010).

Надзвичайно актуальним виявляється розкриття механізмів залучення природних біорегуляторів у розвиток *NAFD* з метою застосування набутих знань в корекції метаболічних порушень. В цьому аспекті значну увагу привертають ретиноїди (вітамін А та його метаболіти), запаси яких прогресивно втрачаються при розвитку патологій печінки (Chen, 2013). На сьогодні цілком доведеною є роль активних метаболітів вітаміну А як генних регуляторів ліпідного обміну та обміну вуглеводів (Brun et al., 2013). Зокрема ретиноїди здатні модулювати експресію генів, залучених у мітохондріальне та

пероксисомальне окислення жирних кислот, (включаючи ацил-КоА лігазу 2, карнітин пальмітоїлтрансферазу 1, ацил КоА дегідрогеназу та ацил КоА оксидазу 1) та глюконеогенез (фосфоенолпіруват карбоксикіназа).

У зв'язку з цим метою роботи було встановити особливості розвитку гепатостеатозу та інсулінорезистентності при відсутності ендогенно депонованих ретиноїдів у формі печінкових ретиніл ефірів.

Матеріали та методи. Досліди проводили на мишах лінії C57BL/6J (дикий тип, WT), віком 8 тижнів, вагою 20-25 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями статті 26 Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених 20.09.2001 Першим Українським національним конгресом з біоетики, та з урахуванням положень, викладених у *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Guide..., 2011).

З метою індукування гепатостеатозу тварин утримували на високожировій дієті (*high fat diet, HFD*, калорійність 23,4кДж/г), збагаченій *транс*-жирами та з високим вмістом фруктози, представленої у вигляді сиропу (*high-fructose corn syrup, HFCS*) із масовою часткою фруктози та глюкози 55 % та 45 % відповідно (Tetri et al., 2008; Sorhede and Ahren, 2004). Контрольну групу складали миші, які перебували на стандартній дієті (*chow diet, CD*, калорійність 12,6кДж/г) (Reeves et al., 2009) (Табл. 1, 2, 3).

Для встановлення внеску ендогенно депонованих ретиніл ефірів в дослідженнях використано тварин, не здатних етерифікувати ретинол у печінці внаслідок нокауту гена лецитин: ретинолацилтрансферази EC 2.3.1.135 (*Lrat^{-/-}*), а тому позбавлених печінкових ретиніл ефірів.

Дослідні тварини були поділені на групи:

- група I (WT/CD) – тварини дикого типу, які знаходились на стандартній дієті;
- група II (WT/HFD) – тварини дикого типу, які знаходились на високожировій дієті, збагаченій *транс*-жирами та з високим вмістом фруктози;
- група III (*Lrat^{-/-}*/CD) – тварини, нокаутні за геном лецитин: ретинолацилтрансферази, які знаходились на стандартній дієті;
- група IV (*Lrat^{-/-}*/HFD) – тварини, нокаутні за геном лецитин: ретинол ацилтрансферази, які знаходились на високожировій дієті

збагаченій *транс*-жирами та з високим вмістом фруктози.

Після 16-тижневого утримання тварин на дієті проводили евтаназію під легким ефірним наркозом. Тварин зважували, проводили забір крові та видаляли печінку. Сироватку крові отримували шляхом центрифугування при 3000 g протягом 10 хв.

Для кількісної оцінки рівня триацилгліцеролів та холестеролу в тканині печінки проводили попередню екстракцію ліпідної фракції за методом Фолча (Folch et al., 1956). Для цього близько 100 мг тканини поміщали у 50 мл пробірки, які містили 5 мл 1,0 M NaCl, та гомогенізували. До отриманого гомогенату печінки додавали 10 мл суміші хлороформ:метанол (2:1). Зразки інтенсивно перемішували протягом 1 хв до їх повної гомогенізації. Після центрифугування при 800g протягом 10 хв нижню хлороформну фазу відбирали у скляну пробірку. З метою повного виходу ліпідів до залишеної нижньої фази додавали 5 мл суміші хлороформ:метанол (2:1), перемішували та центрифугували як попередньо описано. Об'єднані хлороформні фази випаровували під N₂. Після повного випаровування хлороформу у зразки додавали 1 мл 2 % тритону X-100 у хлороформі та інтенсивно перемішували. Хлороформ випаровували під N₂, а осад ліпідів розчиняли, додаючи у скляні пробірки 1 мл деіонізованої води.

Вміст триацилгліцеролів у отриманій ліпідній фракції та сироватці крові визначали з використанням стандартного набору «Філісіт-Діагностика» згідно з інструкцією виробника, та виражали в ммоль/г та ммоль/л відповідно. Вміст холестеролу у отриманій ліпідній фракції та сироватці крові визначали з використанням стандартного набору «Філісіт-Діагностика» згідно з інструкцією виробника та виражали у ммоль/г та ммоль/л відповідно.

Фракційний аналіз ліпопротеїнів сироватки крові проводили методом електрофорезу в поліакриламідному гелі з градієнтом концентрації від 3 % до 10 %. Аліквоту попередньо зафарбованих суданом чорним ліпопротеїнів сироватки крові розділяли після чого ідентифікували різні фракції ліпопротеїнів (Herbert et al., 1973).

Рівень ліпопротеїнів низької густини та глікозильованого гемоглобіну визначали з використанням стандартного набору «Філісіт-Діагностика» згідно з інструкцією виробника та виражали в ум. од. та мкмоль фруктози / г гемоглобіну відповідно.

Таблиця 2.
Суміш вітамінів, використана в стандартній (CD)
та високожировій (HFD) дієтах

Table 2.
Vitamin mix used in chow (CD) and high fat (HFD)
diets

Компонент	Масова частка, г/кг		Компонент	Масова частка, г/кг	
	HFD	CD		HFD	CD
Крохмаль	200	365	Целюлоза	50	50
Декстринізований крохмаль	100	154	Суміш вітамінів	10	10
Казеїн	223,5	195	Суміш мінералів	35	35
Сахароза	80	100	L-цистеїн	1,8	1,8
Соева олія	180	40	Холін хлорид	2,5	2,5
Маргарин	180	-	Терт-бутилгідрокінон	0,008	0,008

Таблиця 1.
Компонентний склад стандартної (CD) та
високожирової (HFD) дієт

Table 1.
Component composition of chow (CD) and high fat
(HFD) diets

Компонент	Масова частка, г/кг	Компонент	Масова частка, г/кг
Нікотинова кислота	3	Вітамін Е	15
Піридоксин	0,7	Вітамін А	0,8
Тіамін	0,6	Вітамін D	0,25
Рибофлавін	0,6	Вітамін К	0,075
Фолієва кислота	0,2	Пантотенова кислота	1,6
Біотин	0,02	Сахароза	974,655
Вітамін В ₁₂	2,5	Вітамін Е	15

Таблиця 3.
Суміш мінералів, використана в стандартній (CD)
та високожировій (HFD) дієтах

Table 3.
Mineral mix used in chow (CD) and high fat (HFD)
diets

Компонент	Масова частка, г/кг	Компонент	Масова частка, г/кг
Кальцій карбонат	357	Калій йодит	0,01
Калій фосфат	250	Натрій селенат	0,01025
Натрій хлорид	74	Амоній парамолібдат	0,00795
Калій сульфат	46,6	Натрій метаселікат	1,45
Калій цитрат	28	Борна кислота	0,0815
Оксид магнію	24	Натрій флуорид	0,0635
Ферум цитрат (Fe III)	6,06	Нікель карбонат	0,0318
Цинк карбонат	1,65	Літій хлорид	0,0174
Манган карбонат	0,63	Ванадат амонію	0,0066
Купрум карбонат	0,3	Хром натрій сульфат	0,275

Для встановлення рівня захоплення позапечінковими інсулінзалежними тканинами глюкози проводили тест толерантності до глюкози (Sorhede and Ahren, 2004). Для цього у тварин після 12 годинного обмеження доступу до їжі визначали рівень глюкози в крові, величина якого слугувала в подальшому референтною. Тваринам вводили інтраперитонеально розчин глюкози (0,5 г/мл) з розрахунку 3 мкл/г ваги та проводили визначення рівня глюкози через 15, 30, 60, 90 та 120 хвилин, використовуючи глюкометр ІМЕ-DC.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різниці вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення. Утримання мишей дикого типу (група WT/HFD) на високожировій дієті призводило до появи класичних ознак розвитку неалкогольного ожиріння печінки. У тварин даної групи спостерігалось зростання рівня триацилгліцеролів печінки на 35 % та холестеролу на 25 % (Рис.1.), що свідчило про акумуляцію нейтральних ліпідів в гепатоцитах.

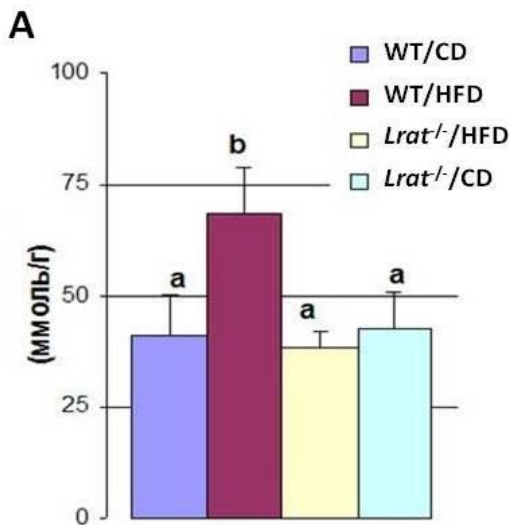


Рис. 1. Вміст триацилгліцеролів (А) та холестеролу (Б) в тканині печінки тварин

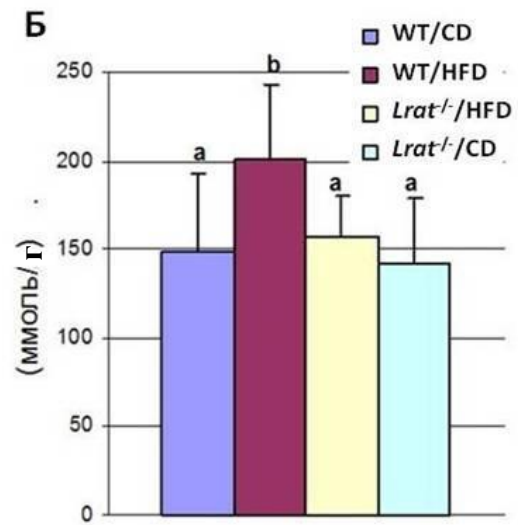


Fig. 1. The content of triacylglycerols (A) and cholesterol (B) in the liver tissue of animals

Примітка: величини позначені різними буквеними індексами статично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

Note: values are indicated by different letter index statistically significant difference, $P \leq 0,05$

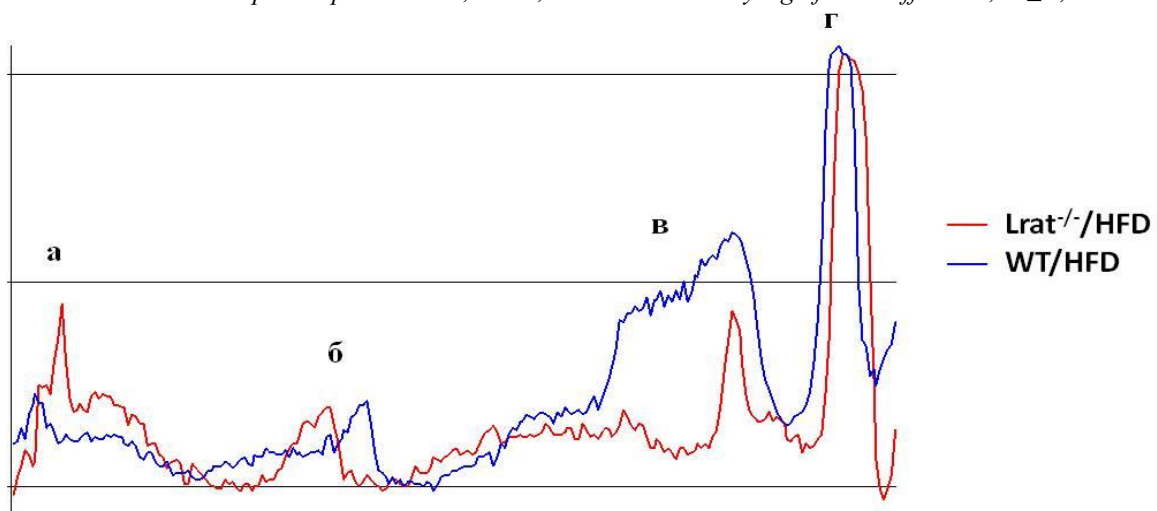


Рис. 2. Фракційний розподіл ліпопротеїнів сироватки крові

Fig. 2. Fractional distribution of serum lipoproteins

Примітка: хиломікрони - chylo (а), ліпопротеїни дуже низької густини - VLDL (б), ліпопротеїни низької густини - LDL (в) та ліпопротеїни високої густини - HDL (г)

Note: chylomicrons - chylo (a), very low density lipoproteins - VLDL (b), low density lipoproteins - LDL (c) and high density lipoproteins - HDL (g)

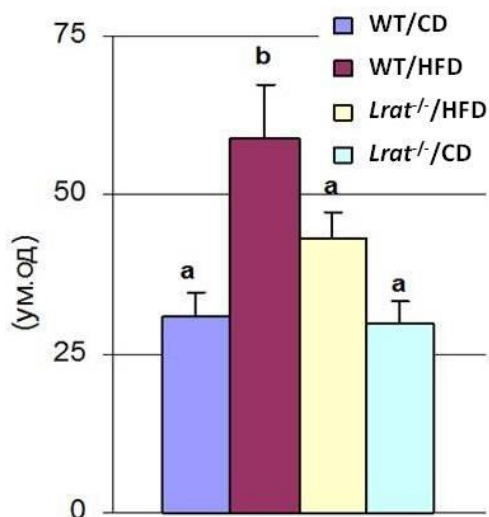


Рис. 3. Вміст ліпопротеїнів низької густини в сироватці крові тварин

Примітка: величини позначені різними буквеними індексами статично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

Fig. 3. The content of low density lipoproteins in the blood serum of animals

Note: values are indicated by different letter index statistically significant difference, $P \leq 0,05$

Відомо, що при надмірному надходженні в організм харчових ліпідів зростає рівень вільних жирних кислот, які внаслідок β -окислення в мітохондріях стають джерелом ацетил-КоА. Проте утворені кількості перевищують можливості окислення в циклі Кребса, а тому спрямовуються на ліпогенез *de novo*. Водночас накопичення нейтральних жирів в тканинах печінки супроводжується порушенням співвідношення транспортних форм ліпідів та надмірної секреції триацилгліцеролів у складі ліпопротеїнів дуже низької густини. Проведений нами фракційний аналіз ліпопротеїнів сироватки крові показав, що у тварин з гепатостеатозом (група WT/HFD) на денситограмі спостерігалось розширення зони, що відповідає ліпопротеїнам низької густини (Рис. 2.).

При проведеній кількісній оцінці стану дисліпідемії нами було зафіксовано зростання рівня ліпопротеїнів низької густини в сироватці крові на 50 % (Рис.3.). З цими результатами узгоджується зростання рівня триацилгліцеролів у сироватці крові на 50 % (Рис.4.А). Проведене визначення рівня загального холестеролу показало зростання його вмісту на 30% (Рис.4 Б).

Оскільки нами не було зафіксовано зростання рівня ліпопротеїнів високої густини, як основного транспортера холестеролу до печінки (Uehara and Saku, 2014), та виявлено збільшення рівня ліпопротеїнів низької густини, як транспортера до позапечінкових тканин (Harisa and Alanazi, 2013), зростання рівня загального холестеролу найімовірніше свідчить про накопичення його атерогенної форми.

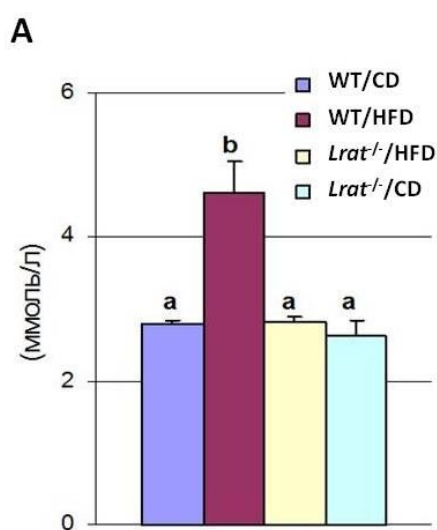


Рис. 4. Вміст триацилгліцеролів (А) та холестеролу (Б) в сироватці крові тварин

Примітка: величини позначені різними індексами статично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

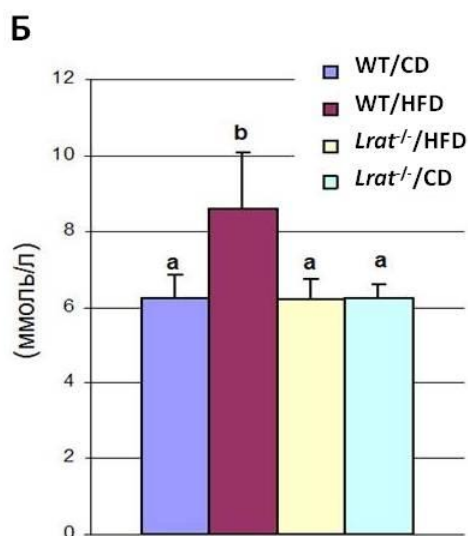


Fig. 4. The content of triacylglycerols (A) and cholesterol (B) in the blood serum of animals

Note: values indicated by different letter index are statistically significant difference, $P \leq 0,05$

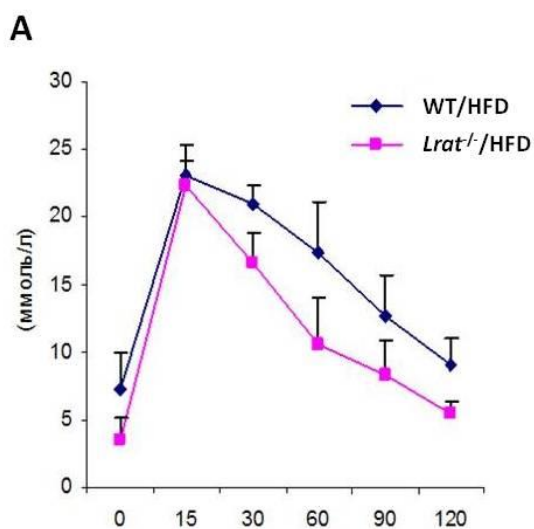


Рис. 5. Тест толерантності до глюкози (А) та вміст глікозильованого гемоглобіну (Б) в крові тварин

Примітка: величини позначені різними буквеними індексами статично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

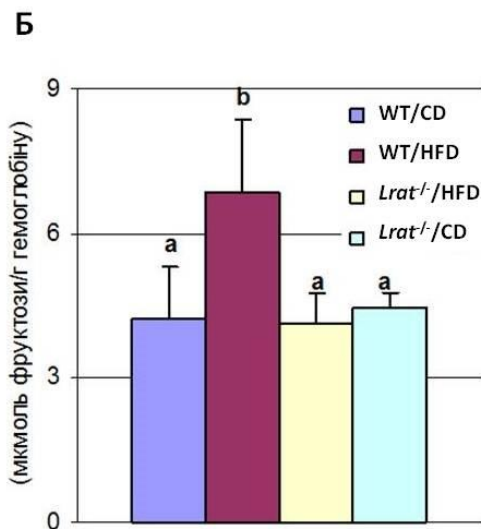


Fig. 5. Glucose tolerance test (A) and glycosylated hemoglobin content (B) in the blood of animals

Note: values indicated by different letter index are statistically significant different, $P \leq 0,05$

Водночас у тварин, позбавлених ендогенно депонованих ретиніл ефірів ($Lrat^{-/-}$) не спостерігалось накопичення триацилгліцеролів в печінці, а досліджувані показники не відрізнялися від величин, характерних для тварин, яких утримували на стандартній дієті (Рис. 1, 2, 3, 4).

Оскільки відомо, що гепатостеатоз супроводжується розвитком цукрового діабету 2 типу, нами проведено біохімічний аналіз інсулінорезистентності. У тварин (група WT/HF) інсулінорезистентність проявлялась у достовірно вищих показниках рівня глюкози натще та сповільненні темпів її кліренсу, визначених у тесті толерантності до глюкози (Рис. 5 А).

Для підтвердження поступового зростання рівня глюкози в крові нами було проведено визначення рівня глікозильованого гемоглобіну, що відображає відсоток гемоглобіну крові, необоротно сполученого з молекулами глюкози. Підвищений рівень глікозильованого гемоглобіну на 30 % (Рис. 5 Б) свідчив про персистентність процесів, які характеризують діабет 2 типу.

Водночас у тварин, позбавлених ендогенно депонованих ретиніл ефірів ($Lrat^{-/-}$), (група $Lrat^{-/-}$ /HFD) не спостерігалось ознак інсулінорезистентності, а рівень глікозильованого гемоглобіну і толерантність до глюкози не відрізнялись від величин,

характерних для тварин, яких утримували на стандартній дієті (Рис. 5).

Отже, ендогенно-депоновані ретиноїди залучені в патогенез неалкогольного ожиріння печінки, та можуть виступати модуляторами даної патології.

Список літератури:

1. Brun P. J. Potent regulators of metabolism / P. J. Brun, J. Z. Yang, S. A. Lee [et al.] // Biofactors. – 2013. – Vol. 39, № 2. – P. 151–163.
2. Chen G. Roles of Vitamin A Metabolism in the Development of Hepatic Insulin Resistance / G. Chen // ISRN Hepatology. – 2013. – Vol. 2013. № 4 – P. 1-21.
3. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226. – P. 497-509.
4. Guide for the care and use of laboratory animals. - Washington D. C.: National Academies Press, 2011. - p. 246.
5. Harisa G. I. Low density lipoprotein bionanoparticles: from cholesterol transport to delivery of anti-cancer drugs / G. I. Harisa and F. K. Alanazi // Saudi Pharm. J. – 2014. – Vol. 22, № 6. – P. 504-515.
6. Herbert K. Polyacrylamide-Gel Disc-Electrophoresis as a Screening Procedure for Serum Lipoprotein Abnormalities / K. Herbert, N. M. Wada, L. A. Ehrhart [et al.] // Clin. Chem. – 1973. – Vol. 19. № 2, – P. 228-234.
7. Pooranaperundevi M. Insulin resistance induced by a high-fructose diet potentiates thioacetamide

- hepatotoxicity / M. Pooranaperundevi, M. S. Sumiyabany, P. Viswanathan // Singapore Med. J. – 2010. – Vol. 51, № 5. – P. 390-397.
8. Reeves P. G. AIN-93 Purified Diets For Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet / P. G. Reeves, F. H. Nielsen, G. C. Fahey // J. Nutrition. – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 12-24.
 9. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus / V. Saini // World J. Diabetes. – 2010. – Vol. 1, № 3. – P. 68-75.
 10. Sorhede Winzell M. The High-Fat Diet – Fed Mouse. A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes / M. Sorhede Winzell, B. Ahren // Hepatology. – 2004. – Vol. 53, № 3. – P. 215-219.
 11. Targher G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients/ G. Targher, L. Bertolini, R. Padovani [et al.] // Diabetes Care. – 2007. – Vol. 30, № 12 – P. 1212-1218.
 12. Tetri L. H. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent / L. H. Tetri, M. Basaranoglu, E. M. Brunt [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2008. – Vol. 295, № 3. – P. 234-242.
 13. Tomita K. Free Cholesterol Accumulation in Hepatic Stellate Cells: Mechanism of Liver Fibrosis Aggravation Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice / K. Tomita, T. Teratani, T. Suzuki [et al.] // Hepatology. – 2014. – Vol. 59, № 4. – P. 155-169.
 14. Uehara Y. High-density lipoprotein and atherosclerosis: Roles of lipid transporters / Y. Uehara and K. Saku // World J. Cardiol. – 2014. – Vol. 6, № 10. – P. 1049-1059.

BIOCHEMICAL FEATURES OF HEPATIC STEATOSIS UNDER THE ABSENCE OF VITAMIN A STORES

I. O. SHMARAKOV, V. L. BORSCHOVETSKA, O. M. KOBYLYANSKA

Y. Fedkovich Chernivtsi National University

Institute of Biology, Chemistry and Natural Resources, Kotsyubynskyi str, 2, . Chernivtsi, 58012

e-mail: igor.shmarakov@gmail.com

The work is devoted to the research of the characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis and insulin resistance under the absence of vitamin A stores. To develop a vitamin A-deficient state transgenic mice were employed in the studies, which are unable to esterify retinol in the liver (as a result of lecithin: retinol acyltransferase gene knockout (Lrat^{-/-}), and therefore deprived of liver retinyl esters. Hepatic steatosis was induced by keeping the experimental animals on a high-fat diet enriched with trans fats and high fructose for 16 weeks. Assessment of hepatic steatosis was based on the quantitative determination of triacylglycerol and cholesterol in serum and liver tissue (with prior lipid fraction extraction by Folch method), qualitative (PAGE) and quantitative analysis of serum lipoproteins. Biochemical analysis of insulin resistance was based on the determination of fasting glucose levels, its clearance determined in a glucose tolerance test, and glycated hemoglobin levels. Our studies showed that keeping wild-type animals on a the high fat diet enriched with trans-fats and high fructose leads to the hepatic steatosis development, resulting in the increase of triacylglycerol and cholesterol levels in the liver and serum. The performed analysis confirmed increase of low-density lipoprotein level by 50%. At the same time an increase in total cholesterol level by 30 % was found, indicating the accumulation of its atherogenic form. The absence of endogenous retinoids stores in Lrat^{-/-} mice, as a result of lecithin: retinylacyltransferase gene knockout, provides resistance for the development of nonalcoholic fatty liver. In particular the studied parameters: the level of hepatic and serum triacylglycerol and cholesterol did not differ from the values characteristic for animals kept on a standard diet. Simultaneously, in knockout animals the appearance of signs of insulin resistance, the level of glycosylated hemoglobin and glucose tolerance did not differ from values characteristic for animals kept on a standard diet.

Keywords: hepatic steatosis, retinoid, insulin resistance, nonalcoholic fatty liver disease.

Одержано редколлегією 15. 12. 2014 р.