

---

---

# БІОЛОГІЯ

---

© Воейкова Д. О., Кондро М. М., Савчук О. М., Остапченко Л. І.

УДК 577.121.9+576.7+57.023

<sup>1</sup>Воейкова Д. О., <sup>2</sup>Кондро М. М., <sup>1</sup>Савчук О. М., <sup>1</sup>Остапченко Л. І.

## АНАЛІЗ ВМІСТУ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ ГЕПАТОЦИТІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ДІЄТ-ІНДУКОВАНОГО СТЕАТОГЕПАТОЗУ У ЩУРІВ

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

<sup>2</sup>Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького (м. Львів)

darynka1989@mail.ru

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ державної реєстрації 0104U009878) ННЦ «Інститут біології», Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

**Вступ.** Надмірне споживання багатой на вуглеводи та жири їжі, низька фізична активність поряд з порушенням самого режиму харчування та генетична схильність сприяють накопиченню не лише надлишкової ваги, а і розвитку інших патологій органів і систем [5,7,8]. Серед найбільш поширених є неалкогольна жирова хвороба печінки (НЖХП) або стеатогепатоз, розвиток якого спричинює зниження функціональної активності печінки, як найбільш метаболічно активного органу [5].

Наразі точний механізм розвитку цього патологічного процесу не встановлений. На сьогодні, висуваються лише гіпотези про двоетапність розвитку НЖХП, за якою значне підвищення рівня циркулюючих тригліцеридів на ранньому етапі слугує фактором запуску розвитку стеатогепатозу. Згодом результатом накопичення ліпідів в гепатоцитах стає балонна дистрофія, некроз та апоптоз, який стимулює розвиток запального процесу [3,13,14]. Запальний процес у гепатоцитах призводить до поглиблення патології, результатом чого стає порушення, а згодом і повна втрата, функціональної активності всього органу. Однією з ознак таких структурно-функціональних змін є кількісні та якісні зміни пулу білків, які з розвитком захворювання лише зростають. Найбільш небезпечним для хворих на НЖХП є останні етапи, які характеризуються розвитком фіброзу і повною або частковою втратою функціональної активності органу. Саме тому, дослідження розподілу білків цитозолу відповідно до молекулярної маси та зміни вмісту їх у фракціях може слугувати біомаркером ураження печінки. Ідентифікації екскреторних білків у фракціях та визначення динаміки змін рівня цих білків у сироватці крові дозволить використовувати зазначені показники для кращого розуміння, як механізмів розвитку стеатогепатозу, так і може служити діагностичним показником [5,8].

**Метою роботи** було дослідити зміни вмісту основних білкової фракції гепатоцитів щурів за умов розвитку стеатогепатозу під впливом висококалорійної дієти.

**Об'єкт і методи дослідження.** Досліди проводили на білих нелінійних щурах масою 180-200 г. Від початку експерименту щурів розділяли на контрольну і дослідну групи. Контрольну групу тварин утримували на стандартному раціоні, а дослідну на висококалорійній дієті #C11024 (Research Diets, New Brunswick, NJ) упродовж 18 тижнів. Щоденно проводився контроль споживання корму та раз на тиждень проводили зважування тварин обох груп. За контрольні точки для оцінки динаміки були вибрані 3, 6, 9, 12, 15 і 18 тижні. Попередні дослідження показали, що утримання на даній дієті призводить до розвитку стеатогепатозу [4].

Морфологічно та функціонально інтактні клітини печінки було отримано згідно модифікованого неферментативного методу виділення гепатоцитарної фракції клітин печінки за Петренко А. Ю. зі співав. [1]. Аналіз складу білків гепатоцитів здійснювали з використанням методу електрофоретичного розділення у поліакриламідному гелі (ПААГ). Електрофорез проводили за методом Laemmli у 10% ПААГ з додецилсульфатом натрію (ДДС-Na) [10].

Проведення експерименту здійснювалось із дотриманням принципів біоетики, що викладені у Хельсинській декларації Всесвітньої медичної асоціації про гуманне ставлення до тварин, а також згідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12.2009 р. № 1759-VI та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Для статистичної обробки параметричних даних був використаний t-критерій Ст'юдента для незалежних вибірок [2].

**Результати дослідження та їх обговорення.** У контрольній групі тварин білки гепатоцитів розділилися на 24 фракції, що узгоджується з літературними даними про кількісний розподіл білків гепатоци-

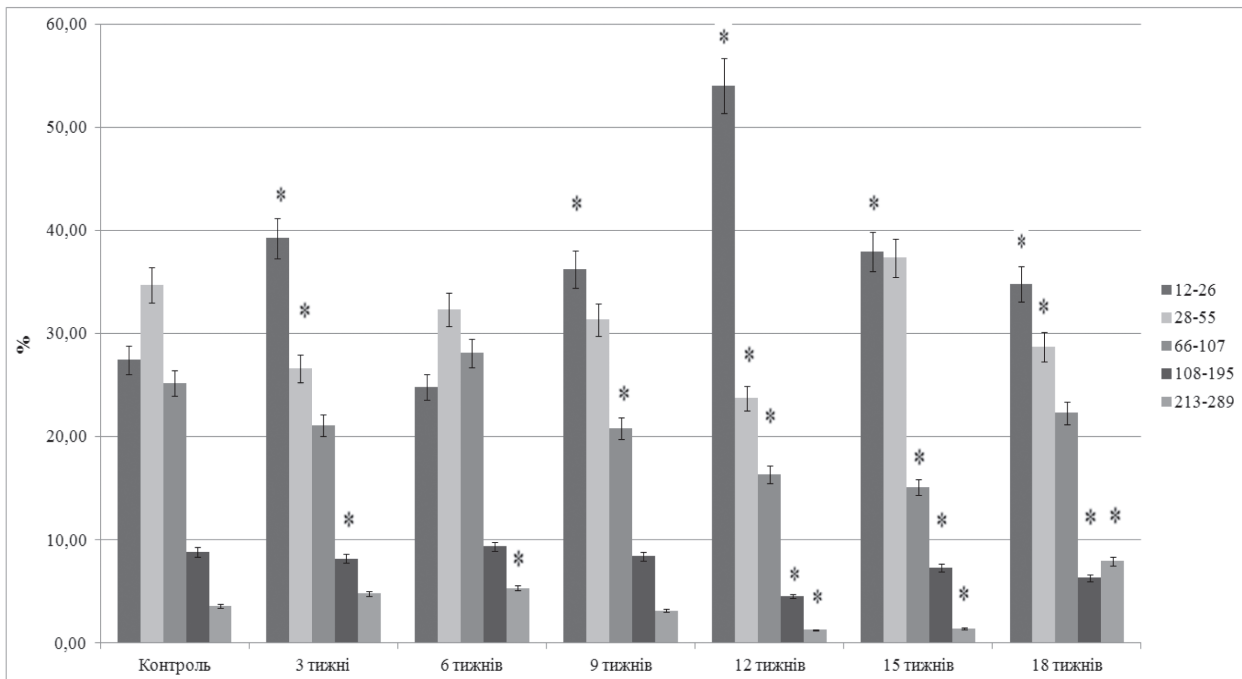


Рис. Вміст білкових фракцій у гомогенаті гепатоцитів щурів за умов розвитку дієт-індукованого стеатогепатозу ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Примітки: \* —  $p < 0,05$  (у порівнянні з контрольною групою).

тів щурів [6]. У нашій роботі фракції були об'єднані відповідно до молекулярної маси (м.м.) на низькомолекулярні 12-26 кДа, середньомолекулярні 28-55, 66-107 кДа і високомолекулярні 108-195 і 213-289 кДа (рис.). Встановлено, що за умов розвитку дієт-індукованого стеатогепатозу розподіл білків гепатоцитів змінювався. Так, на 15 і 18 тижні з'явилися три додаткові фракції, дві з яких з м.м. 49 і 78 кДа належать до середньомолекулярних і одна з м.м. 249 кДа – до високомолекулярних білків.

Починаючи з 3 тижня експерименту значно підвищився, а саме на 44% ( $p < 0,05$ ), вміст фракції низькомолекулярних білків (м.м. 12-26 кДа). Також, на 32% ( $p < 0,05$ ), підвищився вміст білків у фракції високомолекулярних білків (м.м. 213-289 кДа). Поряд з цим, вміст фракції середньомолекулярних білків (м.м. 66-107 кДа) знизився на 30% ( $p < 0,05$ ), а у інших фракціях достовірних змін не спостерігалось. На 6 тижні розвитку НЖХП підвищилась на 48% ( $p < 0,05$ ) лише фракція високомолекулярних білків. При цьому на 9 тижні експерименту на 31% ( $p < 0,05$ ) підвищився вміст низькомолекулярних білків і на 20% ( $p < 0,05$ ) знизився рівень середньомолекулярних білків. Вміст інших фракцій білків достовірно не змінювався.

Починаючи з 12 тижня розвитку патології спостерігались зміни вмісту у всіх білкових фракціях, а саме спостерігалось значне падіння вмісту у фракціях середньомолекулярних і високомолекулярних білків, поряд з підвищенням рівня низькомолекулярних білків. Так, рівень фракцій з м.м. 28-55, 66-107, 108-195 і 213-289 кДа знизився на 45% ( $p < 0,05$ ), 54% ( $p < 0,05$ ), 93% ( $p < 0,05$ ) і 182% ( $p < 0,05$ ), відповідно. При цьому вміст білку у фракції з м.м. 12-26 кДа підвищився на 96% ( $p < 0,05$ ). Такі зміни вмісту білку у фракціях цитозольних білків можуть вказу-

вати на перебіг деградаційних процесів, при яких утворюється велика кількість низькомолекулярних фрагментів у відповідь на розвиток стеатогепатозу [9,12,14].

У щурів, які знаходились на висококалорійній дієті протягом 15 тижнів, відбувалось аналогічне зниження рівня середньомолекулярних і високомолекулярних білків, при супутньому підвищенні низькомолекулярних. Так, вміст фракції з м.м. 66-107 кДа знизився на 66% ( $p < 0,05$ ), фракції з м.м. 108-195 кДа – на 21% ( $p < 0,05$ ), а фракції з м.м. 213-289 кДа – на 153% ( $p < 0,05$ ). Рівень білків у фракції з м.м. 12-26 кДа підвищився на 38% ( $p < 0,05$ ), що також є свідченням підвищення деградації білків цитозолі у відповідь на посилену акумуляцію тригліцеридів.

На 18 тижні розвитку стеатогепатозу спостерігається підвищення вмісту фракції низькомолекулярних білків з м.м. 12-26 кДа на 26% ( $p < 0,05$ ) і фракції високомолекулярних білків з м.м. 213-289 кДа на 119% ( $p < 0,05$ ). При цьому вміст середньомолекулярних білків продовжував знижуватись: фракція з м.м. 28-55 кДа – на 20% ( $p < 0,05$ ) і у фракції з м.м. 108-195 кДа на 39% ( $p < 0,05$ ). Встановлені зміни рівнів гепатоцитарних білків корелюють з раніше встановленими даними про розвиток стеатогепатозу за умов утримання щурів на висококалорійній дієті [6].

**Висновки.** Виявлено, що за умов розвитку дієт-індукованого стеатогепатозу, змінюється вміст білків гепатоцитів, а також спостерігається поява додаткових білкових фракцій на 15 і 18 тижнях. Встановлено, що вміст фракцій низькомолекулярних білків підвищується поряд зі зниженням вмісту середньо- і високомолекулярних білків, що корелює з попередньо встановленим ступенем розвитку стеатогепатозу зі значною акумуляцією у цитозолі гепатоцитів включень тригліцеридів.

**Перспективи подальших досліджень.** Встановлені нами дані показують пряму кореляцію між змінами пулу білків гепатоцитів та ступенем розвитку жирової інфільтрації печінки. Саме тому, наші подальші дослідження будуть спрямовані на ідентифі-

кацію білків, які належать до цих фракцій відповідно до молекулярної маси. Це дозволить з'ясувати, як деякі внутрішньоклітинні механізми розвитку стеатогепатозу, так і дозволить розробити ефективні схеми лікування даного захворювання.

### Література

1. Петренко А.Ю. Выделение гепатоцитов крыс не ферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности / А.Ю. Петренко, А.Н. Сукач, А.Д. Росляков // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 9. – С. 1647-1650.
2. Плохинский Н.А. Методические консультации по биометрии / Н.А. Плохинский // Проблемы современной биометрии. – М.: МГУ, 1981. – С. 30-50.
3. Angulo P. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease / P. Angulo, D.E. Kleiner, S. Dam-Larsen [et al.] // Gastroenterology. – 2015. – Vol. 149. – P. 389-397.
4. Bodnar P. Diagnosis of experimental steatohepatitis using ultrasound shearwave elastography / P. Bodnar, O. Dynnyk, G. Myhalchysyn [et al.] // Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. Editorial Article. – Lublin. – 2013. – Vol. 26 (1). – P. 109-113.
5. Day C.P. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): where are we now and where are we going? / C.P. Day // Gut. – 2002. – Vol. 50. – P. 585-588.
6. Fountoulakis M. Proteomic analysis of the rat liver / M. Fountoulakis, L. Suter // Journal of Chromatography B. – 2002. – Vol. 782. – P. 197-218.
7. Gusdon A.M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria – centric perspective / A.M. Gusdon, K. Song, S. Qu // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1-20.
8. James O. Steatohepatitis: a tale of two «hits»? / O. James, C. Day // Gastroenterology. – 1998. – Vol. 114. – P. 842-845.
9. Kirpich I. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease / I. Kirpich, L. Gobejshvili, M. Homme [et al.] // The Journal of Nutritional Biochemistry. – 2011. – Vol. 22 (1). – P. 1-19.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – P. 680-685.
11. Li L. Proteomic analysis of liver mitochondria from rats with nonalcoholic steatohepatitis / L. Li, D.Z. Lu, Y.M. Li [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2014. – Vol. 20 (16). – P. 4778-4786.
12. Okediran B.S. Alterations in the lipid profile and liver enzymes of rats treated with monosodium glutamate / B.S. Okediran, A.E. Olurotimi, S.A. Rahman [et al.] // Sokoto Journal of Veterinary Science. – 2014. – Vol. 12, № 3. – P. 42-46.
13. Rolo A.P. Role of oxidative stress in pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis / A.P. Rolo, J.S. Teodoro, C.M. Palmeira // Free Radical Biology and Medicine. – 2012. – Vol 52. – P. 59-69.
14. Singh S. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies / S. Singh, A.M. Allen, Z. Wang [et al.] // Clinical Gastroenterology and Hepatology. – 2015. – Vol. 13 (4). – P. 643-654.

**УДК 577.121.9+576.7+57.023**

#### **АНАЛІЗ ВМІСТУ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ ГЕПАТОЦИТІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ДІЄТ-ІНДУКОВАНОГО СТЕАТОГЕПАТОЗУ У ЩУРІВ**

**Воейкова Д. О., Кондро М. М., Савчук О. М., Остапченко Л. І.**

**Резюме.** Охарактеризовано низько-, середньо- та високомолекулярні гепатоцитарні фракції білків за умов розвитку дієт-індукованого стеатогепатозу у щурів. Білкові фракції були розділені за допомогою електрофорезу за методом Laemmli у градієнті ПААГ з додецилсульфатом натрію. Спостерігалось значне підвищення вмісту фракції низькомолекулярних білків починаючи з 9 тижня утримання на ВКД, що супроводжувалось значним зниженням фракції високомолекулярних білків. Отримані дані свідчать про порушення структурно-функціонального стану гепатоцитів за умов розвитку дієт-індукованого стеатогепатозу.

**Ключові слова:** висококалорійна дієта, білкові фракції, стеатогепатоз.

**УДК 577.121.9+576.7+57.023**

#### **АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ГЕПАТОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ДИЕТ-ИНДУЦИРОВАННОГО СТЕАТОГЕПАТОЗА У КРЫС**

**Воейкова Д. А., Кондро М. М., Савчук А. Н., Остапченко Л. И.**

**Резюме.** Охарактеризованы низко-, средне- и высокомолекулярные гепатоцитарные фракции белков при развитии диет-индуцированного стеатогепатоза у крыс. Белковые фракции были разделены с помощью электрофореза по методу Laemmli в градиенте ПААГ с использованием додецилсульфата натрия. В условиях диет-индуцированного стеатогепатоза наблюдалось значительное повышение содержания фракции низкомолекулярных белков, начиная с 9 недели содержания на ВКД, что сопровождалось параллельным снижением фракции высокомолекулярных белков. Полученные данные свидетельствуют о нарушении структурно-функционального состояния гепатоцитов в условиях развития диет-индуцированного стеатогепатоза.

**Ключевые слова:** высококалорийная диета, белковые фракции, стеатогепатоз.

UDC 577.121.9+576.7+57.023

**ANALYSIS OF HEPATOCYTES PROTEIN FRACTIONS UNDER DIET-INDUCED STEATOHEPATOSIS IN RATS**

**Voieikova D. O., Kondro M. M., Savchuk O. M., Ostapchenko L. I.**

**Abstract.** Excessive intake of carbohydrates and fats, low physical activity, violations of diet and genetic predisposition contribute not only obesity, but also other pathologies of organs and systems. The most common manifestation of basal metabolism disorders is nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) or steatohepatosis which results in the decrease of functional activity in the liver. Today, NAFLD is characterized as a two-step process which begins with a significant increase of serum triglycerides. The result of lipid accumulation in hepatocytes is balloon degeneration, necrosis, and apoptosis which, in turn, causes the development of inflammation. Inflammation in hepatocytes leads to the deepening of pathology, resulting in the development of pathological changes and later a full loss of functional activity of the whole liver. One indication of these structural and functional changes is qualitative and quantitative changes in protein pool, the appearance of which enhances the development of steatohepatosis. Therefore, study of cytosol proteins distribution according to molecular weight and content changes in these fractions can serve as a biomarker of liver damage. Identification of excretory proteins in fractions and determination of dynamic changes of these proteins in serum will allow using these parameters for better understanding the mechanisms of steatohepatosis and can serve as a diagnostic measure.

*The aim of this study* was to investigate the changes in protein content of the main fractions of rat hepatocytes under conditions of steatohepatosis caused by high-caloric diet.

Experiments were performed on white nonlinear rats weighing 180-200 g. The control group of animals was kept on a standard diet and the experimental group was kept on the high-caloric diet # C11024 (Research Diets, New Brunswick, NJ) for 18 weeks. Morphologically and functionally intact hepatocytes were received by a modified non-enzymatic method (Petrenko A. et al.) of the hepatocytes fractions allocation. Electrophoresis was performed by the method of Laemmli et al. in 10% PAGE of sodium dodecyl sulfate (SDS-Na).

In the control group of animal's hepatocytes proteins were divided into 24 fractions, which is conformed with the literature about quantitative distribution of proteins in rat hepatocytes. Thus, starting 3 weeks of keeping on high-caloric diet, there was increase content of low (12-26 kDa) and high (213-289 kDa) protein, while medium (66-107 kDa) proteins was decrease. Other factions didn't show any significant changes. After 6 weeks of the experiment, 213-289 kDa fraction increased by 48% ( $p < 0.05$ ), with no significant changes in content from other factions. At the same time, low molecular weight proteins increased by 31% ( $p < 0.05$ ) at 9 weeks, and middle molecular weight protein decreased by 20% ( $p < 0.05$ ). The content of other protein fractions did not significantly change.

After 12 weeks of the pathology development, a significant decline of protein content in fractions of middle and high molecular weight proteins was observed, along with the decreased levels of the low molecular weight proteins. Such changes of protein content may indicate the degradation processes development when a large quantities of low molecular weight fragments produce in response to the development of steatohepatosis. At 15 weeks, the experimental group of rats showed a similar decline in middle and high molecular weight proteins but it was accompanied by the increase of low molecular weight proteins. After 18 weeks of keeping high-caloric diet, low and high proteins were increased, along with the decrease of medium molecular proteins.

The changes of hepatocytes protein content were observed under the conditions of the diet-induced steatohepatosis development. It was found out, that the content of low molecular weight proteins fractions increased along with the reduction of medium- and of high protein, which correlates with the level of the development of the preliminary stated steatohepatosis with significant accumulation of triglycerides particles in the cytosol hepatocytes.

**Keywords:** high caloric diet, protein fraction, steatohepatosis.

*Рецензент – проф. Непорада К. С.*

*Стаття надійшла 10.10.2016 року*