

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА НА СКЛАД БІЛКІВ ГЕПАТОЦИТІВ ЗА
УМОВ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОГО ОЖИРІННЯ

М.М. Кондро¹, Д.О. Воейкова², Л.І. Степанова²

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,
Львів, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Зв'язок з авторами: Кондро Маряна МIRONІВНА, доцент кафедри нормальної фізіології
Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького
тел. +38 0677144090; E-mail: marianakondro@gmail.com

Охарактеризовано низько-, середньо- та високомолекулярні фракції гепатоцитарних білків за умов розвитку глутамат-індукованого ожиріння та корекції мультипробіотиком «Симбітер ацидофільний» концентрований. Білкові фракції були розділені за допомогою диск-електрофорезу за методом Laemmli у градієнті ПААГ з додецилсульфатом натрію. За умов глутамат-індукованого ожиріння пул білків гепатоциту змінюється, а саме – зменшується вміст високомолекулярних білків на фоні підвищення вмісту низькомолекулярних. Характер змін у пулі гепатоцитарних білків узгоджується з раніше встановленими даними про зміни вмісту білків у гепатоцитах під впливом висококалорійної дієти багатой жири і вуглеводи. За умов корекції мультипробіотиком було відмічено схожі зміни у пулі білків гепатоциту, але у порівнянні з глутамат-індукованим ожирінням вміст низькомолекулярних білків був нижчим.

Ключові слова: глутамат-індуковане ожиріння, білкові фракції, гепатоцити.

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКА НА СОСТАВ БЕЛКОВ
ГЕПАТОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО
ОЖИРЕНИЯ

М.М. Кондро ¹, Д.А. Воейкова ², Л.И. Степанова ²

¹Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого,
Львов, Украина

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина

Охарактеризованы низко-, средне- и высокомолекулярные фракции гепатоцитарных белков в условиях развития глутамат-индуцированного ожирения и коррекции мультипробіотиком. Белковые фракции были разделены с помощью диск-электрофореза по методу Laemmli в градиенте ПААГ с додецилсульфатом натрия. В

умовлях глутамат-індуцированого ожирення пул белков гепатоцита мєняєтєся, а іменнє – умєньшєєтєся сєдєржєнє вєсокємєкулєярнєх белков нє фєнє пєвєщєнєя сєдєржєнєя нєзкємєкулєярнєх. Харєктер ізмєнєнєй в пулє гепатоцитарнєх белков сєглєсуєтєся с рєнєє устанєвлєннєми дєннєми єб ізмєнєнєях сєдєржєнєя белков в гепатоцитах пєд влєянєм вєсєкєкалєрєйноє дєєтє (ВКД) бєгатєй жирєми і углєводєми. В умєвєях коррєкцєє мультєпрєбєєтєєком бєлєє єтмєчєнє сєжєє ізмєнєнєє в пулє белков гепатоцита, нє пє сєрєвнєнєю с глутамєтє-індуцированнєм ожирєнєм сєдєржєнє нєзкємєкулєярнєх белков бєлє нєжє.

Ключєвєє слєвє: глутамєт-індуцированєє ожирєнє, белковєє фрєкцєє, гепатоцитєє.

MULTIPROBIOTIC INFLUENCE ON PROTEIN COMPOSITION OF HEPATOCYTES UNDER CONDITIONS OF GLUTAMATE-INDUCED OBESITY

M.M. Kondro¹, D.O. Voieikova², L.I. Stepanova²

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

²Taras Shevchenko National university of Kyiv, Ukraine

We have characterized low-, medium- and high-molecular protein fractions of hepatocytes under conditions of glutamate-induced obesity development and correction of multiprobiotic. Protein fractions were separated by electrophoresis using a 10 % Laemmli SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate. Protein hepatocytes change in glutamate-induced obesity: high-molecular proteins decrease, and low-molecular proteins increase. Changes in hepatocyte proteins are consistent with previously established changes in protein content of hepatocytes under the influence of high-calorie diet (HCD) rich in fats and carbohydrates. We have noticed similar changes in protein of hepatocytes due to correction with multiprobiotic, but compared with glutamate-induced obesity, low proteins were lower.

Key words: glutamate-induced obesity, protein fractions, hepatocytes.

Встєп. Ожирєннє є єднєм з глобєлнєх захворєвєнєх сучєснєє єєвєлєзєцєє чєрєз знєчнє пєширєннє фєкєтєрєв, яєє єго сєрєчєнєяють, тєк і кєлькєстє хворєх у сєвєтє [1]. «Вєстєрнєзєцєя» харчєвєннєя, хєєтєчнєє рєжєм прєєємєу їжє, єбмєжєннєя фєзєчнєє активнєстє тє шєрєкє вєкєрєєстєннєя у прєєдукєх харчєвєх дєбєвєк, тєкєх

яєє L-глутамєт нєтрєє (ГН), яєє вєлєєвєють нє єбмєн рєчєвєн, прєєзвєдєють дє рєзвєтєку «пєндємєє» єлємєнтєрнєє єбє дєєтєндуєкєвєнєє ожирєннєя [2]. В умєвєях ожирєннєя єбдємєнєлнєєнєє тєпєу збєльщєннєя мєсє вєєсєрєлнєєнєє жєєру прєєзвєдєєтє дє нєдхєджєннєя в крєвєнєєснєє рєєслє і дєлє у пєчєєнку нєдлєєщєкєвєє кєлькєстє вєльнєх жєєр-

них кислот, які викликають ряд порушень вуглеводного і жирового обміну. Серед них найбільш небезпечними є розвиток інсулінорезистентності і стеатогепатозу, які негативно впливають на функціонування печінки, як найбільш метаболічно активного органа [3]. Паралельний розвиток запальних процесів та окисного стресу веде до посилення патологічних процесів, які пов'язані з кількісними і якісними змінами пулу білків [4]. Було показано, що розвиток діет-індукованого ожиріння та стеатогепатозу впливає на склад та розподіл білків у цитоплазмі гепатоцитів змінюючи їх розподіл. Це вказує на те, що визначення змін у пулі гепатоцитарних білків може слугувати додатковим маркером ступеня ліпідної інфільтрації та стеатогепатозу [5]. Проте дані щодо змін у пулі білків гепатоцитів за умов розвитку глутамат-індукованого ожиріння відсутні.

Не менш важливою проблемою сьогодення є пошук препаратів, які впливають на різні ланки патогенезу асоційованого з ожирінням стеатогепатозу. Проте, мало уваги приділяється пошуку засобів профілактики ожиріння. В сучасній науковій літературі велика кількість робіт підтверджує позитивний вплив пробіотиків на організм людини. Питання про ефект пробіотиків на метаболізм жиру і ожиріння активно дискутується в науковій літературі. Було висунуте припущення, що кишкова мікробіота як фактор оточуючого середовища включена в контроль маси тіла і гомеостаз енергії [6, 7, 8, 9, 10].

При аналізі бактеріального генома (мікробіома) у мишей з генетично-детермінованим ожирінням, виявлено різке зниження в кишечнику частки бактерій з групи Bacteroidetes в порівнянні із звичайними мишами, тоді як частка бактерій з групи Firmicutes навпаки підвищена [8]. Схожі зміни були виявлені й у людей: при обстеженні пацієнтів з ожирінням виявлено, що в їх кишечнику менше Bacteroidetes і більше Firmicutes в порівнянні з контрольною групою худих людей. Потім пацієнтам була запропонована низькокалорійна дієта з обмеженням жирів або вуглеводів, а дослідники протягом року стежили за змінами їх кишкової флори. Виявилось, що дієта призводить до значного зниження кількості Firmicutes і зростанню кількості Bacteroidetes, причому ці зміни корелювали зі ступенем зниження маси тіла [8]. Деякі роботи стосуються позитивного ефекту використання пробіотиків в умовах експериментального ожиріння [11]. Раніше нами було показано, що періодичне введення щурям з 1-го місяця життя мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» концентрований, запобігало розвитку стеатогепатозу та ожиріння, викликаних введенням L-глутамату натрію (ГН) в ранньому неонатальному періоді [12].

Саме тому, метою роботи стало визначення вмісту білків гомогенату гепатоциту у щурів з глутамат-індукованим ожирінням та за умов корекції мультипробіотиком.

Матеріали і методи. Експерименти проведені з дотриманням міжна-

родних рекомендацій, затверджених Європейською конвенцією, щодо медико-біологічних досліджень з використанням лабораторних тварин та загальним етичним принципам роботи з тваринами, затверджених Першим національним конгресом з біоетики України (вересень 2001). Протокол затверджений етичним комітетом Київського національного університету (протокол № 318/2013). Щурів утримували в контрольованих умовах віварію при температурі $22 \pm 3^\circ \text{C}$, постійному режимі освітлення (12 годин – світла, 12 годин – темнота) і відносній вологості ($60 \pm 5\%$). Тварини одержували стандартний корм «Purina rodent chow» (жир – 20,6%, білок – 32,4%, вуглеводи – 47%) і воду *ad libitum*.

Дослідження проведені на 30 білих нелінійних щурах самцях, народжених від декількох самок з різницею в 1-3 дні. Новонароджені щурята рандомізовано були поділені на 3 групи по 10 тварин в кожній. Перша група слугувала контролем: їм на 2, 4, 6, 8 і 10 дні після народження підшкірно вводили фізіологічний розчин у дозі 8 мкл/г. Щурам другої і третьої груп на 2, 4, 6, 8 і 10 дні після народження підшкірно вводили L-глутамат натрію (ГН) у дозі 4 мг/кг, розчиненого у фізіологічному розчині [13]. Об'єм введеного розчину ГН складав 8 мкл/г ваги щурят. Починаючи з 1 місяця від дня народження та упродовж наступних трьох місяців щурам першої (контрольної) і другої (після неонатального введення ГН) груп перорально вводили воду з розрахунку 0,25 мл/100 г. Щурам третьої групи (після неонатального введен-

ня ГН), починаючи з 1 місяця від дня народження та упродовж наступних трьох місяців, перорально вводили мультипробіотик «Симбітер ацидофільний» концентрований (Науково-виробнича компанія «О.Д. Пролісок») в дозі 140 мг/кг, розчиненого у фізіологічному розчині, об'єм якого складав 0,25 мл/100 г.

Основною відмінністю мультипробіотиків групи «Симбітер», до якої входить «Симбітер ацидофільний» концентрований, від інших пробіотичних препаратів є те, що він являє собою живу біомасу симбіозу 14 штамів біфідобактерій, лактобацил, лактококів та пропіоновокислих бактерій. В 10 мл кожного препарату міститься не менше 10^9 живих клітин, які, як відомо, вирізняються полікомпонентністю, широким спектром видів біологічної активності, біоплівковою формою організації і мутуалістичними міжпопуляційними відношеннями [14].

Для отримання морфологічно та функціонально інтактних клітин печінки була використана модифікована нами методика неферментативного отримання гомогенату гепатоцитів за Петренко А.Ю. і співав. [15].

Аналіз складу білків гепатоцитів здійснювали з використанням методу диск-електрофорезу за методом Laemmli у 10% ПААГ з додецилсульфатом натрію (ДДС-Na) [16].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, згідно яким одержані дані перевірялись на нормальність розподілу за Шапіро-Вілка. Так як резуль-

тати були нормально розподілені, для статистичної обробки був використаний t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок.

Результати та їх обговорення:

У щурів контрольної групи білки гомогенату гепатоцитів за молекулярною масою розділились на 13 фракцій, що узгоджується з літературними даними про кількісний розподіл білків цитозолу у гепатоцитах щурів [17]. За загальноприйнятим поділом білків на групи за молекулярною масою, ми поділили фракції відповідно до молекулярної маси (м.м.) на високомолекулярні (100-235 кДа), середньомолекулярні (65-96 і 30-59 кДа) та низькомолекулярні (5-29 кДа) для всіх досліджуваних груп. У контрольній групі вміст білків з м.м. 100-235 кДа складав $53,46 \pm 2,67$ % від усього пулу білків, з м.м. 65-96 кДа – $15,18 \pm 0,76$ %, з м.м. 30-59 кДа – $25,92 \pm 1,29$ % і з м.м. 5-29 кДа – $5,42 \pm 0,27$ %.

У групі щурів, яким в ранньому неонатальному періоді, вводили ГН, кількість фракцій, на які розділилися гепатоцитарні білки зросла до 17. При цьому відносний вміст високомолекулярних білків м.м. 100-235 кДа і білків

із середньою молекулярною масою 65-96 кДа зменшився у 2,9 разів ($p < 0,05$) та у 8,2 рази ($p < 0,05$), відповідно, у порівнянні з контролем. Це супроводжувалось значним зростанням відносного вмісту низькомолекулярних білків, а саме з молекулярною масою 5-29 кДа – у 4,4 рази ($p < 0,05$) та білків з молекулярною масою 30-59 кДа – у 2,2 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем (табл. 1). Спостерігалась поява білків з м.м. 113, 118, 135, 141, 147 і 175 кДа, яких не було в контролі.

У щурів, яким в ранньому неонатальному періоді вводили ГН та упродовж 3 місяців (1-4 місяці життя) періодично вводили мультипробіотик «Симбітер ацидофільний» концентрований, білки гомогенату гепатоцитів за молекулярною масою розділились на 13 фракцій, що супроводжувалось перерозподілом відносного вмісту білків за молекулярною масою. Відносний вміст високомолекулярних білків з м.м. 100-235 кДа зріс у 1,7 рази ($p < 0,01$), а відносний вміст середньомолекулярних білків з м.м. 65-96 кДа зріс у 6,5 разів ($p < 0,001$) у порівнянні з щурами, яким в ранньому неонатальному віці вводили ГН, а потім – фізіологічний розчин.

Таблиця 1

Розподіл білків за молекулярною масою в гепатоцитах щурів самців

Групи	Контроль, %% n=10	Глутамат натрію+фізіологічний розчин, %% n=10	Глутамат натрію+Симбітер, %% n=10
100-235 кДа	$53,46 \pm 2,67$	$18,28 \pm 0,91^*$	$30,33 \pm 0,52^{*}/\#\#$
65-96 кДа	$15,18 \pm 0,76$	$1,85 \pm 0,09^*$	$11,98 \pm 0,09^*/\#\#\#$
30-59 кДа	$25,92 \pm 1,29$	$57,93 \pm 2,89^*$	$43,45 \pm 1,19^*/\#$
5-29 кДа	$5,42 \pm 0,27$	$23,88 \pm 1,19^*$	$14,24 \pm 3,19^{**}/\#\#\#$

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ - у порівнянні з контрольною групою;

- $p < 0,05$ - у порівнянні з групою щурів із глутамат-індукованим стеатогепатозом.

По відношенню до контрольної групи щурів відносний вміст високомолекулярних і середньомолекулярних білків залишався зниженим у 1,8 ($p < 0,05$) та 1,3 ($p < 0,05$) рази, відповідно.

У щурів, яким в ранньому неонатальному періоді вводили ГН та упродовж 3 місяців (1-4 місяці життя) періодично вводили мультипробіотик «Симбітер ацидофільний» концентрований, вміст середньомолекулярних білків м.м. 30-59 кДа і низькомолекулярних м.м. 5-29 кДа зменшувались у порівнянні зі щурами, яким в ранньому неонатальному віці вводили ГН, а потім – фізіологічний розчин, у 1,3 ($p < 0,05$) та в 1,7 ($p < 0,05$) рази, відповідно, залишаючись збільшеними у порівнянні з контролем у 1,7 ($p < 0,05$) та 2,6 ($p < 0,01$) рази.

Отримані результати щодо змін пулу білків гепатоцитів узгоджуються з попередньо отриманими даними про пул білків у гепатоцитах щурів за умов утримання на висококалорійній дієті (ВКД), з високим вмістом як жирів, так і вуглеводів [5]. Схоже зменшення вмісту високомолекулярних білків, поряд із значним підвищенням фракції низькомолекулярних білків спостерігалось на 12 тижні утримання на змінній дієті. Подальше утримання на ВКД зберігало тенденцію до змін, які ми спостерігаємо при моделюванні ожиріння введенням ГН. Лі-

тературні дані вказують на зв'язок між змінами у пулі білків гепатоцитів і розвитком асоційованого зі стеатозом ожирінням за умов утримання на ВКД різних типів. Саме тому, ми припускаємо, що встановлені нами зміни вмісту білків гепатоцитів відбуваються через розвиток стеатозу, який супроводжує глутамат-індуковане ожиріння [12].

Наші попередні дані вказують, що застосування мультипробіотика знижує кількість ліпідних включень у цитоплазмі гепатоцитів, пригнічує розвиток запальних і апоптичних явищ у печінці щурів за періодичного введення та зменшує ступінь накопичення ліпідів клітинами печінки [12], що веде до позитивного впливу мультипробіотика на вміст білків у гепатоцитах у порівнянні з групою, де розвивався стеатогепатоз під впливом ГН.

Висновки. Виявлено, що за умов глутамат-індукованого ожиріння, що супроводжується стеатогепатозом, пул білків гепатоцитів змінюється, а саме: зменшується вміст високомолекулярних білків на фоні підвищення вмісту низькомолекулярних. За умов корекції мультипробіотиком були відмічені схожі зміни у пулі білків гепатоцитів, але у порівнянні з глутамат-індукованим ожирінням вміст низькомолекулярних білків був нижчим, а високомолекулярних – вищим.

Література

1. Pereira-Lancha L.O. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models / L.O. Pereira-Lancha, P.L. Campos-Ferraz, A.H. Lancha // Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targeted and Therapy. – 2015. – Vol. 5. – P. 75-87.
2. Day C.P. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): where are we now and where are we going? // Gut. – 2002. – Vol. 50. – P. 585-588.

3. 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. 1 – P. 1–20.
4. Kirpich I. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease / I. Kirpich, L. Gobejishvili, M. Homme et al. // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2011. – Vol. 22 (1). – P. 1–19.
5. Kondro M. Metabolic profile and morpho-functional state of the liver in rats with glutamate-induced obesity / M. Kondro, G. Mykhalchyshyn, P. Bodnar, N. Kobylak, T. Falalyeyeva // *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. – 2013. – Vol. 26(4). – P. 379–381.
6. Backhed F. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage / F. Backhed, H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh et al. // *Proc. Natl. Acad. Scin.* – 2004. – U S A. – Vol. 101. – P. 15718–15723.
7. Backhed F. Host-bacterial mutualism in the human intestine / F. Backhed, R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson, J.I. Gordon // *Science*. – 2005. – Vol. 307. – P. 1915–1920.
8. Ley R. E. Obesity alters gut microbial ecology / R. E. Ley, F. Backhed, P. Turnbaugh, C.A. Lozupone, R.D. Knight et al. // *Proc. Natl. Acad. Scin.* – U S A. – 2005. – Vol. 102. – P. 11070–11075.
9. Turnbaugh P.J. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome / P.J. Turnbaugh, F. Backhed, L. Fulton, J.I. Gordon // *Cell. Host. Microbe*. – 2008. – Vol. 3. – P. 213–223.
10. Turnbaugh P.J. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest / P.J. Turnbaugh, R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini, E.R. Mardis et al. // *Nature*. – 2006. – Vol. 444 – P. 1027–1031.
11. Borhers A.T. Probiotics and immunity / A. T. Borhers, C. Selmi, F. J. Meyers et al. // *J. Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 44. – P. 26–46.
12. Savcheniuk O. Short-term periodic consumption of multiprobiotic from childhood improves insulin sensitivity, prevents development of non-alcoholic fatty liver disease and adiposity in adult rats with glutamate-induced obesity / O. Savcheniuk, N. Kobylak, M. Kondro, O. Virchenko, T. Falalyeyeva, T. Beregova // *BMC Complementary and Alternative Medicine Research*. – 2014. – Vol. 14. – P. 247. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-247>
13. Sanabria E.R. Deficit in hippocampal long-term potentiation in monosodium glutamate-treated rats / E.R. Sanabria, M.F. Pereira, M.S. Dolnikoff, I.S. Andrade, A.T. Ferreira, E.A. Cavalheiro, M.J. Fernandes // *Brain. Res. Bull.* – 2002. – Vol. 59. – P. 47–51.
14. Янковский Д.С., Ширококов В.П., Дымент Г.С. Интегральная роль микрофлоры в физиологии человека. – К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2011. – 169 с.
15. 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.
16. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – P. 680–685.
17. Fountoulakis M. Proteomic analysis of the rat liver / M. Fountoulakis, L. Suter // *Journal of Chromatography B*. – 2002. – Vol. 782. – P. 197–218.
18. Воейкова Д.О. Аналіз вмісту білкових фракцій гепатоцитів за умов моделювання дієт-індукованого стеатогепатозу у щурів / Д.О. Воейкова, М.М. Кондро, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2016. – №4 (133). – С. 73–76.