

**ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ЦИТОЗОЛЯ
ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

Шелест Дарина Александровна

аспирант кафедры биохимии

Киевского национального университета имени Тараса Шевченко,

Украина, г. Киев

E-mail: darynka1989@mail.ru

Савчук Алексей Николаевич

д-р биол. наук, доцент

Киевского национального университета имени Тараса Шевченко,

Украина, г. Киев

Остапченко Людмила Ивановна

д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии,

директор УНЦ «Институт биологии»

Киевского национального университета имени Тараса Шевченко,

Украина, г. Киев

E-mail: decanat_bf@univ.kiev.ua

Кондро Марьяна Мироновна

*канд. мед. наук, доцент Львовского национального
медицинского университета имени Данила Галицкого,*

Украина, г. Львов

E-mail: kondro78@mail.ru

CHARACTERIZATION OF CYTOSOLIC PROTEIN FRACTIONS IN RAT HEPATOCYTES UNDER EXPERIMENTAL DEVELOPMENT OF THE METABOLIC SYNDROME

Shelest Daryna

*Postgraduate student, department of biochemistry,
Taras Shevchenko National university of Kyiv,
Ukraine, Kyiv*

Savchuk Oleksiy

*Doctor of Biological Sciences, Associate Professor,
Taras Shevchenko National university of Kyiv,
Ukraine, Kyiv*

Ostapchenko Liudmyla

*Doctor of Biological Sciences, Professor,
Head of the department of Biochemistry, Director of Education and Science Center
“Institute of Biology”, Taras Shevchenko National university of Kyiv,
Ukraine, Kyiv*

Kondro Maryana

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor,
Danila Galitsky Lviv National Medical University,
Ukraine, Lviv*

АННОТАЦИЯ

Охарактеризованы фракции низко-, средне- и высокомолекулярных белков цитозоля гепатоцитов в условиях развития диет-индуцированного метаболического синдрома у крыс. Белковые фракции были разделены с помощью электрофореза методом Laemmli в 10 % ПААГ с использованием додецилсульфата натрия. В условиях экспериментального развития метаболического синдрома состав белковых фракций изменялся только количественно, что может быть связано с развитием стеатоза.

ABSTRACT

We have characterized the fraction of low, medium and high molecular weight proteins in the cytosol of rat hepatocytes in terms of diet-induced metabolic syndrome. Protein fractions were separated by electrophoresis using a 10 % Laemmli SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate. The composition of the protein fractions

changed only quantitatively in experimental development of the metabolic syndrome, which may be associated with the development of steatosis.

Ключевые слова: метаболический синдром, белки цитозоля, стеатоз.

Keywords: metabolic syndrome, proteins in the cytosol, steatosis.

Вступление

Метаболический синдром (МС) включает такие патологические состояния, как висцеральное абдоминальное ожирение, инсулинорезистентность, дислипидемию, гипертонию и печёночный стеатоз, которые, в свою очередь, вызывают развитие диабета 2-го типа, гипертонической болезни и онкологических заболеваний [4]. Чрезмерное употребление большого количества жиров и углеводов, низкая физическая активность, стрессы, плохое состояние окружающей среды, генетическая предрасположенность — все это может быть причиной развития МС. На сегодняшний день точно неизвестно, каким образом взаимодействие между этими факторами вызывает развитие МС. При этом очень часто диагноз «метаболический синдром» ставится тогда, когда изменения обмена веществ приобретают характер постоянных и глубоких нарушений всех процессов в организме и тяжело поддаются коррекции [3; 4].

Ранее нами было показано, что в условиях развития МС, вызванного высококалорийной диетой, у крыс возникает неалкогольная жировая болезнь печени (НЖХП) [8]. Несмотря на большое количество работ, посвящённых НЖХП, механизмы её развития до конца не выяснены [7]. Существует несколько возможных гипотез, которые рассматривают поэтапное развитие заболевания [6]. На начальных этапах развития заболевания происходит накопление избытка липидов в гепатоцитах, что в дальнейшем вызывает нарушение метаболических процессов и впоследствии приводит к развитию воспаления, массовой клеточной гибели и последующему фиброзу, которые служат гистологическими маркерами неалкогольного стеатогепатита. Эти процессы связаны с развитием оксидативного стресса,

инсулинорезистентности, митохондриальной дисфункции и прекращения регуляции сигнала от цитокинов. Развитие воспалительного процесса в гепатоцитах ведёт к их повреждению и нарушению их функциональной активности, что связано с количественными и качественными изменениями пула белков.

Исследование распределения цитозольных белков в соответствии с молекулярной массой и изменений их содержания во фракциях может служить биомаркером поражения печени. Идентификация экскреторных белков во фракциях и определение динамики изменений уровня этих белков в сыворотке крови позволит использовать вышеперечисленные показатели для диагностирования стеатоза и сопутствующего МС.

Цель работы — исследовать изменения содержания белков во фракциях цитозоля гепатоцитов крыс в условиях развития метаболического синдрома, под влиянием высококалорийной диеты.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых нелинейных крысах массой 180—200 г. В начале эксперимента крыс разделяли на контрольную и опытную группы. Контрольную группу животных содержали на стандартном рационе, а опытную — на высококалорийной диете № C11024 (Research Diets, New Brunswick, NJ) в течение 18 недель. Ежедневно проводился контроль потребления корма, и раз в неделю проводили взвешивание животных обеих групп. Контрольными точками для оценки динамики были выбраны: 3, 6, 9, 12, 15 и 18 недели.

Морфологически и функционально интактные клетки печени были получены согласно модифицированного неферментативного метода А.Ю. Петренко с соавт., для выделения гепатоцитарной фракции клеток печени [1]. Анализ состава белков цитозоля гепатоцитов осуществляли с использованием метода электрофоретического разделения в полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофорез проводили по методу Laemmli в 10 % ПААГ с додецилсульфатом натрия (ДДС-Na) [9].

Статистическую обработку результатов исследования проводили общепринятыми методами вариационной статистики. Для статистической обработки параметрических данных был использован t-критерий Стьюдента для независимых выборок [2].

Результаты и обсуждение

В контрольной группе животных белки гепатоцитов разделились на 24 фракции, что согласуется с литературными данными о количественном распределении белков цитозоля в гепатоцитах крыс [5]. В нашей работе белки были поделены в соответствии с молекулярной массой (м.м.) на низкомолекулярные 12—26 кДа, среднемолекулярные 28—55, 66—107 кДа и высокомолекулярные 108—195 и 213—289 кДа (рис. 1). В условиях развития диет-индуцированного метаболического синдрома распределение белков цитозоля менялось. Кроме того, на 15 и 18 недели были выявлены три дополнительные фракции, две из которых с м.м. 49 и 78 кДа относятся к среднемолекулярным и одна с м.м. 249 кДа — к высокомолекулярным белкам.

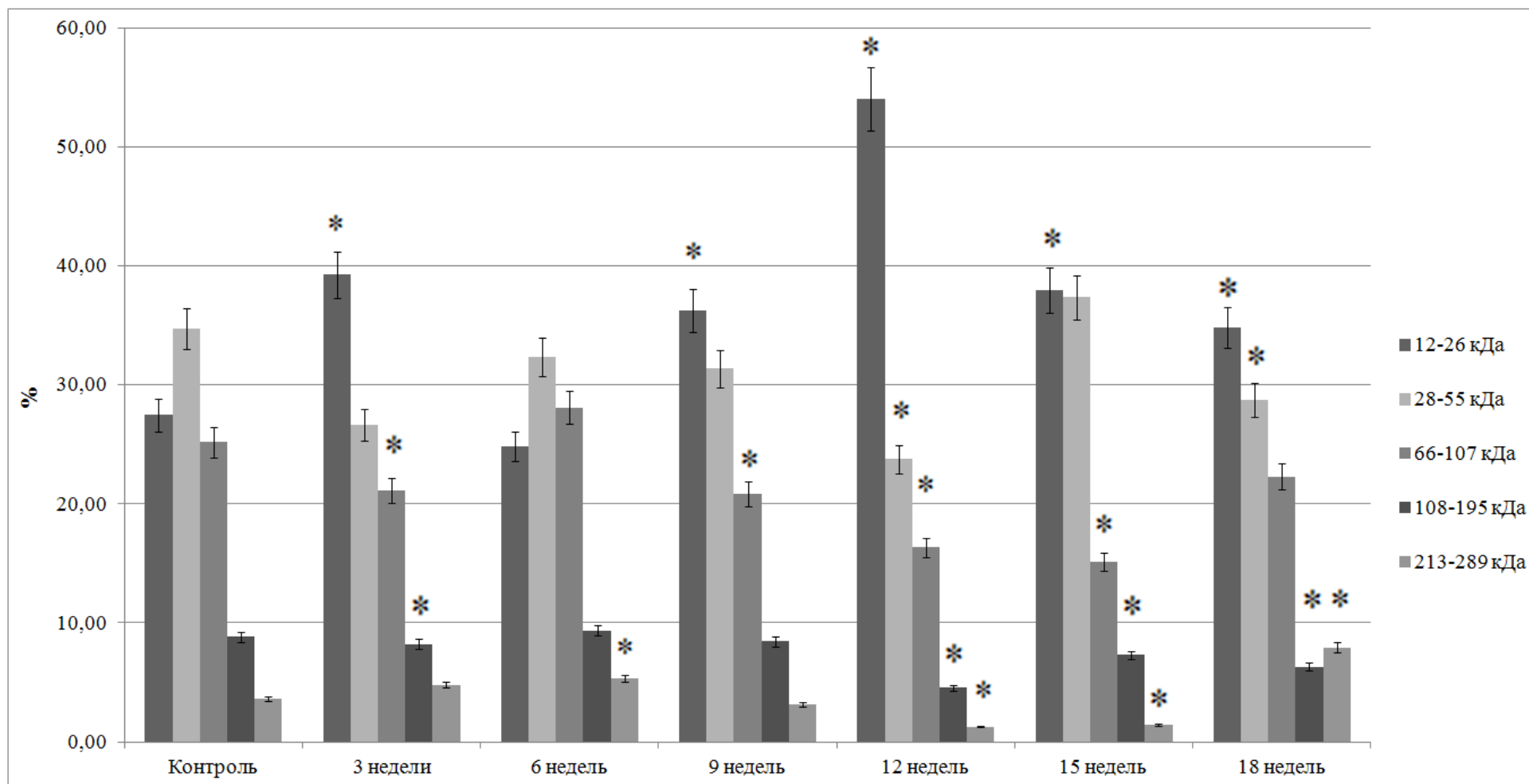


Рисунок 1. Относительное содержание белковых фракций в гомогенате гепатоцитов крыс в условиях развития метаболического синдрома ($M \pm m$, $n=10$)

Примечание: * — $p < 0,05$ (в сравнении с контрольной группой)

Начиная с 3 недели эксперимента, отмечено повышение на 44 % ($p < 0,05$) содержания фракции низкомолекулярных белков (м.м. 12—26 кДа). Также на 32 % ($p < 0,05$) повысился уровень белков во фракции высокомолекулярных белков (м.м. 213—289 кДа). Наряду с этим содержание фракции средномолекулярных белков (м.м. 66—107 кДа) снизилось на 30 % ($p < 0,05$), а в других фракциях достоверных изменений не наблюдалось. На 6 неделе развития метаболического синдрома повысилась на 48 % ($p < 0,05$) только фракция высокомолекулярных белков. При этом на 9 неделе эксперимента на 31 % ($p < 0,05$) повысилось содержание во фракции низкомолекулярных белков и на 20 % ($p < 0,05$) снизилось количество средномолекулярных белков. Содержание других фракций белков достоверно не изменялось.

На 12 неделе развития патологии наблюдалось значительное падение содержания белков во фракциях средномолекулярных и высокомолекулярных белков, наряду с повышением уровня низкомолекулярных белков. Так, уровень фракций с м.м. 28—55, 66—107, 108—195 и 213—289 кДа снизился на 45 % ($p < 0,05$), 54 % ($p < 0,05$), 93 % ($p < 0,05$) и 182 % ($p < 0,05$) соответственно. При этом содержание белка во фракции с м.м. 12—26 кДа повысилось на 96 % ($p < 0,05$). Такие изменения содержания белка во фракциях цитозольных белков могут указывать на повышение деградационных процессов, при которых образуется большое количество низкомолекулярных фрагментов в ответ на развитие стеатоза [8].

У крыс, находившихся на высококалорийной диете, на 15 неделе происходило аналогичное снижение уровня средномолекулярных и высокомолекулярных белков, при одновременном повышении низкомолекулярных. Так, содержание фракции с м.м. 66—107 кДа снизилось на 66 % ($p < 0,05$), фракции с м.м. 108—195 кДа — на 21 % ($p < 0,05$), а фракции с м.м. 213—289 кДа — на 153 % ($p < 0,05$). Уровень белков во фракции с м.м. 12—26 кДа повысился на 38 % ($p < 0,05$), что также является свидетельством повышения дегградации белков цитозоля в ответ на усиленную аккумуляцию триглицеридов.

На 18 неделе развития метаболического синдрома наблюдается повышение содержания фракции низкомолекулярных белков с м.м. 12—26 кДа на 26 % ($p < 0,05$) и фракции высокомолекулярных белков с м.м. 213—289 кДа на 119 % ($p < 0,05$). При этом содержание среднемолекулярных белков продолжало снижаться: во фракции с м.м. 28—55 кДа — на 20 % ($p < 0,05$), а во фракции с м.м. 108—195 кДа — на 39 % ($p < 0,05$). Установленные изменения уровней цитозольных фракций белков коррелируют с ранее установленными данными о развитии стеатоза, в условиях содержания крыс на высококалорийной диете [8]. Дальнейшие наши исследования будут направлены на идентификацию белков, принадлежащих к этим фракциям в соответствии с молекулярной массой, что позволит пролить свет на некоторые внутриклеточные механизмы развития стеатоза в условиях метаболического синдрома.

Выводы

Выявлено, что в условиях развития диет-индуцированного метаболического синдрома, меняется содержание белков цитозоля гепатоцитов. Установлено, что содержание низкомолекулярных белков повышается наряду со снижением содержания средне- и высокомолекулярных белков, что, в свою очередь, приводит к развитию стеатоза со значительной аккумуляцией триглицеридов в цитозоле гепатоцитов.

Список литературы:

1. Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия. — 1991. — Т. 56, вып. 9. — С. 1647—1650.
2. Плохинский Н.А. Методические консультации по биометрии // Проблемы современной биометрии. — М.: МГУ, 1981. — С. 30—50.
3. Cameron A.J., Shaw J.E., Zimmet P.Z. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations // Endocrinol Metab Clin North Am. — 2004. — Vol. 33. — P. 351—375.

4. Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z. The metabolic syndrome // *The Lancet*. — 2005. — Vol. 365. — P. 1415—1428.
5. Fountoulakis M., Suter L. Proteomic analysis of the rat liver // *Journal of Chromatography B*. — 2002. — Vol. 782. — P. 197—218.
6. James O., Day C. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? // *Gastroenterology*. — 1998. — Vol. 114. — P. 842—845.
7. Kirpich I., Gobejishvili L., Homme M. et al. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease // *J Nutr Biochem*. — 2011. — Vol. 22(1). — P. 1—19.
8. Kondro M., Mykhalchyshyn G., Bodnar P. et al. Metabolic profile and morpho-functional state of the liver in rats with glutamate-induced obesity// *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. — 2013. — Vol. 26, № 4. — P. 379—381.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature*. — 1970. — P. 680—685.