

## ВПЛИВ НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ НА ЛІПІДНИЙ СКЛАД ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ МІТОХОНДРІЙ ГЕПАТОЦИТІВ У ЩУРІВ З ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНИМ СТЕАТОГЕПАТОЗОМ

М.М. Кондро<sup>1</sup>, Д.О. Воейкова<sup>2</sup>, Л.І. Степанова<sup>2</sup>, М.Я. Співак<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Львів, Україна

<sup>2</sup>Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна

<sup>3</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна

**Зв'язок з авторами:** Кондро Мар'яна Миронівна, к.м.н., доцент кафедри нормальної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; тел.: +380677144090; E-mail: marianakondro@gmail.com

В експериментах на 30-х щурах показано, що глутамат-індукований стеатогепатоз у щурів 4-місячного віку супроводжується зміною ліпідного складу внутрішньої мембрани гепатоцитів: загальний вміст ліпідів та загальний вміст фосфоліпідів зростали на 53,4% ( $p < 0,01$ ) і 52,3% ( $p < 0,01$ ), відповідно. Найбільш виражені зміни були виявлені при визначенні вмісту холестеролу у внутрішньомітохондріальній мембрані гепатоцитів, який зростав на 261,5% ( $p < 0,001$ ) на тлі зниження вмісту ефірів холестеролу на 18,9% ( $p < 0,05$ ). Періодичне введення (2-4 місяці життя тварин) наночастинок діоксиду церію щурам з глутамат-індукованим стеатогепатозом приводило до зниження загального вмісту ліпідів, загального вмісту фосфоліпідів, вмісту холестеролу та зростання вмісту ефірів холестеролу.

**Ключові слова:** глутамат-індукований стеатогепатоз, нанокристалічний діоксид церію, гепатоцити, загальні ліпіди, внутрішня мембрана мітохондрій.

## ВЛИЯНИЕ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ У КРЫС С ГЛУТАМАТ-ИНДУЦИРОВАННЫМ СТЕАТОГЕПАТОЗОМ.

М.М. Кондро<sup>1</sup>, Д.А. Воейкова<sup>2</sup>, Л.И. Степанова<sup>2</sup>, Н.Я. Спивак<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Львов, Украина

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина

<sup>3</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

В экспериментах на 30 крысах показано, что глутамат-индуцированный стеатогепатоз у крыс 4-месячного возраста сопровождается изменением липидного состава внутренней мембраны гепатоцитов: общее содержание липидов и фосфолипидов увеличивалось на 53,4% ( $p < 0,01$ ) и 52,3% ( $p < 0,01$ ) соответственно. Наиболее выраженные изменения были обнаружены при определении содержания холестерина во внутримитохондриальной мембране гепатоцитов, который увеличивался на 261,5% ( $p < 0,001$ ) на фоне снижения содержания эфиров холестерина на 18,9% ( $p < 0,05$ ). Периодическое введение (животным 2-4 месяцев жизни) наночастиц диоксида церия крысам с глутамат-индуцированным стеатогепатозом приводило к снижению общего содержания липидов и фосфолипидов, содержания холестерина и увеличению содержания эфиров холестерина.

**Ключевые слова:** глутамат-индуцированный стеатогепатоз, нанокристаллический диоксид церия, гепатоциты, общие липиды, внутренняя мембрана митохондрий.

## THE INFLUENCE OF CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON LIPID COMPOSITION OF INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE HEPATOCYTES IN RATS WITH GLUTAMATE-INDUCED STEATOHEPATOSIS

M.M. Kondro<sup>1</sup>, D.O. Voieikova<sup>2</sup>, L.I. Stepanova<sup>2</sup>, M.Ya. Spivak<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

<sup>2</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The study was aimed at the determination of the lipid exchange indexes in the internal mitochondrial membrane of hepatocytes under the condition of the development of the glutamate-induced obesity and its correction by the nanoparticles of ceric oxide.

**Material and research methods:** The research was conducted on 30 white non-pedigree male rats born from different females with the difference of 1-3 days. The new-born rats were subdivided into 3 groups - 10 animals in each group. The first group was the reference group: On the 2-nd, 4-th, 6-th, 8-th and 10-th day after the birth they were injected the physiological solution at a dose of 8 ppm/g. The rats of the second and third groups on the 2-nd, 4-th, 6-th, 8-th and 10-th day after the birth they were injected L-sodium glutamate (SG) at a dose of 4 mg/kg, dissolved in the physiological solution [Sanabria, 2002]. The volume of the injected SG solution amounted to 8 ppm/g of the rats' weight. Starting from the 1 month of birth and during the next three months the rats of the first (reference) and second (after neonatal SG injection) group were injected the water peroral in the amount of 2.9 ml/kg. The rats of the third group (after neonatal SG injection) starting from the 1 month of the birth and during the following

three months were injected the nanocrystal ceric oxide (NCCO) peroral at a dose of 4 mg/g, dissolved in the water for injection, the volume of which amounted to 2.9 ml/kg. The intact liver cells were obtained with the help of modified nonenzymatic method of extracting the hepato-cytaric fraction of liver cells [Petrenko, 1991]. The internal mitochondrial membrane preparations were obtained with the help of stage-by-stage ultracentrifuging [Ardail, 1990]. The lipides were extracted using the Folch method with modifications [Folch, 1957]. The composition of general lipides was determined using the ethod by Chromy V. et al. [Chromy V. et al., 1975]. The composition of free and esterified cholesterol was determined according to the method of interaction with the ironic chloride [Kolb, 1976].

**Results:** It was established that the glutamate-induced steatohepatosis of 4-month rats is accompanied by the change of the lipid composition of the internal membrane of hepatocytes: Total lipides composition and total composition of phospholipids increased by 53.4% ( $p < 0.01$ ) and 52.3% ( $p < 0.01$ ), correspondingly. The most expressed changes were found when determining the cholesterol composition in the internal mitochondrial membrane of hepatocytes, which increased by 261.5% ( $p < 0,001$ ), against the background of the reduction of cholesterol ethers composition by 18.9% ( $p < 0.05$ ). Periodical injection (2-4 months of the animals' life) of the nanoparticles of ceric oxide to the rats with glutamate-induced steatohepatosis resulted in the decrease of the general composition of lipids by 14.4% ( $p < 0,05$ ), general composition of phospholipids by 19.1% ( $p < 0.05$ ), cholesterol composition by 51.8% ( $p < 0,001$ ) and to increase the level of cholesterol ethers by 101.4% ( $p < 0,001$ ).

**Conclusion:** The glutamate-induced steatohepatosis of the rats is accompanied by the change of the lipid composition of the internal membrane of hepatocytes. These changes testify to the mitochondrial dysfunction which is manifested in the change of the work of respiratory chain during which not ATP is generated but rather the reactive oxygen intermediates which, in its turn, leads to the development of the oxidative stress both in mitochondria and in hepatocytes. The application of the nanoparticles of ceric oxide has a positive impact on the lipid composition of the internal membrane of hepatocytes of the rats with the glutamate-induced steatohepatosis, although, doesn't bring the studied indexes to the normal values.

**Key words:** glutamate-induced steatohepatosis, cerium

**Вступ.** Насьогодні проведена велика кількість досліджень, присвячених вивченню впливу глутамату натрію, який є найбільш популярною харчовою добавкою, на показники життєдіяльності. Доведено, що глутамат натрію є причиною посилення тяги до їжі і навіть «харчової наркоманії». В

результаті виникає ожиріння, на тлі якого розвивається ряд небезпечних захворювань, в т.ч. неалкогольний стеатогепатоз, основною ознакою якого є наявність «мітохондріальної дисфункції» гепатоцитів. Механізми «мітохондріальної дисфункції» гепатоцитів вивчені недостатньо, а наявні дані

досить суперечливі. Показано, що у щурів з глутамат-індукованим стеатогепатозом у мітохондріях гепатоцитів спостерігалось суттєве зростання  $H^+$ -АТФазної активності при одночасному збільшенні функціональної активності III і IV комплексів електрон-транспортного ланцюга [1]. В інших роботах отримані протилежні результати щодо активності комплексів дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів у щурів з глутамат-індукованим стеатогепатозом [2, 3]. При цьому дані відносно ліпідного складу мітохондріальної мембрани гепатоцитів у щурів з глутамат-індукованим стеатогепатозом відсутні. Дослідження даного питання дозволяє наблизитись до розкриття механізмів цієї патології. Моделювання стеатогепатозу шляхом введення глутамату натрію щурам у ранньому неонатальному періоді дозволяє створити умови, наближені до реальних, які притаманні людській популяції завдяки широкому і неконтрольованому вживанню харчової добавки глутамату натрію, а, отже, дослідити механізми стеатогепатозу для розробки нових методів його профілактики і лікування. Перспективним, на наш погляд, є застосування для цього нанокристалічного діоксиду церію, якому притаманні виражені антиоксидантні властивості, а періодичне його введення щурам з 2-го по 4-й місяці запобігало розвитку стеатогепатозу у 4-місячних щурів, яким в ранньому неонатальному періоді вводили глутамат натрію [4].

Метою роботи було визначити показники ліпідного обміну у внутріш-

ній мітохондріальній мембрані гепатоцитів за умов розвитку глутамат-індукованого ожиріння та періодичне його введення для корекції нанокристалічним діоксидом церію.

#### **Матеріал та методи дослідження.**

Експерименти проведені з дотриманням загальних принципів біоетики у відповідності до міжнародних рекомендацій Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та затверджених Першим національним конгресом з біоетики України (вересень, 2001).

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 день після народження підшкірно вводили фізіологічний розчин у дозі 8 мкл/г. Щурам другої і третьої групи на 2, 4, 6, 8 і 10 день після народження підшкірно вводили L-глутамат натрію (ГН) у дозі 4 мг/кг, розчинений у фізіологічному розчині [5]. 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 групи (після неонатального введення ГН) перорально вводили воду з розрахунку 2,9 мл/кг. Щурам третьої групи (після неонатального введення ГН), починаючи з 1 місяця від дня народження та упродовж наступних трьох місяців, перорально вводили нанокристалічний

діоксид церію (НДЦ) в дозі 4 мг/г, розчинений у воді для ін'єкцій, об'єм якої складав 2,9 мл/кг.

Морфологічно та функціонально інтактні клітини печінки отримували за допомогою модифікованого неферментативного методу виділення гепатоцитарної фракції клітин печінки [6]. Подальше поетапне ультрацитрифугування дозволяло одержувати препарати внутрішньої мітохондріальної мембрани [7]. Екстракцію ліпідів проводили за методом Фолча з модифікаціями [8]. Вміст загальних ліпідів визначали за методом ChromyV. et al. [9]. Вміст вільного та етерифікованого холестеролу визначали за методом взаємодії з хлористим залізом [10].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, за якими одержані дані перевіряли на нормальність розподілу за Шапіро-Вілка. Результати були нормально розподілені, для статистичної обробки був використаний t-критерій Стьюдента

для незалежних вибірок.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Дослідження впливу глутамат-індукованого ожиріння на мітохондрії гепатоцитів у щурів показали суттєві зміни в ліпідному складі внутрішньої мітохондріальної мембрани. Так, загальний вміст ліпідів зростав на 53,4% ( $p < 0,01$ ), у порівнянні з інтактним контролем (табл.1).

Під впливом періодичного введення НДЦ щурам з глутамат-індукованим ожирінням загальний вміст ліпідів у внутрішній мембрані мітохондрій зменшувався на 14,4% ( $p < 0,05$ ), у порівнянні зі щурами із стеатозом, проте він залишався більшим на 31,3% ( $p < 0,05$ ), у порівнянні з інтактним контролем (табл.1).

Відомо, що загальний вміст ліпідів є сумішшю фосфоліпідів, холестеролу, ефірів холестеролу та мінорних ліпідних форм. Отже, виникає питання: за рахунок яких форм зростає загальний вміст ліпідів у внутрішньомітохондріальній мембрані гепатоцитів.

Таблиця 1

**Ліпідний склад внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів у щурів з глутамат-індукованим стеатогепатозом та за його корекції наночастинками діоксиду церію**

| Показники \ Групи тварин           | Інтактний контроль n=10 | Глутамат-індукований стеатогепатоз n=10 | Глутамат-індукований стеатогепатоз + діоксид церію n=10 |
|------------------------------------|-------------------------|---|---|
| Загальні ліпіди, мкг/мг білка      | 232,1±11,1              | 356,0±18,2**                            | 304,8±15,2*/#   |
| Загальні фосфоліпіди, мкг/мг білка | 220,2±11,0              | 335,3±16,2**                            | 271,1±13,6*/#   |
| Холестерол, мкг/мг білка           | 3,9±0,19                | 14,1±0,7***                             | 6,8±0,3**/###   |
| Ефіри холестеролу, мкг/мг білка    | 9,0±0,5                 | 7,3±0,4*                                | 14,7±0,7**/###  |

\*-  $p < 0,05$ , \*\*-  $p < 0,01$ , \*\*\*-  $p < 0,001$  відносно відповідного інтактного контролю;

# -  $p < 0,05$ , ### -  $p < 0,001$  у порівнянні з групою щурів з глутамат-індукованим стеатогепатозом без корекції.

В результаті проведених експериментів встановлено, що порівняно з інтактним контролем у щурів з глутамат-індукованим ожирінням загальний вміст фосфоліпідів у внутрішньомітохондріальній мембрані гепатоцитів зростав на 52,3% ( $p < 0,01$ ) (табл.1).

За умов періодичного введення НДЦ щурам з глутамат-індукованим ожирінням загальний вміст фосфоліпідів у внутрішньомітохондріальній мембрані гепатоцитів був на 19,1% ( $p < 0,05$ ) меншим у порівнянні з групою щурів з глутамат-індукованим ожирінням без корекції. При цьому досліджуваний показник не повертався до рівня інтактного контролю і залишався більшим по відношенню до нього на 23,1% ( $p < 0,05$ ) (табл.1).

Найбільш виражені зміни були виявлені нами при визначенні вмісту холестеролу у внутрішньомітохондріальній мембрані гепатоцитів, який зростав на 261,5% ( $p < 0,001$ ) на тлі зниження вмісту ефірів холестеролу на 18,9% ( $p < 0,05$ ) (табл.1).

За даними літератури, такі зміни вмісту холестеролу у внутрішній мембрані мітохондрій ведуть до збільшення електронної складової електродімічного потенціалу. При такому стані дихальний ланцюг мітохондрій накопичує проміжні електрон-транспортуючі сполуки, властивістю яких є передача електронів на синтез активних форм кисню. Зроблено висновок, що збільшення вмісту холестеролу у внутрішній мембрані мітохондрій може індукувати розвиток окисного стресу у гепатоцитах та приводити до порушення механізму антиоксидант-

ного захисту [11, 12]. На тлі зростання вмісту холестеролу ми спостерігали одночасне зниження вмісту ефірів холестеролу. Останні є транспортними молекулами і джерелом холестеролу та жирних кислот. Тому зниження вмісту ефірів холестеролу може бути результатом надлишку вмісту холестеролу у внутрішньомітохондріальній мембрані мітохондрій, що веде до усунення необхідності його транспорту. Таким чином, підвищення рівня холестеролу супроводжується паралельним зниженням рівня ефірів холестеролу [13, 12, 14].

НДЦ при періодичному введенні щурам з глутамат-індукованим ожирінням суттєво впливав на вміст холестеролу та його ефірів у внутрішній мембрані мітохондрій гепатоцитів. Ми спостерігали зниження вмісту холестеролу на 51,8% ( $p < 0,001$ ) при одночасному зростанні вмісту ефірів холестеролу на 101,4% ( $p < 0,001$ ) (табл.1). При цьому вміст холестеролу не досягав рівня інтактного контролю і залишався більшим по відношенню до нього на 74,4% ( $p < 0,01$ ), а вміст ефірів холестеролу навіть перевищував аналогічний показник в інтактних щурах на 63,3% ( $p < 0,01$ ).

Співставлення одержаних результатів з даними літератури та нашими раніше одержаними даними [15, 16, 17, 18, 19], відносно складу ліпідів у внутрішній мембрані мітохондрій гепатоцитів у щурів із стеатогепатозом, викликаним різними видами висококалорійної дієти, дозволяє заключити, що жирнокислотний склад внутрішньої мембрани гепатоцитів у щурів із

стеатогепатозом порушується незалежно від його генезу. Ці зміни вказують на мітохондріальну дисфункцію, яка проявляється у зміні роботи дихального ланцюга, при якому генерується не АТФ, а активні форми кисню, що в свою чергу веде до розвитку окисного стресу як у мітохондріях, так і гепатоцитах [15, 20]. Позитивна дія діоксиду церію очевидно пов'язана з його антиоксидантними властивостями.

### Висновки.

1. Глутамат-індукований стеатогепатоз у щурів супроводжується змінною ліпідного складу внутрішньої

мембрани гепатоцитів: загальний вміст ліпідів, загальний вміст фосфоліпідів та вміст холестеролу зростає на тлі зниження вмісту ефірів холестеролу.

2. Застосування наночастинок діоксиду церію позитивно впливає на ліпідний склад внутрішньої мембрани гепатоцитів у щурів з глутамат-індукованим стеатогепатозом, хоча і не повертає досліджувані показники до нормальних значень.

## Література

1. Lazarin M.O., Ishii-Iwamoto E.L., Yamamoto N.S., et al. Liver mitochondrial function and redox status in an experimental model of non-alcoholic fatty liver disease induced by monosodium L-glutamate in rats // *Exper Mol Path.* – 2011. – Vol. 91. – P. 687-694.
2. Musso G., Gambino R., Cassader M. et al. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity // *Annals of Internal Medicine.* – 2011 – Vol. 43 (8). – P. 617-649.
3. Wang W.F., Li S.M., Ren G.P. et al. Recombinant murine fibroblast growth factor 21 ameliorates obesity-related inflammation in monosodium glutamate induced obesity rats // *Endocrine.* – 2015. – Vol. 49. – P. 119-129.
4. Kobyliak N., Virchenko O., Falalyeyeva T. et al. Cerium dioxide nanoparticles possess anti-inflammatory properties in the conditions of the obesity-associated NAFLD in rats // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – 90:608-614. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.099.
5. Sanabria E.R., Pereira M.F., Dolnikoff M.S., Andrade I.S., Ferreira A.T., Cavaleiro E.A., Fernandes M.J.: Deficit in hippocampal long-term potentiation in monosodium glutamate-treated rats. *Brain Res Bull.* 2002, 59: 47-51.
6. Петренко А. Ю. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности / А. Ю. Петренко, А. Н. Сукач, А. Д. Росляков // *Биохимия.* – 1991. – Т. 56, № 9. – С. 1647 – 1650.
7. Ardail D. Mitochondrial contact sites / D. Ardail, J.P. Privat, M. Erget-Charlier [et al.] // *The Journal of Biochemistry.* – 1990. – Vol. 265. – P. 18797-18802.
8. Folch J. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues / J. Folch, M. Leez, G.H. Stanley // *Journal of Biological Chemistry.* – 1957. – Vol. 226, N 2. – P. 497-501.
9. Chromy V., Homakova M., Kukla R., Mohmakova A., Belusa J. // *Diagnostic of Laboratory.* – 1975. – Vol. 11, N 23.
10. Колб В.Г. Клиническая биохимия / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск, Беларусь, 1976. – С. 158-161.

11. Bieganski R.M., Yarmush M.L. Novel ligands that target the mitochondrial membrane protein mitoNEET // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2011. – Vol. 29(7). – P. 965-973.
12. Breslow D.K. Membranes in balance: mechanisms of sphingolipid homeostasis / Breslow D.K., Weissman J.S. // *Mol. Cell* – 2010. – Vol. 40, № 2. – P. 267–279.
13. Jakobsson-Borin A., Tollbom O., Dallner G. Effect of dietary fat on rat liver microsomal and mitochondrial/lysosomal dolichol, phospholipid and cholesterol // *Lipids*. – 1991. – Vol. 26(11). – P. 915-921.
14. Aoun M. Rat liver mitochondrial membrane characteristics and mitochondrial functions are more profoundly altered by dietary lipid quantity than by dietary lipid quality: effect of different nutritional lipid patterns / M. Aoun, C. Feillet-Coudray, G. Fouret [et al.] // *British Journal of Nutrition*. – 2012. – Vol. 107, N 5. – P. 647-659.
15. Monteiro J.P. Mitochondrial lipid remodeling in pathophysiology: A new target for diet and therapeutic interventions / J.P. Monteiro, P.J. Oliveira, A.S. Jurado // *Progress in Lipid Research*. – 2013. – Vol. 52, N 4. – P. 513-528.
16. Monteiro J.P. Rapaseed oil-rich diet alters hepatic mitochondrial membrane lipid composition and disrupts bioenergetics / J.P. Monteiro, C.V. Pereira, A.M. Silva [et al.] // *Archives of Toxicology*. – 2013. – Vol. 87, N 12. – P. 1251-1263.
17. Monteiro J.P. Mitochondrial membrane lipids in life and death and their molecular modulation by diet: tuning the furnace / J.P. Monteiro, C.M. Morais, P.J. Oliveira, A.S. Jurado // *Current Drug Targets*. – 2014. – Vol. 15, N 8. – P. 797-810.
18. Воейкова Д., Любас Г., Степанова Л., Остапченко Л., Кондро М. Характеристика ліпідного складу внутрішньої мітохондріальної мембрани гепатоцитів експериментальних тварин за умов утримання на висококалорійній дієті // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. – 2015. – 2(19). – С. 37-40.
19. Yamaoka S. Mitochondrial function in rats by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil / S. Yamaoka, R. Urade, M. Kito // *Journal of Nutrition*. – 1988. – Vol. 118, N 3. – P. 290-296.
20. Goncalves I.O., Maciel E., Passos E. et al. Exercise alters liver mitochondria phospholipidomic profile and mitochondrial activity in non-alcoholic steatohepatitis // *The Inter. J. of Biochem. And C. Biol.*, - 2014, - Vol. 54, - P. 163-173.