

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ АЛІМЕНТАРНЕ ОЖИРІННЯ: АПОПТОЗ, АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА, МАКРО- І МІКРОЕЛЕМЕНТИ В ТКАНИНІ ПЕЧІНКИ

*У статті наведено результати дослідження механізму ураження печінки за умови експериментального аліментарного ожиріння. Встановлено, що через 14 діб експерименту активуються супероксиддисмутаза і каталаза, що прямо пов'язано з рівнем цинку ( $r=0,77$ ;  $p<0,05$ ) і купруму ( $r=0,64$ ;  $p<0,05$ ), які входять в активний центр ензиму  $Cu/Zn$ -СОД, що забезпечує регуляцію рівня пероксидації на стадії ініціювання ланцюгів окиснення. Через 28 діб експерименту функціональна здатність антиоксидантної системи виснажується, про що свідчить зниження активності супероксиддисмутази і каталази, взаємозв'язок із мікроелементами втрачається. Порушення макро- і мікроелементного обміну через 28 діб моделювання аліментарного ожиріння у щурів характеризується підвищенням рівня купруму, зниженням вмісту цинку, магнію і хрому в тканині печінки стосовно контролю ( $p<0,05$ ). Також спостерігають апоптичну загибель макрофагів печінки, яка в 2,9 рази вища від контрольних значень, що залежить від рівня цинку в тканині печінки ( $p<0,05$ ).*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** аліментарне ожиріння, апоптоз, антиоксидантний захист, макро- і мікроелементи.

ВСТУП. У патогенезі багатьох захворювань печінки важливу роль відіграє апоптична загибель гепатоцитів [1, 2]. Важливою біохімічною характеристикою апоптозу є специфічна міжнуклеосомна фрагментація ДНК, яка активується шляхом підвищення активності специфічних ендонуклеаз, перерозподілу ендонуклеаз між цитоплазмою і ядром та змінами у структурі хроматину, що викликають збільшення його чутливості до дії ендонуклеаз [3]. До факторів, які відіграють значну роль у регуляції апоптозу, належать мікроелементи. При цьому відмічено, що навіть така незначна їх кількість необхідна для взаємозв'язаної роботи організму. Результати досліджень вказують на те, що цинк є селективним інгібітором апоптозу, марганець, кадмій, свинець – модуляторами апоптозу, кобальт, ферум запускають апоптоз [4, 5]. Дефіцит міді сповільнює синтез білка, впливає на фагоцитарну активність крові й імунологічні показники, що призводить до значних порушень життєдіяльності організму [6]. Підсумовуючи вищесказане, можна стверджувати, що дослідження ролі біоелементів у механізмах ініціації та реалізації апоптичної загибелі клітин є актуальним і доцільним.

© М. І. Марущак, О. П. Мялюк, І. М. Кліщ, 2015.

Дослідження V. Trak-Smauga та співавт. показали ураження печінки у тварин з експериментальним аліментарним ожирінням [7]. Наші попередні дослідження вказують на порушення ферментного обміну при експериментальному аліментарному ожирінні, що пов'язано з втягненням печінки у патологічний процес, який супроводжується підвищенням проникності клітинних мембран [8].

Для глибшого розуміння механізмів ураження печінки метою даної роботи було встановити взаємозв'язок між рівнем макро- і мікроелементів у тканині печінки та показниками індукованої загибелі макрофагів печінки й ферментної ланки антиоксидантного захисту за умови експериментального аліментарного ожиріння.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Експериментальну модель аліментарного ожиріння відтворювали на 24 білих нелінійних щурах-самцях шляхом застосування індуктора харчового потягу – натрієвої солі глютамінової кислоти у співвідношенні 0,6:100,0 та висококалорійної дієти, яка складалася зі стандартної їжі (47 %), солодкого концентрованого молока (44 %), кукурудзяної олії (8 %) і рослинного крохмалю (1 %). Контроль за відтворенням аліментарного

ожиріння здійснювали шляхом зважування тварин, вимірювання назально-анальної довжини та розрахунку індексу маси тіла (ІМТ) (ділення маси тіла в кілограмах на довжину в метрах у квадраті) [9]. Тварин поділили на дві дослідні групи: 1-ша – спостереження через 14 днів після початку експерименту при ІМТ>25 (12 щурів); 2-га – через 28 днів після початку експерименту при ІМТ>30 (12 щурів).

Тварин декапітували під легким ефірним наркозом, для дослідження забирали печінку, яку після забору охолоджували в середовищі виділення, що містило 0,25 М сахарози, 1 мМ EDTA та 10 мМ трис-НСІ-буфера (рН 7,4). Готували 10 % гомогенат, охолоджену наважку (1 г) гомогенізували в магнітному подрібнювачі тканин "SilentCrusher S". Активність супероксид-дисмутази (СОД) визначали за ступенем зниження відновлення нітротетразолію синього за присутності NADH і феназинметасульфату [10]. Активність каталази визначали за методом, фіксуючи зміну оптичного поглинання внаслідок реакції пероксиду водню з молібдатом амонію [11].

Популяцію макрофагів отримували шляхом центрифугування гомогенату печінки при 1500 об./хв протягом 20 хв при кімнатній температурі. Верхня інтерфаза (на межі гомогенат-верифікол щільністю 1,048) складалася з макрофагів. Для визначення рівня апоптично та некротично змінених макрофагів печінки використовували ФІТЦ-мічений анексин V, що має здатність зв'язуватися з фосфатидилсеринном на зовнішній поверхні плазмолемі, та пропідію йодид (PI), яким визначали некротизовані клітини, з набору реагентів "ANNEXIN V FITC" ("Beckman Coulter", США) [12]. Клітини доводили до концентрації 105 у 100 мкл, відмивали в 0,5 ml Неррес-буфера (10 мМ Неррес (NaOH, рН 7,4), 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub>) при 1,5 тис. об./хв 5 хв. Надосад зливали, клітини ретельно ресуспензували й інкубували в темному місці при кімнатній температурі по 10 хв із додаванням 5 мкл Annexin V-FITC та 10 мкл PI-buffer. Потім додавали 1 ml Неррес-буфера та аналізували проби на проточному цитометрі "Erics XL" ("Beckman Coulter", США).

Вміст цинку, магнію, купруму і хрому в тканині визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С115-М1 з електротермічним атомізатором виробництва "НВО Selmi" (Україна), який оснащений комп'ютерною приставкою для автоматичного обчислювання вмісту біоелементів. Результати досліджень оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стюдента і методів лінійної регресії. Для перевірки зв'язку між перемінними використовували коефіцієнт

рангової кореляції Спірмена. Різницю вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Дослідження рівня програмованої та індукованої загибелі макрофагів печінки показало зростання відсотка клітин з явищами апоптозу вдвічі вже через 14 днів експерименту, тоді як через 28 днів рівень апоптозу перевищував на 84,8 % дані 1-ї дослідної групи (рис. 1). Слід зазначити, що в обох експериментальних групах відсоток некротичних клітин залишався в межах контрольних значень із тенденцією до підвищення.

Враховуючи те, що найчастіше апоптичну загибель клітин організму провокує дисбаланс про- й антиоксидантної систем, наступним етапом нашого дослідження було визначити активність СОД і каталази в тканині печінки щурів з аліментарним ожирінням. Встановлено, що показники ферментної ланки антиоксидантного захисту при даній патології максимально підвищувалися вже через 14 днів моделювання, зокрема активність СОД була більшою на 32,8 %, каталази – на 20,4 % проти контрольних значень ( $p < 0,05$ ). Зазначимо, що у 2-й дослідній групі ці показники зменшувалися проти даних 1-ї групи (СОД – на 22,1 % і каталаза – на 12,7 %), але залишалися достовірно високими порівняно з контролем (СОД – на 10,6 % і каталаза – на 7,6 %). Отримані дані вказують на виснаження функціональної здатності антиоксидантної системи при активації ПОЛ у тварин з аліментарним ожирінням. Встановлення достовірної сильної позитивної (у парі СОД–цинк ( $r = 0,77$ ;  $p < 0,05$ )) і середньої позитивної (в парі СОД–купрум ( $r = 0,64$ ;  $p < 0,05$ )) кореляції через 14 днів зумовлене тим, що дані мікроелементи входять в активний центр ензиму Cu/Zn-СОД, який забезпечує регуляцію рівня пероксидації на стадії ініціювання ланцюгів окиснення. Вважають, що за умови патологічного процесу цинк інтенсивно надходить до уражених тканин для активації синтезу металотіонеїну, підвищення рівня експресії та активності

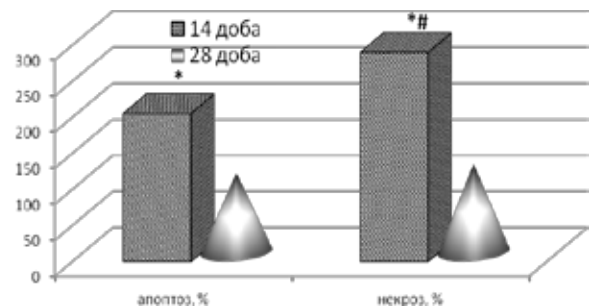


Рис. 1. Показники програмованої загибелі макрофагів печінки у динаміці розвитку аліментарного ожиріння в щурів (тут і на рисунках 2, 3: \* – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами; # – різниця достовірна між дослідними групами).

Cu/Zn-СОД у клітинах пошкодженого органа. Слід зазначити, що через 28 днів дані взаємозв'язки втрачаються. Також не виявлено кореляційного зв'язку між рівнем апоптозу й активністю ферментів системи антиоксидантного захисту.

Оскільки в основі порушення функціонування антиоксидантної системи гепатоцитів лежить дисбаланс макро- і мікроелементів, наступним кроком нашого дослідження було визначити вміст магнію, цинку, купруму і хрому в тканині печінки щурів з аліментарним ожирінням. Аналіз динаміки змін макро- та мікроелементів у тканині печінки щурів показав, що через 14 днів експерименту вміст цинку і купруму достовірно зростає, а магнію – мав тенденцію до підвищення, що, на нашу думку, пов'язано з експресією Zn-, Cu-вмісних супероксиддисмутаз і металотіонеїнів (табл. 1, рис. 2). У 2-й дослідній групі спостерігали зовсім іншу картину: підвищення вмісту купруму, зниження вмісту цинку і магнію стосовно контролю та 1-ї дослідної групи. Такі зміни можна пояснити збільшенням використання цинку в продукуванні цинк-альфа<sub>2</sub>-глікопротеїну, який зростає при аліментарному ожирінні, відіграючи, на думку вчених, захисну роль [13, 14]. Досліджено, що іони магнію виступають есенційними кофакторами багатьох ферментів, які беруть участь в обміні вуглеводів і жирів, а низький його рівень підвищує індекс атерогенності, що є фактором аліментарного ожиріння [15].

Аналіз вмісту хрому в тканині печінки щурів з аліментарним ожирінням свідчив про зменшення його рівня нижче межі визначення вже через 14 днів експерименту з такою ж тенденцією до 28 доби. Враховуючи те, що хром є інгібітором гідроксиметил-глутарил КоА-редуктази, низький вміст даного мікроелемента підвищує внутрішньоклітинну концентрацію холестеролу в печінці з наступним збільшенням його в плазмі крові [16].

Динаміка досліджених біоелементів вказує на те, що через 14 днів (надмірна маса тіла) експерименту компенсаторні механізми організму пере-

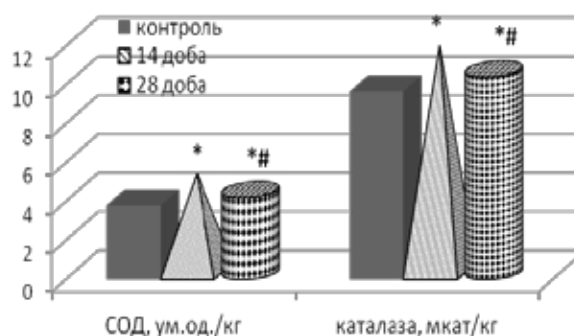


Рис. 2. Показники системи антиоксидантного захисту в динаміці розвитку аліментарного ожиріння у щурів.

бували у стані напруження, тоді як аліментарне ожиріння (28 днів дослідження) виступало типовим патологічним процесом із розвитком передумов до поліорганності ураження (рис. 3).

Отримані результати дали підставу включити в рівняння множинної регресії величину апоптозу як результативну ознаку для побудови моделі, а факторами, відповідно, загальний кальцій, магній і цинк. Якість побудованої моделі оцінювали як хорошу, оскільки середня похибка апроксимації становила 5,4 %, що не перевищувало 8–10 %. Фактичне значення F-критерію Фішера складало 16,25, що довело значущість зв'язку між показниками ( $p < 0,05$ ). Встановлено, що на рівень апоптозу за умови аліментарного ожиріння в щурів у цілому впливало порушення мікроелементного обміну, проте найбільше

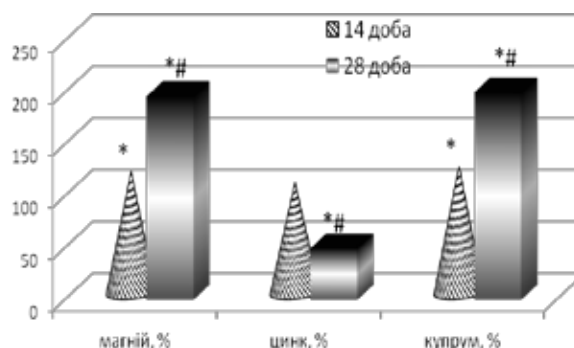


Рис. 3. Показники вмісту окремих макро- та мікроелементів у тканині печінки щурів у динаміці розвитку аліментарного ожиріння в щурів.

Таблиця 1 – Показники вмісту окремих макро- та мікроелементів у тканині печінки щурів за умови дієтіндукованого ожиріння (M±m)

Показник	Група тварин		
	контрольна (n=12)	1-ша дослідна (n=12)	2-га дослідна (n=12)
Магній, мг/г	0,90±0,07	1,05±0,05 $p_1 > 0,05$	1,78±0,06 $p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$
Цинк, мкг/г	47,73±0,64	50,56±0,58 $p_1 < 0,05$	23,70±1,16 $p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$
Купрум, мкг/г	0,95±0,08	1,15±0,05 $p_1 < 0,05$	1,89±0,07 $p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$

Примітки:

1.  $p_1$  – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами.
2.  $p_2$  – різниця достовірна порівняно з ураженими тваринами.

Таблиця 2 – Параметри множинної лінійної регресії залежності рівня апоптозу від вмісту біоелементів у тканині печінки щурів з аліментарним ожирінням

Параметр	Коефіцієнт	Стандартна похибка	t-статистика	P-значення
Результативна ознака – апоптоз (PO)	12,56	1,74	7,23*	0,001*
Фактор 1 – магній (Ф1)	0,43	0,53	0,81	0,44
Фактор 2 – цинк (Ф2)	-0,23	0,04	-6,48*	0,001*
Фактор 3 – купрум (Ф3)	-0,67	0,65	-1,04	0,33

Примітка. \* – різниця достовірна відносно контрольної групи.

значення мав цинк ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). Згідно з даними ряду авторів, низький рівень цинку блокує перехід з однієї фази клітинного циклу в іншу, збільшуючи ризик розвитку пошкоджень печінки [17], що підтверджує отримані нами результати.

**ВИСНОВКИ.** 1. За умови аліментарного ожиріння через 28 днів експерименту спостерігають апоптичну загибель макрофагів печінки, яка у 2,9 раза вища від контрольних значень, що залежить від рівня цинку в тканині печінки ( $p < 0,05$ ).

2. Порушення макро- і мікроелементного обміну через 28 днів моделювання аліментарного ожиріння у щурів характеризується підвищенням

рівня купруму, зниженням вмісту цинку, магнію і хрому в тканині печінки стосовно контролю ( $p < 0,05$ ).

3. Експериментальне аліментарне ожиріння супроводжується активацією супероксиддисмутази і каталази через 14 днів досліду, що прямо пов'язано з рівнем цинку ( $r = 0,77$ ;  $p < 0,05$ ) та купруму ( $r = 0,64$ ;  $p < 0,05$ ), які входять в активний центр ензиму Cu/Zn-SOD, що забезпечує регуляцію рівня пероксидації на стадії ініціювання ланцюгів окиснення. Через 28 днів експерименту функціональна здатність антиоксидантної системи виснажується, про що свідчить зниження активності SOD і каталази, взаємозв'язок з мікроелементами втрачається.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Некроз и апоптоз гепатоцитов и оценка некоторых биохимических параметров крови у больных с механической желтухой опухолевой этиологии / С. В. Бойчук, Р. Ш. Шаймарданов, М. М. Миннебаев [и др.] // РЖГГК. – 2007. – № 6. – С. 32–36.

2. Apoptosis in liver diseases – detection and therapeutic applications / S. Ghavami, M. Hashemi, K. Kadkhoda [et al.] // Med. Sci. Monit. – 2005. – **11**, № 11. – Р. 3337–3345.

3. Гончикова С. Ч. Дизрегуляция апоптоза гепатоцитов при различных поражениях печени, возможности фитокоррекции / С. Ч. Гончикова, И. П. Убеева // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2009. – № 2 (66). – С. 236–238.

4. Kaletina N. I. Minor constituents – biological controls / N. I. Kaletina, G. I. Kaletin. – M.: Science in Russia, ed. Academy of Sciences, 2007. – № 1. – Р. 50.

5. Сизова Е. А. Экспрессия маркера апоптоза в клетках печени при различных способах введения наночастиц меди / Е. А. Сизова, А. А. Танцикужина, В. С. Полякова // Вестник ОГУ. – 2011. – № 12 (131). – С. 436–438.

6. Бабенко Г. А. Спонтанная и индуцированная хемилюминесценция сыворотки крови при хроническом алкоголизме / Г. А. Бабенко, А. В. Скальный // Микроэлементы в медицине. – 2001. – **2**, вып. 2. – С. 46–47.

7. Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet /

V. Trak-Smayra, V. Paradis, J. Massart [et al.] // Int. J. Exp. Pathol. – 2011. – **92** (6). – Р. 413–421.

8. Мялюк О. П. Жовчоутворювальна функція печінки за умови експериментального аліментарного ожиріння / О. П. Мялюк, І. М. Кліщ, М. І. Марущак // Вісн. проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4 (1). – С. 164–167.

9. Пат. 87711 Україна, МПК (2006.01) А 61 К 31/195. Спосіб моделювання аліментарного ожиріння / Марущак М. І., Антонішин І. В., Мялюк О. П., Орел Ю. М., Криницька І. Я. – № 1013 12044; заявл. 14.10.13; опубл. 10.02.14, Бюл. № 3.

10. Чевари С. Роль супероксидредуктазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.

11. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.

12. The CD14+lowCD16+ monocyte subset is more susceptible to spontaneous and oxidant-induced apoptosis than the CD14+ CD16-subset / С. Zhao, Y. C. Tan, W. C. Wong [et al.] // Cell Death and Disease. – 2010. – **1**. – Р. 1–11.

13. Zinc, vitamin A, and vitamin C status are associated with leptin concentrations and obesity in Mexican women: results from a cross-sectional study [Electronic resource] / О. P. García, D. Ronquillo, María del Carmen Caamaño [et al.] // Nutrition & Metabolism. – 2012. – Access mode: <http://nutritionand->

metabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-7075-9-59.

14. Zinc-alpha2-glycoprotein in patients with acute and chronic kidney disease / I. Sørensen-Zender, J. Beneke, B. M. W. Schmidt [et al.] // BMC Nephrology. – 2013. – 14. – P. 14.

15. Роль магния в формировании метаболического синдрома, коррекции избыточного веса и ожирения у детей и подростков [Электронный ресурс] / О. А. Громова, Л. Э. Федотова, Т. Р. Гришина [и др.] //

Педиатрия. – 2014. – 93, № 2. – Режим доступа к журн. : <http://medi.ru/doc/a1501132.htm>.

16. Gomes M. R. Considerations about chromium, insulin and physical exercise [Electronic resource] / M. R. Gomes, M. M. Rogero, J. Tirapegui // Rev. Bras. Med. Esporte. – 2005. – 11, № 5. – Access mode : <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922005000500003>.

17. Боєчко Ф. Ф. Основи молекулярної біології (курс лекцій) / Ф. Ф. Боєчко, Л. О. Боєчко, І. В. Шмиголь. – Черкаси : Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 255 с.

М. І. Марущак, О. П. М'ялюк, І. Н. Клищ

ТЕРНОПОЛЬСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ АЛИМЕНТАРНОЕ ОЖИРЕНИЕ: АПОПТОЗ, АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ

### Резюме

В статье приведены результаты исследования механизма поражения печени при экспериментальном алиментарном ожирении. Установлено, что через 14 суток эксперимента активируются супероксиддисмутаза и каталаза, что напрямую связано с уровнем цинка ( $r=0,77$ ;  $p<0,05$ ) и меди ( $r=0,64$ ;  $p<0,05$ ), которые входят в активный центр фермента Cu/Zn-SOD, что обеспечивает регуляцию уровня пероксидации на стадии иницирования цепей окисления. Через 28 суток эксперимента функциональная способность антиоксидантной системы истощается, о чем свидетельствует снижение активности супероксиддисмутазы и каталазы, взаимосвязь с микроэлементами теряется. Нарушение макро- и микроэлементного обмена через 28 суток моделирования алиментарного ожирения у крыс характеризуется повышением уровня меди, снижением содержания цинка, магния и хрома в ткани печени сравнительно с контролем ( $p<0,05$ ). Также наблюдают апоптическую гибель макрофагов печени, которая в 2,9 раза выше контрольных значений, что зависит от уровня цинка в ткани печени ( $p<0,05$ ).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: алиментарное ожирение, апоптоз, антиоксидантная защита, макро- и микроэлементы.

M. I. Marushchak, O. P. Myalyuk, I. M. Klishch

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

## EXPERIMENTAL ALIMENTARY OBESITY: APOPTOSIS, ANTIOXIDANT SYSTEM, MACRO- AND MICROELEMENTS IN THE LIVER

### Summary

The results of the study of the mechanism of liver injury of experimental alimentary obesity are provided. It was established that in 14 days the experiment activates superoxide dismutase and catalase, which are directly related to the level of zinc ( $r=0.77$ ;  $p<0.05$ ) and copper ( $r=0.64$ ;  $p<0.05$ ), which outside the active site of the enzyme Cu/Zn-SOD, providing regulation of the initiation stage peroxidation of chain oxidation. After 28 days of experiment functional capacity of antioxidant system is exhausted, as evidenced by decreased activity of SOD and catalase, the relationship with trace elements is lost. Violation of trace elements metabolism after 28 days of experimental model in the rats are characterized by increased levels of copper, reduced zinc, magnesium and chromium in liver tissue, compare to the control ( $p<0.05$ ). Also, apoptotic death of macrophages is present in the liver, which is 2.9 times higher than the control values, and depending on the level of zinc in liver tissue ( $p<0.05$ ).

KEY WORDS: alimentary obesity, apoptosis, antioxidant protection, trace elements.

Отримано 16.09.15

Адреса для листування: М. І. Марущак, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.