

## АПОПТИЧНА ЗАГИБЕЛЬ КЛІТИН ТА ШЛЯХИ ЇЇ ІНІЦІАЦІЇ ЗА УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖИРІННЯ

*У статті на моделі експериментального аліментарного ожиріння досліджено рівень апоптично і некротично змінених клітин лейкоцитарної суспензії крові та встановлено їх взаємозв'язок з показниками вільнорадикального окиснення, цитокінового статусу, вуглеводного і ліпідного обміну. Методами статистичного аналізу показано, що в активації програмованої загибелі клітин за умови аліментарного ожиріння в щурів, що характеризується підвищенням у 2,1 раза відсотка анексин-позитивних клітин лейкоцитарної суспензії, значну роль відіграють порушення імунологічної реактивності поруч зі зростанням концентрації лептину, загального холестеролу і триацилгліцеролів.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ожиріння, апоптоз, фактори ініціації.

ВСТУП. Ожиріння – це складне хронічне порушення ліпідного обміну, що є значною медико-соціальною проблемою, яка негативно відбивається на здоров'ї, працездатності й тривалості життя людей [1–3]. За даними ВООЗ, на сьогодні надмірна маса тіла й ожиріння настільки поширені, що впливають на здоров'я населення більше, ніж традиційні проблеми охорони здоров'я, зокрема голодування та інфекційні захворювання [4].

Однією з патогенетичних ланок ожиріння є оксидативний стрес, який зумовлює глибокі зміни з боку обміну речовин і механізмів його регуляції в тканинах внутрішніх органів [5]. У дослідженнях показано, що в пацієнтів з метаболічним синдромом споживання висококалорійної їжі призводить до збільшення вмісту маркерів пероксидного окиснення ліпідів [6].

Порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу на тлі ожиріння, імовірно, опосередковується через зв'язок з інсулінорезистентністю та системною хронічною запальною відповіддю організму. Як відомо, гіперінсулінемія підсилює вільнорадикальні процеси завдяки гіперстимуляції  $\alpha$ -адренорецепторів і появі активних форм кисню у процесі біосинтезу катехоламінів. Окрім того, прозапальні цитокіни, зокрема TNF- $\alpha$  та IL-6, які синтезуються жировою тканиною, діючи локально чи системно, стимулюють утворення вільних радикалів [7].

© М. І. Марущак, 2016.

Різноманітні фізіологічні й патологічні стани можуть викликати загибель клітин. Зміна тканинного гомеостазу є однією з основних причин розвитку патології. Апоптоз – основний біологічний процес, який направлений на регулювання гомеостазу. На думку ряду авторів, одним із основних чинників виникнення системних порушень на тлі ожиріння є біологічна активність жирової тканини, яка полягає у продукуванні прозапальних цитокінів, фактора інгібіції макрофагів, трансформуючого фактора росту, що може сприяти появі порушень у гуморальній та клітинній ланках імунітету, активації апоптичної загибелі клітин [8].

Тому метою даного дослідження було оцінити рівень апоптично і некротично змінених клітин лейкоцитарної суспензії крові та встановити їх взаємозв'язок з показниками вільнорадикального окиснення, цитокінового статусу, вуглеводного і ліпідного обміну за умови експериментального 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).

Для визначення рівня апоптично та некротично змінених клітин лейкоцитарної суспензії крові використовували ФІТЦ-мічений анексин V, що має здатність зв'язуватися з фосфатидилсерином на зовнішній поверхні плазмолемі, та пропідію йодид (PI), яким визначали некротизовані клітини, з набору реагентів “ANNEXIN V FITC” (“Beckman Coulter”, США) [10]. Клітини доводили до концентрації  $10^5$  у 100 мкл, відмивали в 0,5 ml Неррес-буфера (10 mM Нерес (NaOH, pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1,8 mM  $CaCl_2$ ) 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 “Epics XL” (“Beckman Coulter”, США). З метою оцінки інтенсивності процесів вільнорадикального окиснення визначали вміст ТБК-активних продуктів (Э. Н. Коробейникова, 1989), вміст продуктів окисної модифікації протеїнів (А. И. Арчаков, 1998), для оцінки системи монооксиду нітрогену визначали його метаболіти (О. Я. Склярів, 2004). Цитокиновий профіль у сироватці крові й показники вуглеводного обміну визначали за концентрацією TNF- $\alpha$ , IL-6 й лептину методом імуноферментного аналізу з

використанням наборів фірми “DRG” (Німеччина). Загальний холестерол та триацилгліцеролі визначали загальноприйнятими методами на біохімічному аналізаторі з використанням наборів фірми “Human” (Німеччина).

Результати досліджень оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента і методів лінійної регресії. Для перевірки зв'язку між перемінними застосовували коефіцієнт рангової кореляції Спірмена. Різницю вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Аналіз отриманих даних вказує на зростання відсотка клітин лейкоцитарної суспензії з явищами апоптозу в 1,6 раза вже через 14 днів експерименту, тоді як відсоток некротичних клітин залишався в межах контрольних значень. Аліментарне ожиріння, змодельоване через 28 днів гіперкалорійної дієти, характеризувалося підвищенням у 2,1 раза відсотка апоптичних клітин, а рівень некротично загиблих клітин продовжував залишатися в межах встановленої норми. Потрібно відмітити, що відсоток апоптично змінених клітин через 28 днів експерименту на 58,4 % перевищував отримані через 14 днів дані ( $p < 0,05$ ) (рис.).

Отримані дані узгоджуються з попередньо проведеними дослідженнями, які вказують на активацію пероксидного окиснення ліпідів, що, на нашу думку, ініціює загибель клітин шляхом апоптозу. Апоптоз відбувається двома основними молекулярними шляхами – рецепторопосередкованим та мітохондріезалежним. Мітохондріезалежний шлях спрацьовує у відповідь на ряд стресових чинників, особливо оксидативний стрес, у результаті чого пошкоджується ДНК. Для

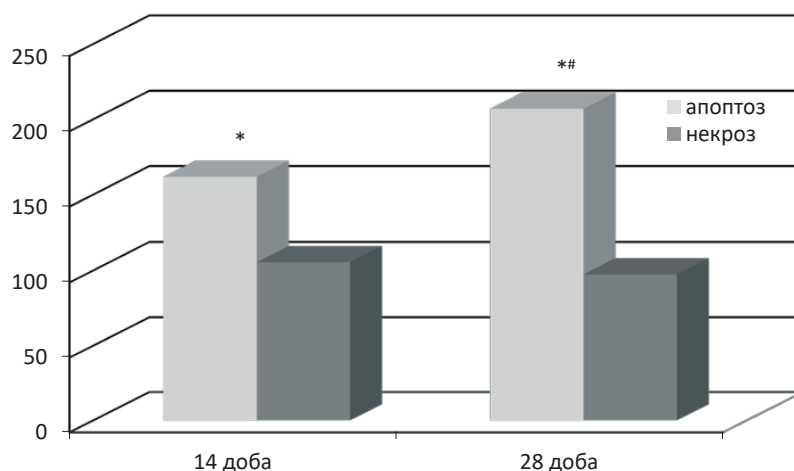


Рис. Показники програмованої загибелі клітин лейкоцитарної суспензії крові у динаміці розвитку аліментарного ожиріння в щурів (\* – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами; \*\* – різниця достовірна порівняно з ураженими тваринами).

підтвердження цієї гіпотези було вивчено співвідношення показників вільнорадикального окиснення та цитокинового профілю з відсотком анексин-позитивних клітин лейкоцитарної суспензії.

Встановлено сильний прямий взаємозв'язок рівня апоптозу з концентрацією прозапальних

цитокинів, ліпідним обміном, зокрема лептином, загальним холестеролом і триацилгліцеридами, та середньої сили – з ІМТ (табл.). Отримані дані свідчать про те, що активація пероксидного окиснення ліпідів призводить до гіперпродукування прозапальних цитокинів, які ініціюють апоптичну загибель клітин.

Таблиця – Кореляційні зв'язки відсотка апоптичної загибелі клітин лейкоцитарної суспензії з показниками вільнорадикального окиснення і цитокинового статусу за умови експериментального ожиріння

Показник	ІМТ	Активні форми кисню	ТБК-активні продукти	Окисно-модифіковані протеїни	Сумарні метаболіти оксиду азоту
Анексин-позитивні клітини	0,58*	0,57*	-0,34	0,51	0,27
Показник	Лептин	Загальний холестерол	Триацил-гліцерили	TNF-α	IL-6
Анексин-позитивні клітини	0,65*	0,80*	0,82*	0,78*	0,89*

Примітки:

1. 0,7–1,0 – сильна залежність; 0,30–0,69 – середня залежність; 0–0,29 – слабка залежність.
2. \* – достовірність відмінностей коефіцієнтів кореляції (p<0,05).

**ВИСНОВОК.** В активації програмованої загибелі клітин за умови аліментарного ожиріння у щурів, що характеризується підвищенням у 2,1 раза відсотка анексин-позитивних клітин

лейкоцитарної суспензії, значну роль відіграють порушення імунологічної реактивності поруч зі зростанням концентрації лептину, загального холестеролу і триацилгліцеролів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пасієшвілі Л. М. Ожиріння як соціальна проблема. Етапи формування в осіб із захворюваннями біліарного каналу / Л. М. Пасієшвілі, Н. М. Железнякова, Т. М. Пасієшвілі // Сучасна гастроентерологія. – 2008. – № 6. – С. 6–9.
2. O'Rahilly S. Genetics of obesity / S. O'Rahilly, I. S. Farooqi // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2006. – **361**, № 1471. – P.1095–1105.
3. Plourde G. Managing obesity in adults in primary care / G. Plourde, D. Prud'homme // CMAJ. – 2012. – **184**, № 9. – P. 1039–1044.
4. Скомороха О. Динамика показателей сердечно-сосудистой системы женщин с алиментарно-конституциональной формой ожирения I–II степени при синдроме поликистозных яичников под влиянием программы физической реабилитации / О. Скомороха // Фізичне виховання, спорт і культура здоров'я у сучасному суспільстві. – 2012. – № 3. – С. 308–311.
5. Кулешова Д. К. Особенности гормональной регуляции антиоксидантной активности крови при нейроэндокринном ожирении на разных стадиях полового созревания / Д. К. Кулешова, В. В. Давыдов, Е. А. Будрейко // Міжнар. ендокрин. журн. – 2012. – № 4. – С. 10–14.
6. Молодан Д. В. Особенности перекисного окисления липидов при гипертонической болезни с ожирением и гиперурикемией / Д. В. Молодан // Журн. клініч. та експерим. мед. дослідж. – 2013. – **1**, № 3. – С. 341–346.
7. Петринич О. А. Вплив ожиріння на показники пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту у хворих на гіпертонічну хворобу / О. А. Петринич // Клініч. та експерим. патологія. – 2014. – **13**, № 1. – С. 98–100.
8. Аметов А. С. Ожирение – эпидемия XXI века / А. С. Аметов // Терапевт. арх. – 2002. – № 10. – С. 5–7.
9. Jeyakumar S. M. Chronic dietary vitamin A supplementation regulates obesity in an obese mutant WNIN/Ob rat model / S. M. Jeyakumar, A. Vajreswari, N. V. Giridharan // Obesity. – 2006. – **14**. – P. 52–59.
10. Криницька І. Я. Рівень апоптично- та некротично змінених моноцитів та альвеолярних макрофагів за умови експериментального гепатопульмонального синдрому / І. Я. Криницька // Світ медицини та біології. – 2013. – № 2 (38). – С. 46–49.

## АПОПТИЧЕСКАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК И ПУТИ ЕЕ ИНИЦИАЦИИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖИРЕНИЯ

### Резюме

В статье на модели экспериментального алиментарного ожирения исследован уровень апоптически и некротически измененных клеток лейкоцитарной суспензии крови и установлена их взаимосвязь с показателями свободнорадикального окисления, цитокинового статуса, углеводного и липидного обмена. Методами статистического анализа показано, что в активации программируемой гибели клеток при алиментарном ожирении у крыс, которая характеризуется повышением в 2,1 раза процента аннексин-положительных клеток лейкоцитарной суспензии, значительную роль играют нарушения иммунологической реактивности вместе с ростом концентрации лептина, общего холестерина и триацилглицеролов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ожирение, апоптоз, факторы инициации.

M. I. Marushchak

I. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

## АПОПТОТИК КЕЛЛ ДЕАТХ АНД ВАЙС ОФ ИТС ИНИЦИАТИОН ИН КАСЕ ОФ ЕХПЕРИМЕНТАЛ ОБЕСИТИ

### Summary

In the article there were studied the levels of altered apoptotic and necrotic cells of blood leukocyte suspension and their correlation with indicators of free radical oxidation, cytokine status, carbohydrate and lipid metabolism on experimental models of obesity. Methods of statistical analysis are showed that the activation of programmed cell death during experimental obesity in the rats is characterized by an increase of the percentage of annexin-positive leukocyte in 2.1 times in cell suspension. Violation of immunological reactivity together with increasing concentrations of leptin, total cholesterol and triacylglycerols levels plays a significant role in this changes.

KEY WORDS: obesity, apoptosis, initiation factor.

Отримано 28.10.16

Адреса для листування: М. І. Марущак, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: marushchak@tdmu.edu.ua.