

УДК 612.015.31-06:616-056.52-091.8]-092.9  
DOI

©М. І. Марущак, І. В. Антонишин, Г. Г. Габор, А. В. Бржиський  
ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”

## ВПЛИВ ДИСБАЛАНСУ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА РЕГУЛЯЦІЮ АПОПТОЗУ В ЩУРІВ З АЛІМЕНТАРНИМ ОЖИРІННЯМ

ВПЛИВ ДИСБАЛАНСУ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА РЕГУЛЯЦІЮ АПОПТОЗУ В ЩУРІВ З АЛІМЕНТАРНИМ ОЖИРІННЯМ – Метою роботи було дослідити вміст макро- та мікроелементів у крові експериментальних тварин та оцінити їх вплив на рівень апоптичної загибелі ядровмісних клітин крові за умови аліментарного ожиріння. Експериментальну модель аліментарного ожиріння відтворювали шляхом застосування індуктора харчового потягу – натрієвої солі глютамінової кислоти у співвідношенні 0,6:100,0 і висококалорійної дієти. Аналіз отриманих даних вказує на підвищення у 2,1 раза відсотка апоптичних клітин ( $p < 0,05$ ) при експериментальному дієтичному аліментарному ожирінні, рівень некротично загиблих клітин при цьому залишається у межах встановленої норми. Визначення вмісту окремих макро- і мікроелементів у крові щурів при аліментарному ожирінні вказують на зниження рівня заліза (9,5 %), магнію (на 36,3 %) і цинку (на 38,2 %) та зростання загального й іонізованого кальцію (на 56,0 %) ( $p < 0,05$ ). Методом множинної лінійної регресії встановлено, що за умови експериментального аліментарного ожиріння як магній, так і цинк мають самостійний вплив на перебіг апоптичної загибелі клітин, однак при поєднанні кальцію, магнію і цинку максимальний вплив має цинк.

ВЛИЯНИЕ ДИСБАЛАНСА МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА РЕГУЛЯЦИЮ АПОПТОЗА В КРЫС С АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ – Целью работы было исследовать содержание макро- и микроэлементов в крови экспериментальных животных и оценить их влияние на уровень апоптической гибели ядровместительных клеток крови при алиментарном ожирении. Экспериментальную модель алиментарного ожирения воспроизвели путем применения индуктора пищевого влечения – натриевой соли глютаминовой кислоты в соотношении 0,6:100,0 и высококалорийной диеты. Анализ полученных данных указывает на повышение в 2,1 раза процента апоптических клеток при экспериментальном диетиндуцированном алиментарном ожирении, уровень некротически погибших клеток при этом остается в пределах установленной нормы. Определение содержания отдельных макро- и микроэлементов в крови крыс при алиментарном ожирении указывают на снижение уровня железа (9,5 %), магния (на 36,3 %) и цинка (на 38,2 %) и рост общего и ионизированного кальция (на 56,0 %) ( $p < 0,05$ ). Методом множественной линейной регрессии установлено, что при условии экспериментального алиментарного ожирения как магний, так и цинк имеют самостоятельное влияние на протекание апоптической гибели клеток, однако при сочетании кальция, магния и цинка максимальное влияние имеет цинк.

IMBLANCE INFLUENCE OF MICROELEMENTS ON THE REGULATION OF APOPTOSIS IN RATS WITH ALIMENTARY OBESITY – The aim of the work was to investigate the content of macro- and micronutrients in the blood of experimental animals and assess their impact on the apoptotic death of blood nucleus content cells provided by alimentary obesity. The experimental model of alimentary obesity reproduced by applying the inductor food craving – sodium salt of glutamic acid in a ratio of 0.6: 100.0 and high-calorie diet. Alimentary obesity, modeled after 28 days excessive calories diets is characterized by increase of 2.1 times the percentage of apoptotic cells and necrotic level of dead cells remained within the established norm. Determination of some macro- and microelements in the blood of rats with alimentary obesity indicate reduction of the iron (9.5 %), magnesium (36.3 %) and zinc (38.2 %) and increased of total and ionized calcium (at 56.0 %) level ( $p < 0.05$ ). The method

of multiple linear regression revealed that during the experimental alimentary obesity magnesium and zinc have an independent effect on the course of apoptotic cell death, but in case of the calcium, magnesium and zinc combination the zinc has maximum impact.

**Ключові слова:** аліментарне ожиріння, мікроелементи, апоптоз.

**Ключевые слова:** алиментарное ожирение, микро-элементы, апоптоз.

**Key words:** alimentary obesity, microelement apoptosis

**ВСТУП** Дані про поширеність ожиріння в Україні залишаються незначними, та й ті не є репрезентативними як для країни, так і для конкретних груп. Рання діагностика надмірної маси тіла й ожиріння має велике значення для громадської охорони здоров'я, оскільки лікування у початковій фазі життя може бути ефективнішим і менш витратним для держави. Головний позаштатний дієтолог МОЗ України Олег Швець в одному інтерв'ю повідомив, що в Україні половина людей – і чоловіків, і жінок мають надмірну масу, а понад 20 % – ожиріння [9]. В. І. Паньків стверджує, що ожиріння виявляють майже в 30 % працездатного населення України, а надмірну масу тіла має кожний четвертий житель [6]. На прикладі Тернопільської області дослідники показали, що впродовж 2010–2012 рр. у структурі ендокринної захворюваності переважали цукровий діабет, патологія щитоподібної залози й ожиріння [5]. В одному з досліджень встановлено, що проблеми з надмірною масою має більше половини дорослого населення України, причому жінки в 1,7 раза хворіють частіше на ожиріння, ніж чоловіки [12].

На даний час відомо, що за умови тривалого високого вмісту насичених жирних кислот у крові активуються внутрішньоклітинні шляхи пошкодження клітини за рахунок оксидативного стресу [8]. Нещодавно було показано, що високим вмістом жирів, спричинених ожирінням, також корелює з мітохондріальною дисфункцією і підвищенням окисного стресу в печінці [10]. Вагому роль у процесах вільнорадикального окиснення відіграють макро- та мікроелементи. Так, залізо й мідь, з однієї сторони, виступають ланцюгами вільнорадикальних реакцій, а цинк і марганець, з іншої, – антиоксидантами, які контролюють окисні процеси. Відомо також роль мікроелементів у процесах програмованої загибелі клітин, зокрема дефіцит цинку й магнію потенціюють апоптоз [18], велике значення також має кальцій у механізмах загибелі клітини [2].

Метою роботи було дослідити вміст макро- та мікроелементів у крові експериментальних тварин та оцінити їх вплив на рівень апоптичної загибелі ядровмісних клітин крові за умови аліментарного ожиріння.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** Експериментальні дослідження проводили на статевозрілих нелінійних білих щурах-самцях масою від 160,0 г до 180,0 г відповідно до Женевської конвенції “International Guiding principles for Biochemical research involving animals” (Geneva, 1990) та згідно з загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001). Щури перебували в належних санітарно-гігієнічних умовах віварію ДВНЗ

“Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”.

Експериментальну модель аліментарного ожиріння відтворювали шляхом застосування індуктора харчового потягу – натрієвої солі глютамінової кислоти у співвідношенні 0,6:100,0 та висококалорійної дієти, яка складається із стандартної їжі (47 %), солодкого концентрованого молока (44 %), кукурудзяної олії (8 %) і рослинного крохмалю (1 %) [7]. Контроль відтворення 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).

Тварин поділили на дві групи: контрольна група – інтактні тварини (6 щурів); дослідна група 1 – термін спостереження через 14 днів після початку експерименту (6 щурів), дослідна група 2 – термін спостереження через 14 днів після початку експерименту (6 щурів).

Ядровмісні клітини крові (ЯКК) виділяли методом седиментації в фікол-урографіні. Вміст міді та цинку в крові визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С115-М1 з електротермічним атомізатором виробництва HBO Selmі (Україна), який оснащений комп'ютерною приставкою для автоматичного обчислювання вмісту МЕ. Рівень загального й іонізованого кальцію, заліза визначали в сироватці крові загальноприйнятими методами [3]. Результати досліджень оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми “MS Excel” із використанням t-критерію Стюдента та методів лінійної регресії.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих даних вказує на зростання відсотка ядровмісних клітин з явищами апоптозу в 1,6 раза вже через 14 діб експерименту, тоді як відсоток некротичних клітин

залишався у межах контрольних значень. Аліментарне ожиріння, змодельоване через 28 діб гіперкалорійної дієти, характеризувалося підвищенням у 2,1 раза відсотка апоптичних клітин, а рівень некротично загиблих клітин продовжував залишатися у межах встановленої норми. Потрібно відмітити, що відсоток апоптично змінених клітин через 28 діб експерименту на 58,4 % перевищував отримані дані через 14 діб ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). Отримані дані узгоджуються з попередньо проведеними дослідженнями, які вказують на активацію пероксидного окиснення ліпідів [1], що, на нашу думку, ініціює загибель клітин шляхом апоптозу.

Наступним етапом нашого дослідження було визначити вміст окремих макро- та мікроелементів у крові щурів за умови дієтизованого ожиріння (табл. 1). Встановлено достовірне зростання рівня загального кальцію у другій дослідній групі, яке перевищувало приблизно на 25,0 % дані контрольної і першої дослідної груп. Таку ж тенденцію відмічено щодо змін іонізованого кальцію, який через 28 діб експерименту зростав у середньому на 56,0 % стосовно контролю і даних через 14 діб ( $p < 0,05$ ). Отримане зростання рівня кальцію в сироватці крові можна пояснити остеокластною активністю і кістковою резорбцією за рахунок зростання прозапальних цитокінів при аліментарному ожирінні. Ряд авторів встановив зростання рівня кальцію у крові при одночасному зростанні рівня тригліцеридів, хоча відсутній механізм їх взаємозалежності [13]. Аналіз рівня магнію показав його зниження у другій дослідній групі в середньому на 36,0 % відносно показників контролю і перша група ( $p < 0,05$ ). Одним з механізмів такої різноспрямованої зміни цих двох мікроелементів при аліментарному ожирінні є розвиток запалення, що підтверджується зростанням фактора некрозу пухлин-альфа. L. Overbergh та співавт. у своєму дослідженні [16] показали, що фактори некрозу пухлини активує ниркову 1- $\alpha$ -гідроксилазу і 1,25(OH)<sub>2</sub> ві-

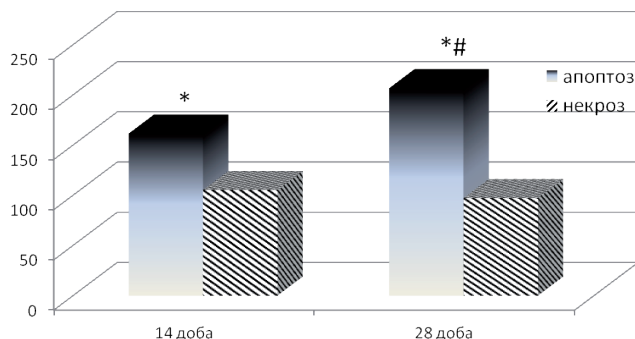


Рис. 1. Показники програмованої загибелі ядровмісних клітин крові у динаміці розвитку аліментарного ожиріння у щурів.

Примітка: 1) \* – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами;

2) # – різниця достовірна порівняно з ураженими тваринами.

Таблиця 1. Показники вмісту окремих макро- та мікроелементів у крові щурів за умови дієтизованого ожиріння (M±m)

Показник	Контрольна група (n=6)	Дослідна група 1 (n=6)	Дослідна група 2 (n=6)
Кальцій загальний, ммоль/л	2,30±0,04	2,33±0,03	2,87±0,05
		$p_1 > 0,05$	$p_1 < 0,05$ ; $p_2 < 0,05$
Кальцій іонізований, ммоль/л	0,64±0,02	0,68±0,01	1,00±0,03
		$p_1 > 0,05$	$p_1 < 0,05$ ; $p_2 < 0,05$
Залізо, ммоль/л	8,79±0,11	8,59±0,11	7,96±0,10
		$p_1 > 0,05$	$p_1 < 0,05$ ; $p_2 < 0,05$
Магній, мг/г	0,72±0,02	0,75±0,04	0,46±0,03
		$p_1 > 0,05$	$p_1 < 0,05$ ; $p_2 < 0,05$
Цинк, мкг/г	1,37±0,05	1,08±0,03	0,85±0,03
		$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$ ; $p_2 < 0,05$

Примітки: 1)  $p_1$  – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами;

2)  $p_2$  – різниця достовірна порівняно з ураженими тваринами.

тамін D, які підвищують реабсорбцію кальцію в нирках і виведення магнію.

За умови дієтизованого ожиріння встановлено зниження рівня сироваткового заліза у другій дослідній групі на 9,4 % проти результатів контролю. Такі зміни вмісту заліза при аліментарному ожирінні можна пояснити зростанням рівня гепсидину – регуляторного білка, який продукується не тільки гепатоцитами, але й жировою тканиною, і безпосередньо знижує абсорбцію заліза в тонкій кишці й блокує його вихід з макрофагів. Наші припущення підтверджуються результатами ряду досліджень щодо гепсидинопосередкованого інгібування всмоктування заліза з їжею в пацієнтів з ожирінням [11, 14, 15]. Зниження рівня цинку в тварин із змодельованим патологічним процесом спостерігалось вже через 14 діб експерименту (на 21,2 %) з продовженням його депресії до 28-ї доби (38,0 %) і можна пояснити тим, що цинк, імовірно, є посередником ефектів лептину [19].

Аналіз динаміки змін макро- та мікроелементів у крові щурів показав, що найбільший розмах змін характерний для магнію (40,0 %), тоді як найменший – для сироваткового заліза (7,1 %) (рис. 2). Це дало підстави включити в рівняння множинної регресії величину апоптозу як ре-

зультативну ознаку для побудови моделі, а факторами відповідно загальний кальцій, магній і цинк.

Коефіцієнт детермінації рівняння становив  $R=0,85$ , який свідчив про те, що рівень апоптозу за умови аліментарного ожиріння у 84,7 % залежить від рівня кальцію, магнію і цинку, при цьому найвагомий від'ємний вплив  $(-10,98)$  має цинк (табл. 2). Лінійна регресійна модель за даних умов виглядає так:  $PO=16,19 \cdot 0,45 \times \Phi_1 + 0,91 \times \Phi_2 - 10,98 \times \Phi_3$ .

Потрібно відмітити, що вивчаючи покроково вплив кожного мікроелемента на рівень апоптичної загибелі, встановлено, що коефіцієнт детермінації рівняння для загального кальцію становив  $(R=0,41)$ , для магнію –  $(R=0,82)$  і для цинку –  $(R=0,85)$ . Отримані дані вказують, що за умови експериментального аліментарного ожиріння як магній, так і цинк мають самостійний вплив на перебіг апоптичної загибелі клітин, проте поєднання цих трьох біоелементів зумовлює максимальний вплив цинку. Отримані результати зіставили з літературними даними, які вказують на те, що цинк може виконувати роль фактора виживання, і, відповідно, дефіцит цього мікроелемента згідно з гіпотезою програмованої клітинної загибелі, зумовлювати апоптоз та некроз [4, 17].

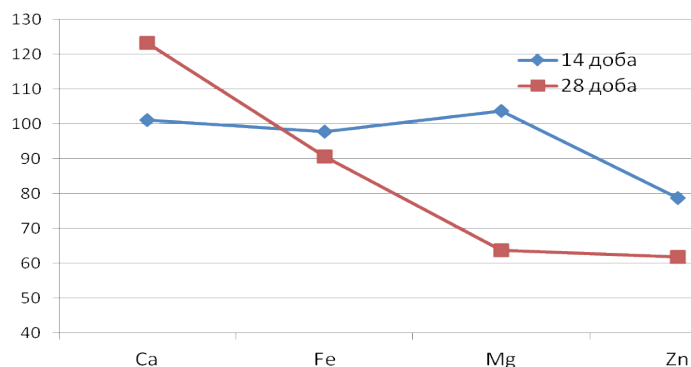


Рис. 2. Динаміка біоелементів у крові щурів за умови дієтизованого ожиріння.

Таблиця 2. Параметри множинної лінійної регресії залежності рівня апоптозу від вмісту біоелементів у крові щурів з аліментарним ожирінням

Параметри	Коефіцієнти	Стандартна похибка	t-статистика	P-значення
Результативна ознака – апоптоз (PO)	16,19	19,98	0,81	0,50
Фактор 1 – загальний кальцій (Ф1)	-0,45	4,05	-0,11	0,92
Фактор 2 – магній (Ф2)	0,91	23,79	0,04	0,97
Фактор 3 – цинк (Ф3)	-10,98	24,61	-0,45	0,70

**ВИСНОВКИ 1.** Експериментальне дієтизоване аліментарне ожиріння характеризується підвищенням у 2,1 раза відсотка апоптичних клітин ( $p<0,05$ ), рівень некритично загиблих клітин при цьому залишається у межах встановленої норми.

2. Визначення вмісту окремих макро- та мікроелементів у крові щурів за умови дієтизованого ожиріння вказують на зниження рівня заліза (9,5 %), магнію (на 36,3 %) і цинку (38,2 %) та зростання загального й іонізованого кальцію (на 56,0 %) ( $p<0,05$ ).

3. Методом множинної лінійної регресії встановлено, що за умови експериментального аліментарного ожиріння як магній, так і цинк мають самостійний вплив на перебіг апоптичної загибелі клітин, проте поєднання кальцію, магнію і цинку зумовлює максимальний вплив цинку.

**Перспективи подальших досліджень** Планується провести методом множинної лінійної регресії залежність рівня показників вуглеводного і ліпідного обміну від вмісту біоелементів у крові щурів з аліментарним ожирінням.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонишин І. В. Стан пероксидного окиснення ліпідів при експериментальному дієтизованому аліментарному ожирінні / І. В. Антонишин, М. І. Марущак, О. В. Денефіль // Медична хімія. – 2014. – Т. 16 (3). – С. 61–65.
2. Голубев А. М. Апоптоз при критических состояниях / А. М. Голубев, Е. Ю. Москалева, С. Е. Северин // Общая реаниматология. – 2006. – Т. II, № 5–6. – С. 184–190.
3. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика / В. С. Камышников // Справочник в 2-х томах. – Мн.: Интерпрессервис, 2003. – 495 с.
4. Карзакова Л. М. Дефицит цинка индуцирует Fas-опосредованный апоптоз / Л. М. Карзакова // Медицинская Иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 441–443.
5. Марущак М. І. Динаміка захворюваності на ендокринопатії серед дорослого населення Тернопільської області / М. І. Марущак, Х. І. Козак, О. В. Денефіль // Український терапевтичний журнал. – 2014. – № 2. – С. 85–88.
6. Ожиріння як медико-соціальна проблема [Електронний ре-

сурс] / В.І. Паньків // Практична ангіологія. – Режим доступу: <http://angiology.com.ua/article/55.html> 2

7. Пат. № 87711 Україна, МПК (2006.01) А 61 К 31/195. Спосіб моделювання аліментарного ожиріння / М. І. Марущак, І. В. Антонишин, О. П. Мялюк, Ю. М. Орел, І. Я. Криницька – № у 2013 12044 ; заявл. 14.10.2013 ; опубл. 10.02.2014, Бюл. № 3. 9

8. Патолофізіологічна роль адипонектину в розвитку ожиріння та супутніх захворювань / Н. М. Кобиляк, Г. П. Михальчишин, О. А. Савченко, Т. М. Фалалєєва // Мир медицини и биологии. – 2013. – № 2–3 (40). – С. 81–87.

9. Світова епідемія ожиріння торкнулася й України – головний позаштатний дієтолог МОЗ [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http://www.ukrinform.ua/ukr/news/svtova\\_epdemya\\_ogirnnya\\_torknulasya\\_u\\_ukrani\\_golovniy\\_pozashtatniy\\_dtolog\\_moz\\_1049772](http://www.ukrinform.ua/ukr/news/svtova_epdemya_ogirnnya_torknulasya_u_ukrani_golovniy_pozashtatniy_dtolog_moz_1049772) 1

10. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity / T. P. Combs, U. B. Pajvani, A. H. Berg [et al.] // Endocrinology. – 2004. – Vol. 145. – P. 367–383.

11. Aeberli I. Overweight children have higher circulating hepcidin concentrations and lower iron status but have dietary iron intakes and bioavailability comparable with normal weight children / I. Aeberli, R. F. Hurrell, M. B. Zimmermann // Int. J. Obes. – 2009. – Vol. 33. – P. 1111–1117. 13

12. Сучасні підходи до фізичної реабілітації осіб з надлишковою масою тіла та ожирінням в умовах навчання у вузі [Електронний ресурс] / Дуб Мар'яна, Ксенія Мелега. – Режим доступу: // <http://dspace.uzhnu.edu.ua:8080/jspui/bitstream/lib/1228/1/%D0%94%D>

[1%D0%83%D0%B1\\_%D0%9C%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%B3%D0%B0\\_%20%D0%A1%D1%83%D1%87%D0%B0%D1%81%D0%BD%D1%96%20%D0%BF%D1%96%D0%B4%D1%85%D0%BE-%D0%B4%D0%B8.pdf](http://dspace.uzhnu.edu.ua:8080/jspui/bitstream/lib/1228/1/%D0%94%D0%83%D0%B1_%D0%9C%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%B3%D0%B0_%20%D0%A1%D1%83%D1%87%D0%B0%D1%81%D0%BD%D1%96%20%D0%BF%D1%96%D0%B4%D1%85%D0%BE-%D0%B4%D0%B8.pdf) 4

13. Dalfradi O. The correlation of serum calcium level and obesity: is there an explanation? / O. Dalfradi, D. Jahandideh, G. H. R. Omrani // GMJ. – 2013. – № 2 (1). – P. 26–31.

14. Elevated systemic hepcidin and iron depletion in obese premenopausal females / L. M. Tussing-Humphreys, E. Nemeth, G. Fantuzzi [et al.] // Obesity. – 2010. – Vol 18. – P. 1449.

15. Hecpudin in obese children as a potential mediator of the association between obesity and iron deficiency / E. Miraglia del Giudice, N. Santoro, A. Amato [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 94. – P. 5102–5107.

16. Identii cation and immune regulation of 25 hydroxyvitamin D 1 hydroxylase in murine macrophages / L. Overbergh, B. Decallonne, D. Valckx, A. Verstuyf [ et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2000. – Vol. 120. – P. 139–146.

17. Induction of cell proliferation and apoptosis: dependence on the dose of the inducer / T. Das, G. Sa, P. Sinha, P. K. Ray // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1999. – Vol. 260. – № 1. – P. 105–110.

18. Prasad A. S. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation / A. S. Prasad // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care – 2009. – Vol. 12 (6). – P. 646–652.

19. Relationship between plasma leptin and zinc levels and the effect of insulin and oxidative stress on leptin levels in obese diabetic patients / D. Konukoglu, M. S. Turhan, M. Ercan, O. Seri // The journal of Nutritional Biochemistry. – 2004. – Vol. 15 (12). – P. 756–760.

Отримано 17.06.15

*Дана робота є частиною науково-дослідної роботи “Патогенетичні закономірності та інформаційні моделі розвитку патологічних процесів за умов дії надзвичайних факторів на організм та їх корекція” (№ 0113U001239).*