

ВЛИЯНИЕ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ НА СОДЕРЖАНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ

Е.Р. Гатиатулина

ассистент, кафедра биологической химии, Оренбургский государственный медицинский университет; соискатель, Южно-Уральский государственный медицинский университет (г. Челябинск)

Е.В. Попова

к.м.н., доцент, Оренбургский государственный медицинский университет

В.С. Полякова

д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии, Оренбургский государственный медицинский университет

А.А. Скальная

студентка, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Э.Ф. Аглетдинов

д.м.н., профессор, кафедра патофизиологии, Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа)

Е.А. Никонорова

ассистент, кафедра медицинской элементарологии, Российский университет дружбы народов (Москва)

А.В. Скальный

д.м.н., профессор, Институт биоэлементарологии (Российский спателлитный центр Института микроэлементаров при ЮНЕСКО), Оренбургский государственный университет; Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова; Российский университет дружбы народов; Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

А.А. Тиньков

к.м.н., ассистент, кафедра биологической химии, Оренбургский государственный медицинский университет; Институт биоэлементарологии (Российский спателлитный центр Института микроэлементаров при ЮНЕСКО), Оренбургский государственный университет; Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова; Российский университет дружбы народов (Москва)
E-mail: tinkov.a.a@gmail.com

Изучено влияние диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП) на микроэлементарный баланс в печени крыс. Показано, что НЖБП вызывает существенный дисбаланс микроэлементаров в печени крыс. Выявлено абсолютное снижение содержания в печени кобальта, меди, йода, лития, марганца, селена и цинка и относительное – марганца и селена.

Ключевые слова: дистрофия печени, стеатоз, печень; микроэлементары, селен, марганец.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП) представляет собой заболевание, характеризующееся накоплением триглицеридов в клетках печени (количество измененных гепатоцитов > 5%) у пациентов, не имеющих в анамнезе употребления алкоголя в гепатотоксичных дозах (> 30 г/сутки этанола для мужчин и 20 г/сутки – для женщин) с последующим нарушением их функции. Встречаемость НЖБП среди населения довольно высока и составляет около 35% в мире [1]. Неалкогольная жировая болезнь печени тесно связана с ожирением, дисбалансом адипокинов, про-/противовоспалительных цитокинов [2], а также считается печеночным проявлением метаболического синдрома [3]. Однако первопричина

данного заболевания до сих пор неясна и не может быть высказана однозначно. При этом нельзя отрицать огромного влияния окружающей среды на развитие таких патологических состояний, как ожирение [4], метаболический синдром и НЖБП [5].

Доказана связь между повышенным поступлением мышьяка, кадмия и некоторых других токсичных тяжелых металлов и развитием НЖБП [6]. Известно, что нарушение гомеостаза меди и железа способствует развитию НЖБП [7], однако литературные данные по этой проблеме неоднозначны [8–10]. Учитывая ключевую роль инсулинорезистентности и окислительного стресса (ОС) в патогенезе НЖБП, можно предположить существенное влияние хрома, ванадия, цинка и селена на развитие

и прогрессирование данного заболевания. Однако сведения о взаимосвязи микроэлементов (МЭ) и НЖБП немногочисленны и противоречивы.

Цель работы – выявление изменения содержания эссенциальных и токсических МЭ в печени при экспериментальной диетиндуцированной НЖБП.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили на 56 самках крыс линии Wistar в течение 6 недель согласно протоколу исследования, одобренному Локальным этическим комитетом, и в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации 1975 г. и ее пересмотренного варианта 2008 г.

Животных разделели на две равные группы ($n = 28$) и содержали на стандартной (СТД) и высококалорийной (ВКД) диетах в течение шести недель. Все животные имели свободный доступ к еде и питьевой воде. В качестве СТД использовали стандартный гранулированный корм, содержащий 270 ккал/100 г (10% жира). Высококалорийная диета была основана на добавлении свиного сала к СТД и 10%-ного раствора сахарозы вместо питьевой воды и содержала 429 ккал/100 г (60% жиров). Достоверных различий в минеральном составе диет не выявлено.

Определение содержания МЭ проводили с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе Nexion 300D («Perkin Elmer Inc.», США), после микроволнового разложения образцов. Полученные данные были

проанализированы с использованием Statistica 10.0 («Statsoft», США). Результаты представлены в виде медианы и величин 25 и 75 перцентилей, их сравнительный анализ проводили с использованием U-теста Манн–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическое исследование печени. Полученные данные показали, что крысы, находящиеся на СТД, имели нормальную гистологическую картину печени в перипортальной (ПП) (рис. 1,а) и центрлобулярной (ЦЛ) зонах (рис. 1,б). Средняя площадь ядер гепатоцитов в ЦЛ и ПП зонах составляли 84 (72–98) и 88 (73–100) мкм^2 соответственно. Цитоплазматические включения отсутствовали. У крыс с ВКД выявлялись крупные липидные включения в цитоплазме гепатоцитов, особенно в ПП зонах (рис. 2,а). Данные зоны характеризовались баллонной дистрофией и некрозом гепатоцитов. В ЦЛ гепатоцитах наблюдался мелко- и крупнокапельный стеатоз (рис. 2,б), но в отличие от ПП зон некроз гепатоцитов встречался менее часто. Примечательно, что данные изменения у животных с ВКД были выявлены в 100% случаях. Средний размер липидных капель в клетках в ПП и ЦЛ зонах составил 101 (58–198) и 88 (54–143) мкм^2 , при этом средняя площадь ядер гепатоцитов в ЦЛ и ПП зонах у животных с ВКД была ниже на 25 ($p < 0,001$) и 30% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем и составила 63 (54–76) и 62 (53–75) мкм^2 соответственно.

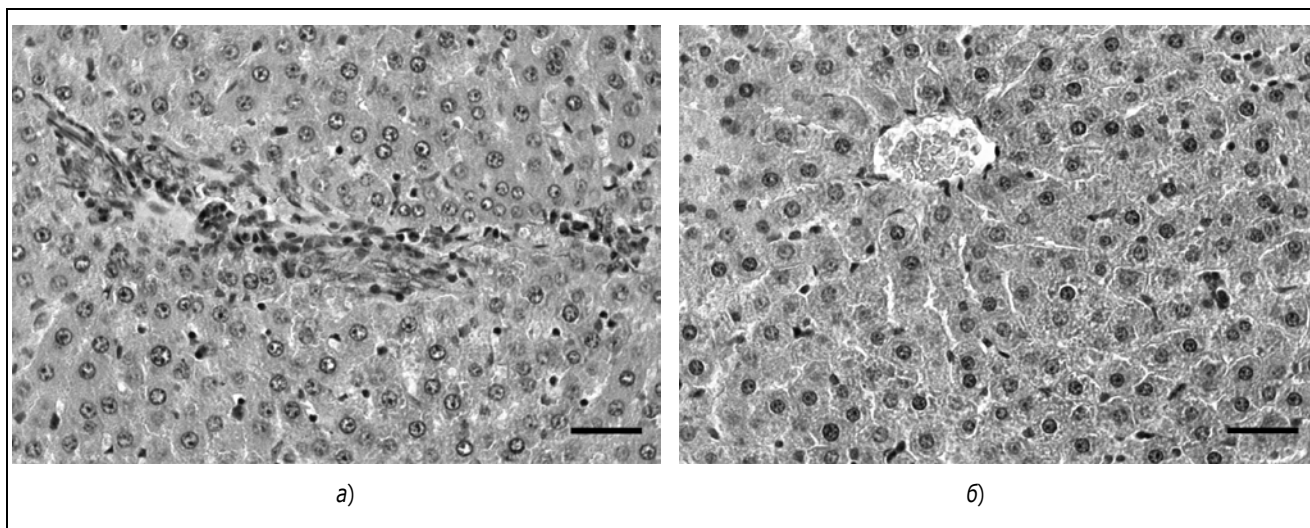


Рис. 1. Гистологическая картина печени СТД-животных: а – перипортальная зона; б – центрлобулярная зона

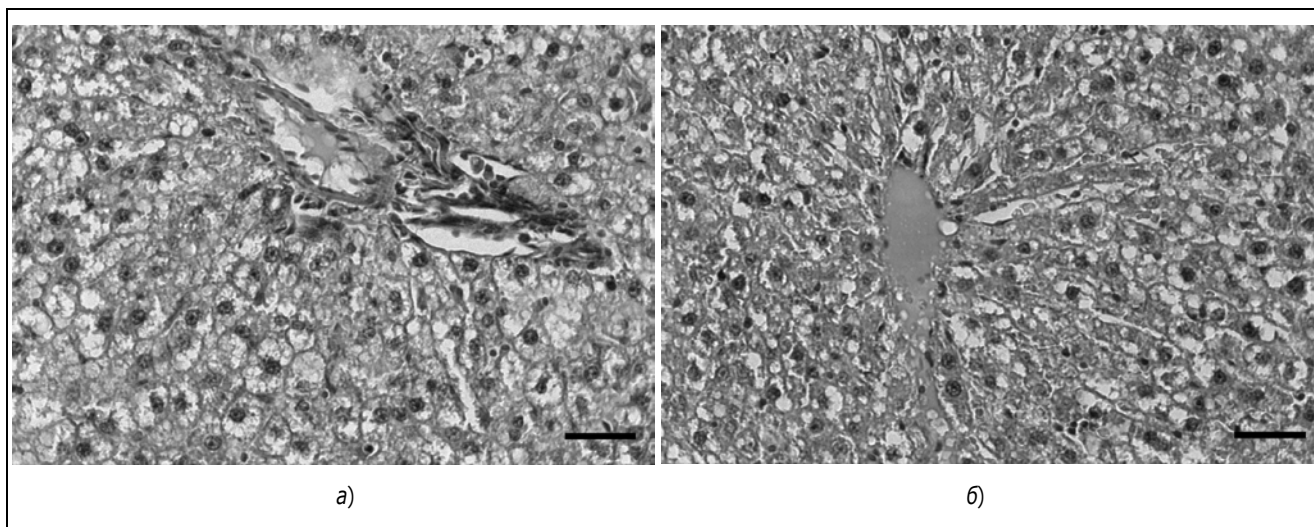


Рис. 2. Гистологическая картина печени ВКД-животных: а – перипортальная зона; б – центрлобулярная зона

Таблица 1. Абсолютное содержание МЭ в печени крыс, мг/г ткани

МЭ	Группа		p
	Контроль	НЖБП	
Co	0,122 (0,099–0,148)	0,081 (0,0675–0,096)	< 0,001 *
Cr	0,211 (0,1–0,327)	0,196 (0,1105–0,2775)	0,695
Cu	5,12 (4,86–5,48)	4,37 (3,73–5,17)	0,003 *
Fe	339 (311–376)	313 (262–349)	0,072
I	0,134 (0,081–0,154)	0,087 (0,024–0,1145)	0,016*
Li	0,0040 (0,0021–0,0061)	0,0028 (0,0008–0,0036)	0,034*
Mn	2,29 (1,99–2,60)	1,46 (1,38–1,57)	< 0,001*
Se	1,24 (1,19–1,32)	0,697 (0,546–0,847)	< 0,001*
V	0,0078 (0,006–0,011)	0,0069 (0,0054–0,0100)	0,301
Zn	35 (33,24–37,66)	26,99 (22,82–29,11)	< 0,001 *
Al	0,771 (0,548–1,23)	0,746 (0,5905–0,9755)	0,901
As	0,091 (0,078–0,109)	0,074 (0,0615–0,088)	0,015*
Cd	0,023 (0,019–0,026)	0,0145 (0,013–0,02)	< 0,001*
Ni	0,014 (0,0098–0,019)	0,0145 (0,012–0,018)	0,775
Sr	0,026 (0,02–0,036)	0,0355 (0,026–0,045)	0,081

Примечание: данные представлены как медиана и величины 25–75 перцентилей; * – достоверность различий $p < 0,05$ в соответствии с U-тестом Манн–Уитни.

Полученные данные абсолютного содержания МЭ в печени крыс свидетельствуют о том, что НЖБП вызывает значительные изменения содержания эссенциальных и токсических МЭ в ткани печени (табл. 1.) в виде снижения кобальта, меди, йода, лития, марганца, селена и цинка на соответственно 33, 14, 35, 30, 36, 44 и 22%, и 18 и 37% мышьяка и кадмия по сравнению с контролем. Уменьшение содержания железа на 7% не было

достоверным. Интересен факт повышения уровня стронция на 37% по сравнению с контрольными значениями, однако данное изменение не было статистически значимым. Следует отметить, что относительное содержание МЭ в печени при данном воздействии было более стабильным. Так, месячный курс ВКД сопровождался снижением уровня марганца и селена соответственно на 25 и 35% и увеличением стронция на 60% (табл. 2).

Таблица 2. Относительное содержание МЭ в печени крыс, нг/мг белка

МЭ	Группа		p
	Контроль	НЖБП	
Co	0,578 (0,402–0,800)	0,410(0,339–0,600)	0,132
Cr	0,711 (0,535–1,384)	1,14 (0,56–1,56)	0,624
Cu	24,62 (18,91–29,95)	23,86 (18,30–29,98)	0,936
Fe	1551 (1127–2055)	1690 (1281–1916)	0,504
I	0,474 (0,358–0,754)	0,460 (0,109–0,638)	0,322
Li	0,016 (0,010–0,023)	0,011 (0,006–0,021)	0,202
Mn	10,48 (8,06–12,29)	7,78 (5,82–10,51)	0,022*
Se	5,54 (4,47–7,12)	3,59 (2,53–5,04)	0,002*
V	0,040 (0,026–0,067)	0,036 (0,027–0,058)	0,964
Zn	163,98 (124,99–216,04)	148,53 (109,2–183,6)	0,250
Al	3,58 (2,41–6,09)	4,17 (3,03–6,55)	0,281
As	0,394 (0,320–0,625)	0,389 (0,296–0,541)	0,624
Cd	0,109 (0,088–0,136)	0,093 (0,060–0,117)	0,127
Ni	0,060 (0,043–0,109)	0,076 (0,058–0,114)	0,215
Sr	0,122 (0,094–0,251)	0,195 (0,140–0,266)	0,048*

Примечание: см. табл. 1.

Таким образом, процесс развития НЖБП характеризуется значительным изменением содержания МЭ в печени, особенно селена и марганца. Учитывая существенную роль ОС в патогенезе НЖБП, можно предположить, что снижение концентрации селена в печени связано с его повышенной потребностью, необходимой для реализации действия антиоксидантных систем. Применительно к марганцу следует отметить, что ранее не было зафиксировано нарушений обмена данного МЭ в ответ на ВКД. Однако данные о снижении активности Mn-SOD у самцов мышей, страдающих ожирением [11], косвенно свидетельствуют о его возможной роли в развитии НЖБП.

Выявленное снижение содержания цинка согласуется с имеющимися данными о значимом уменьшении концентрации данного металла в печени при диетиндуцированном ожирении [12]. Поскольку цинк играет важную роль в реализации метаболических эффектов инсулина, можно предположить, что уменьшение уровня цинка в печени связано с развитием инсулинорезистентности. Однако данному предположению противоречит отсутствие изменения при ВКД в печени содержания хрома и ванадия – элементов, также принимающих участие в передаче сигнала инсулина.

Как отмечалось, выявленное снижение концентраций меди, кобальта, йода, лития и цинка в печени крыс с НЖБП после произведенного пересчета на содержание общего белка не было достоверным. При этом снижение уровня меди при НЖБП в печени было показано ранее у ob/ob мышей даже в обезжиренных образцах ткани, что свидетельствует об истинном уменьшении концентрации МЭ, а не за счет вытеснения липидами белков и связанных с ними металлов [13]. Показан механизм фруктозоиндуцированной НЖБП в виде нарушения экспрессии дуоденального транспортера меди-1 (Ctr1), что приводило к снижению всасывания металла в кишечнике [14].

Несмотря на недостаточную изученность йодного статуса при НЖБП, описана взаимосвязь этого заболевания с нарушением функции щитовидной железы [15]. Обнаруженное нами снижение содержания йода в печени НЖБП-животных, может быть связано со снижением процесса деиодирования йодтиронинов [16]. Необходимо учитывать влияние избыточного поступления йода в организм на развитие стеатоза печени. Следует отметить противоречие полученных данных о снижении содержания лития у животных с НЖБП с существующими литературными данными, показываю-

щими роль избыточного поступления лития в развитии фиброза и жирового перерождения печени [17]. Также противоречивы данные относительно изменения содержания железа в печени при НЖБП. Так, избыточное накопление железа связывают с НЖБП и инсулинорезистентностью вследствие развития воспаления и ОС [7]. При этом имеются сведения о том, что воспаление при НЖБП и ожирении может приводить как к увеличению, так и к снижению концентрации металла в печени [18, 19] Более того, и избыточное накопление, и недостаток железа могут быть причинами нарушения липидного обмена и, соответственно, патологического накопления липидов в ткани печени.

ВЫВОДЫ

1. Роль тяжелых металлов в патогенезе НЖБП в настоящее время активно обсуждается. Так, имеются данные о формировании генетических и метаболических нарушений под воздействием кадмия и мышьяка в патогенезе НЖБП [20]. Но указанные исследования затрагивают только эффекты при избыточном поступлении металлов, в то время как связь между НЖБП и содержанием тяжелых металлов в тканях у организмов, потреблявших количества тяжелых металлов, не превышавших ПДК, недостаточно изучена. Несмотря на то, что чаще всего снижение содержания МЭ в печени связывают с их перераспределением в организме, влияние НЖБП на данный процесс до сих пор остается неясным.
2. Проведенное исследование выявило существенные изменения уровня МЭ в печени животных при НЖБП, однако механизмы развития данного эффекта требуют дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. *Loomba R., Sanyal A.J.* The global NAFLD epidemic // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013. V. 10. № 11. P. 686–690.
2. *Tilg H., Moschen A.* Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance // *Mol. Medicine.* 2008. V. 14. № 3–4). P. 1. <http://doi.org/10.2119/2007-00119>.
3. *Tilg H., Marchesini G.* Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome // *Hepatology.* 2003. V. 37. № 4. P.917–923. <http://doi.org/10.1053/jhep.2003.50161>.
4. *Hill J.O., Peters J.C.* Environmental contributions to the obesity epidemic // *Science.* 1988. № 280. P. 1371–1374.
5. *Hutcheson R., Rocic P.* The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration // *Exp. Diabetes Res.* 2012. P. 271028.
6. *Cave M., Appana S., Patel M., Falkner K.C., McClain C.J., Brock G.* Polychlorinated biphenyls, lead, and mercury are associated with liver disease in American adults: NHANES 2003–2004 // *Environ. Health Perspect.* 2010. № 18. P. 1735.
7. *Aigner E., Weiss G., Datz C.* Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver // *World J. Hepatol.* 2015. № 7. P. 177–188. doi:10.4254/wjh.v7.i2.177.
8. *Goldfischer S., Popper H., Sternlieb I.* The significance of variations in the distribution of copper in liver disease // *Am. J. Pathol.* 1980. V. 99. № 3. P. 715.
9. *Ahmed U., Latham P.S., Oates P.S.* Interactions between hepatic iron and lipid metabolism with possible relevance to steatohepatitis // *World J. Gastroenterol.* 2012. № 18. P. 4651–4658
10. *Younossi Z.M., Gramlich T., Bacon B.R., Matteoni C.A., Bonparai N., O'Neill R., McCullough A.J.* Hepatic iron and non-alcoholic fatty liver disease // *Hepatology.* 1999. V. 30. № 4. P. 847–850.
11. *Krautbauer S., Eisinger K., Lupke M., Wanninger J., Ruenmele P., Hader Y., Weiss T.S., Buechler C.* Manganese superoxide dismutase is reduced in the liver of male but not female humans and rodents with non-alcoholic fatty liver disease // *Exp. Mol. Pathol.* 2013. № 95. P. 330–335.
12. *Tallman D.L., Noto A.D., Taylor C.G.* Low and high fat diets inconsistently induce obesity in C57BL/6J mice and obesity compromises n-3 fatty acid status // *Lipids.* 2009. № 44. P. 577–580.
13. *Church S.J., Begley P., Kureishy N., McHarg S., Bishop P.N., Bechtold D.A., Unwin R.D., Cooper G.J.* Deficient copper concentrations in dried-defatted hepatic tissue from ob/ob mice: a potential model for study of defective copper regulation in metabolic liver disease // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. № 460. P. 549–554.
14. *Song M., Schuschke D.A., Zhou Z., Chen T., Pierce W.M., Wang R., Johnson W.T., McClain C.J.* High fructose feeding induces copper deficiency in Sprague–Dawley rats: a novel mechanism for obesity related fatty liver // *J. Hepatol.* 2012. № 56. P. 433–440.
15. *Eshraghian A., Hamidian Jahromi A.* Nonalcoholic fatty liver disease and thyroid dysfunction: a systematic review // *World J. Gastroenterol.* 2014. № 20. P. 8102–8109.
16. *Voss C.H., Hartmann N., Pflugradt K.* Effect of diet on deiodination of L-diiodotyrosine and L-thyroxine in rat liver // *Nahrung.* 1974. № 20. P. 69–72.
17. *Toplan S., Ozdemir S., Tanriverdi G., Akyolcu M.C., Ozelik D., Darıyerli N.* The Effects of Lithium Administration on Oxidant/Antioxidant Status in Rats: Biochemical and Histomorphological Evaluations // *Biol. Trace Elem. Res.* 2016. V. 169. № 2. P. 279–284.
18. *Chung J., Kim M.S., Han S.N.* Diet-induced obesity leads to decreased hepatic iron storage in mice // *Nutr. Res.* 2011. № 31. P. 915–921
19. *Meli R., Raso G.M., Irace C., Simeoli R., Pascale A.Di, Paciello O., Pagano T.B., Calignano A., Colonna A., Santamaria R.* High fat diet induces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats // *PLoS One.* 2013. № 8. P. e66570.
20. *Shi X., Wei X., Koo I., Schmidt R.H., Yin X., Kim S.H., Vaughn A., McClain C.J., Arteel G.E., Zhang X., Watson W.H.* Metabolic analysis of the effects of chronic arsenic exposure in a mouse model of diet-induced fatty liver disease // *J. Proteome Res.* 2013. № 13. P. 547–554.

Поступила после доработки 4 марта 2017 г.

THE INFLUENCE OF THE NON-ALCOHOLIC FATTY THE LIVER DISEASE ON THE TRACE ELEMENT CONTENT IN LIVER OF RATS

© Authors, 2017

E.R. Gatiatulina

Assistant, Department of Biochemistry, Orenburg State Medical University;
aspirant, South Ural State Medical University (Chelyabinsk)

E.V. Popova

Ph.D. (Med.), Associate Professor, Department of Biochemistry, Orenburg State Medical University

V.S. Polykova

Dr.Sc. (Med.), Professor, Orenburg State Medical University

A.A. Skalnaya

Student, Lomonosov Moscow State University

E.F. Agletdinov

Dr.Sc. (Med.), Professor, Bashkir State Medical University (Ufa)

E.A. Nikonorova

Assistant, Department of Medical Elementology, RUDN university (Moscow)

A.V. Skalny

Dr.Sc. (Med.), Professor, Institute of Bioelementology (Russian Satellite Centre of Trace Element – Institute for UNESCO), Orenburg State University; P.G. Demidov Yaroslavl State University;

RUDN university; All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

A.A. Tinkov

Ph.D. (Med.), Assistant, Department of Biochemistry, Orenburg State Medical University;

Institute of Bioelementology (Russian Satellite Centre of Trace Element – Institute for UNESCO),

Orenburg State University; P.G. Demidov Yaroslavl State University; RUDN university (Moscow)

E-mail: tinkov.a.a@gmail.com

The non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is defined as hepatic manifestation of metabolic syndrome and considered to be the commonest liver disease in the world. Taking into account the role of trace elements in the pathogenesis of metabolic syndrome, obesity and hepatic diseases the influence of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease on trace elements content in liver of rats was assessed. In total 56 female Wistar rats with equal body weight were used in the present experiment for 6 weeks. The animals were divided into two groups according to a feeding status: a control group of animals was fed a standard diet (10% calories from fat) whereas the rats from an experimental group were given high-calorie diet (HCD) (60% calories from fat in chow and 10% sucrose solution). The obtained data showed that NAFLD resulted in significant disturbances of the liver trace elements homeostasis in rats. High calorie feeding resulted in a significant decrease in hepatic Co, Cu, I, Li, Mn, Se, Zn levels. However, only Mn and Se levels remained reduced after the adjustment for total protein.

Key words: *fatty liver, steatosis, liver, trace elements, selenium, manganese.*



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Хелепин (таблетки, мазь) рег. №№ 87/1186/10; 87/1186/7 – противовирусное средство при заболеваниях, вызываемых ДНК-геномными вирусами группы герпеса, получаемое из травы дикорастущего растения леспециды копеечниковой (*Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag.).

Хелепин Д (таблетки, мазь, глазные капли), рег. №№ 94/108/6; 94/108/7; 99/47/11 – противовирусное средство, получаемое из травы культивируемого растения десмодиума канадского (*Desmodium canadense* D.C.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru