

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

НАРУШЕНИЕ БАЛАНСА ХРОМА И ВАНАДИЯ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ОЖИРЕНИЕ-АССОЦИИРОВАННОЙ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

А.А. Тиньков^{1,2*}, **Е.В. Попова**¹, **Е.Р. Гатиатулина**¹, **В.С. Полякова**¹,
А.В. Скальный^{2,3}, **А.А. Никоноров**¹

¹ Оренбургский государственный медицинский университет, г. Оренбург

² Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, г. Ярославль

³ АНО «Центр биотической медицины», Москва

РЕЗЮМЕ. Изучены изменения содержания хрома и ванадия в жировой ткани крыс, находящихся на высокожировой диете (ВЖД). Проанализированы корреляционные взаимоотношения данных металлов с основными лабораторными и морфологическими показателями при алиментарном ожирении у крыс Wistar. Употребление высокожировой диеты сопровождалось изменением морфометрических параметров животных, таких как масса тела, индекс массы тела, масса жировой ткани, что свидетельствует о развитии ожирения у экспериментальных животных. Длительное употребление ВЖД сопровождалось снижением содержания хрома и ванадия в жировой ткани. Содержание животных на ВЖД также приводило к гиперлептинемии, снижению соотношения адипонектин/лептин, гиперинсулинемии, а также повышению уровня провоспалительных цитокинов, что свидетельствует о формировании эндокринной дисфункции жировой ткани. Установлено, что содержание как хрома, так и ванадия в жировой ткани животных обратно коррелирует со всеми определяемыми морфометрическими параметрами. Уровень исследуемых металлов в жировой ткани также коррелировал с маркерами метаболической дисфункции жировой ткани и инсулинорезистентности. Результаты данного исследования позволяют предположить, что определенную роль в развитии инсулинорезистентности при ожирении может играть нарушение уровня данных металлов в жировой ткани.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ожирение, крысы, хром, ванадий, жировая ткань.

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий была неоднократно продемонстрирована роль соединений хрома и ванадия как антидиабетических агентов. Было показано, что применение данных соединений приводит к повышению чувствительности тканей к инсулину в исследованиях как с использованием добровольцев, так и лабораторных животных (Tuzcu et al., 2011, Hasten et al., 1997). Имеются данные, указывающие на протективный эффект соединений хрома и ванадия при развитии ожирения. Хотя экспериментальные данные указывают на значительное снижение интенсивности развития ожирения при введении солей хрома на фоне высоко-жировой диеты (ВЖД), клинические данные, касающиеся данного вопроса противоречивы (Iqbal et al., 2009; Onakpoya et al., 2013). Тем не менее ряд соединений хрома и ванадия может рассматриваться как перспективные препараты при лечении и профилактике ожирения и связанной с ним патологии. Также была показана роль

нарушения обмена хрома и ванадия в развитии ожирения; у лиц с ожирением отмечается снижение сывороточного хрома (Hasan et al., 2012). Ранее нами было показано, что ВЖД в комбинации с солями железа и меди приводит к снижению содержания хрома и ванадия в жировой ткани экспериментальных животных (Tinkov et al., 2013). В связи с этим целью исследования явилось изучение изменения содержания хрома и ванадия в жировой ткани крыс, находящихся на ВЖД и анализ корреляционных взаимоотношений данных металлов с основными лабораторными и морфологическими показателями при алиментарном ожирении у крыс Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящее исследование выполнено на 30 крысах-самках линии Wistar. Проведение исследования одобрено Локальным Этическим Комитетом. Животные содержались в лаборатории в условиях искусственного освещения (12-часовой световой день) при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и корм-

* Адрес для переписки:

Тиньков Алексей Алексеевич
E-mail: tinkov.a.a@gmail.com

ления *ad libitum* в течение всего эксперимента. В течение двух недель до начала эксперимента животные находились на карантине в условиях лаборатории. Для исследования были подобраны животные с одинаковой исходной массой тела.

Экспериментальные животные содержались на стандартной (СтД-животные) и высокожировой диете (ВЖД-животные). В качестве стандартной диеты использовался комбикорм (Оренбургский комбикормовый завод). Высокожировая диета основана на добавлении к стандартному рациону свиного сала в увеличивающихся количествах. В течение первого месяца содержание жиров в ВЖД составляло 21,7% от общего калоража, в течение второго месяца – 31,6%, в течение третьего месяца – 40,1%. В качестве питьевой воды СтД-животные и ВЖД-животные получали бутилированную питьевую воду с общей минерализацией < 250 мг/л. Экспериментальные животные были разделены на две группы (n = 15). Крысы первой группы содержались на стандартной диете и являлись контрольными. Животные второй группы получали ВЖД. Общая длительность эксперимента составила 3 мес. (90 сут).

По окончании эксперимента животных взвешивали, после чего производили измерение морфометрических параметров (Никоноров др., 2013). Измеряли длину тела (назо-анального расстояния), окружность груди (ОГ) (непосредственно позади передних конечностей), а также окружность живота (ОЖ) (непосредственно перед задними конечностями). Значения ОГ и ОЖ использовались для определения соотношения ОЖ/ОГ. Значение индекса массы тела (ИМТ) рассчитывали на основании данных о длине и массе тела. Впоследствии вскрытие производили путем срединной лапаротомии. Из доступа выделяли околоматочную и параовариальную жировую ткань. На основании данных о массе выделенной жировой ткани рассчитывался индекс ожирения (ИО).

Образцы околоматочной жировой ткани были использованы для последующего анализа.

В образцах жировой ткани определяли содержание хрома и ванадия методом ICP-MS на приборе Elan 9000 (Perkin-Elmer, USA). В сыворотке крови животных выявляли циркулирующий инсулин, адипонектин, лептин, МСР-1, ИЛ-6 и ФНО- α . Концентрацию ФНО- α и ИЛ-6 определяли методом ИФА с использованием наборов eBioscience; адипонектина и моноцитарного хемотаксического белка 1 (МСР-1) – с использованием стандартных наборов USCN (Life Science Inc.), инсулина и лептина – с использованием наборов AccuBind и Biovender соответственно. На основании данных о концентрации лептина и адипонектина в сыворотке крови животных находили соотношение адипонектин/лептин. Также определяли концентрации глюкозы в сыворотке крови коммерческим набором реактивов Roche. Используя данные о концентрации инсулина и глюкозы в сыворотке, рассчитывали индекс HOMA-IR.

Морфологическое исследование жировой ткани включало окраску гематоксилином и эозином с последующей морфометрией адипоцитов с помощью программного пакета ImageJ.

Полученные данные представлены в виде средних значений и соответствующих им значений среднеквадратического отклонения ($M \pm \sigma$). Достоверность погрупповых различий выявляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), используя критерий наименьшей значимости (Fisher LSD-test). Для корреляционного анализа применяли коэффициент корреляции Пирсона. Статистическую обработку данных производили с использованием программного обеспечения Statistika 10 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Употребление высокожировой диеты сопровождалось изменением морфометрических параметров животных (см. табл. 1). Так, по сравнению с контрольной группой, у ВЖД-животных наблюдалось статистически значимое 14%-ное увеличение массы тела, 7%-ное увеличение окружности живота и 16%-ное повышение ИМТ. Изменения других морфометрических параметров в опытной группе, таких как длина тела и соотношение ОЖ/ОГ, не были статистически достоверными. Наиболее существенное изменение под действием ВЖД произошло в содержании жировой ткани. В опытной группе наблюдалось более чем двукратное увеличение массы жировой ткани параметра. При этом относительное содержание ее, оцениваемое по ИО, у ВЖД-животных превышало таковое у СтД-животных на 64%.

Морфологический раздел исследования позволил выявить изменение цитометрических показателей адипоцитов под влиянием ВЖД (см. табл. 1). В опытной группе, по сравнению с контрольной, наблюдалось 143%-ное увеличение средней площади поперечного сечения адипоцита. У ВЖД-животных также отмечалось увеличение периметра адипоцитов и минимального диаметра Фере на 53 и 51% по сравнению с СтД-животными соответственно.

Содержание животных на ВЖД также приводило к изменению уровня циркулирующих адипокинов (см. табл. 2). Несмотря на отсутствие выраженного снижения концентрации адипонектина в сыворотке крови ВЖД-животных, у них отмечалось увеличение уровня лептина на 185% по сравнению с контрольной группой.

Применение ВЖД приводило к троекратному снижению расчетного показателя адипонектин/лептин по сравнению с СтД-животными. Помимо изменения концентрации адипокинов, употребление ВЖД сопровождалось увеличением концентрации провоспалительных цитокинов, таких как МСР-1, ФНО α и ИЛ-6. При этом статистически значимое увеличение концентрации было отмечено лишь в случае МСР-1, составляя 44%

от контрольных значений. У ВЖД-животных, также наблюдалось, по сравнению с контролем, повышение уровня инсулина и глюкозы в сыво-

ротке крови (табл. 3) в среднем на 7%. Значение НОМА-IR у ВЖД-животных также достоверно превышало контрольные значения на 12%.

Таблица 1. Влияние типа диеты на морфометрические показатели лабораторных животных

Параметр	СтД	ВЖД	<i>p</i>
Масса тела, г	289,15 ± 21,24	330,31 ± 16,94*	0,000013
Длина тела, см	20,73 ± 0,59	20,58 ± 0,60	0,354856
ОГ, см	15,58 ± 0,76	16,31 ± 0,83*	0,027829
ОЖ, см	18,15 ± 0,97	19,46 ± 1,01*	0,002508
ОЖ/ОГ	1,17 ± 0,05	1,19 ± 0,05	0,171063
ИМТ	0,67 ± 0,06	0,78 ± 0,07*	0,000218
Масса ЖТ, г	6,95 ± 2,37	14,35 ± 3,63*	0,000002
ИО, %	2,58 ± 0,73	4,23 ± 0,96*	0,000013
Площадь адипоцита, мкм ²	1116,27 ± 787,22	2719,10 ± 1944,23*	0,000001
Периметр адипоцита, мкм	163,22 ± 50,96	250,28 ± 85,87*	0,000001
Min Ø Фере адипоцита, мкм	31,33 ± 10,19	47,06 ± 16,49*	0,000001

Примечание: * – отличия считаются достоверными при $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Влияние типа диеты на концентрацию адипокинов, цитокинов, инсулина и глюкозы в сыворотке крови лабораторных животных

Параметр	СтД	ВЖД	<i>p</i>
Адипонектин, нг/мл	181,80±86,19	145,40±67,93	0,225628
Лептин, нг/мл	162,86±33,08	462,93±154,40*	0,000001
А/Л	1,12±0,59	0,31±0,19*	0,000021
МСР-1, нг/мл	2,22±0,66	3,20±1,30*	0,013068
ФНО α , пг/мл	0,03±0,01	0,03±0,01	0,932604
ИЛ-6, пг/мл	42,19±16,27	51,71±11,75	0,195062
Инсулин, мМЕ/л	3,66±0,70	3,92±1,08	0,425700
Глюкоза, ммоль/л	8,67±0,77	9,24±0,64*	0,049821
НОМА-IR	1,37±0,23	1,53±0,23*	0,023453

Примечание: * – см. табл. 1.

Таблица 3. Корреляция между содержанием хрома и ванадия в ЖТ и определяемыми параметрами

Параметр	Cr	V	Параметр	Cr	V
Масса тела, г	-0,465*	-0,452*	Min Ø Фере адипоцита, мкм	-0,792*	-0,810*
Длина тела, см	-0,233	-0,214	Адипонектин, нг/мл	0,352*	0,552*
ОГ, см	-0,037	-0,066	Лептин, нг/мл	-0,654*	-0,672*
ОЖ, см	-0,422*	-0,484*	А/Л	0,709*	0,815*
ОЖ/ОГ	-0,562*	-0,615*	МСР-1, нг/мл	-0,363*	-0,329*
ИМТ	-0,268	-0,267	ФНО α , пг/мл	-0,567*	-0,654*
Масса ЖТ, г	-0,465*	-0,501*	ИЛ-6, пг/мл	-0,739*	-0,865*
ИО, %	-0,422*	-0,464*	Инсулин, мМЕ/л	-0,433*	-0,589*
Площадь адипоцита, мкм ²	-0,707*	-0,727*	Глюкоза, ммоль/л	-0,232	-0,197
Периметр адипоцита, мкм	-0,779*	-0,786*	НОМА-IR	-0,573*	-0,715*

Примечание: * – корреляция достоверна

При анализе содержания хрома и ванадия в образцах жировой ткани экспериментальных животных установлено, что длительное употребление ВЖД сопровождалось снижением содержания данных металлов на 21 ($0,95 \pm 0,25$ vs $0,75 \pm 0,15$; $p = 0,022$) и 33% ($0,21 \pm 0,08$ vs $0,14 \pm 0,05$; $p = 0,018$) по сравнению с контрольными значениями.

Последующий корреляционный анализ (табл. 3) показал, что содержание как хрома, так и ванадия в жировой ткани животных обратно коррелирует со всеми определяемыми морфометрическими параметрами. При этом данная корреляция была достоверна в случае массы тела, окружности живота, соотношения ОЖ/ОГ, массы параметрия и ИО. Цитометрические показатели адипоцитов также характеризовались значительной степенью отрицательной корреляции с содержанием хрома и ванадия в жировой ткани. Уровень исследуемых металлов в жировой ткани коррелировал с маркерами метаболической дисфункции жировой ткани. Достоверная обратная взаимосвязь отмечалась между уровнем сывороточного лептина и концентрацией хрома и ванадия в ЖТ. При этом содержание данных металлов прямо коррелировало с уровнем адипонектина в сыворотке крови. Значительная степень достоверности взаимосвязи была отмечена между уровнем металлов в жировой ткани и значением соотношения адипонектин/лептин. Несмотря на отсутствие выраженных погрупповых различий в сывороточной концентрации провоспалительных цитокинов, концентрации МСР-1, ФНО α и особенно ИЛ-6 обратно коррелировали с содержанием хрома и ванадия в образцах жировой ткани. Уровень глюкозы в сыворотке крови также характеризовался обратной взаимосвязью с концентрацией исследуемых металлов, хотя данная взаимосвязь не являлась достоверной. Напротив, уровень циркулирующего инсулина достоверно обратно коррелировал с содержанием хрома и ванадия в ЖТ. Интегральный показатель инсулинорезистентности НОМА-IR характеризовался большей степенью обратной взаимосвязи с уровнем исследуемых металлов в жировой ткани. В подавляющем большинстве случаев коэффициенты корреляции между определяемыми параметрами и уровнем ванадия в жировой ткани были больше таковых для хрома.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показали, что содержание лабораторных животных на ВЖД приводит к формированию фенотипа, характеризующегося избыточным содержанием жировой ткани. Об этом свидетельствуют как морфометрические показатели животных, так и цитометрия адипоцитов, подтверждающая гипертрофию последних. Полученные данные выявили развитие дисфункции адипоцитов под влиянием ВЖД. В частности, повышение уровня лептина

свидетельствует о развитии лептинорезистентности, являющейся важным патогенетическим звеном ожирения (Zhang, Scarpase, 2006). В то же время снижение уровня адипонектина и соотношения адипонектин/лептин указывает на нарушение эндокринной функции жировой ткани (Hajer et al., 2008). Наряду с этим отмечается повышение концентрации провоспалительных цитокинов, что свидетельствует о развитии хронической воспалительной реакции при ожирении (Lee, Pratley, 2005). Увеличение концентрации глюкозы, инсулина и показателя НОМА-IR указывают на развитие инсулинорезистентности (Alberti et al., 2006). Таким образом, настоящая модель позволила смоделировать отдельные элементы метаболического синдрома.

Обнаруженное снижение содержания хрома и ванадия в жировой ткани животных при развитии ожирения и корреляция с основными определяемыми параметрами свидетельствует о значительной роли данных металлов в биологии адипоцита. Положительная корреляция между содержанием ванадия и адипонектином подтверждается исследованиями на культуре адипоцитов, показавших протеинкиназа В-опосредованную стимуляцию секреции адипонектина (Seale et al., 2006).

Также было продемонстрировано ингибирующее влияние соединений ванадия на выработку лептина в культивированных адипоцитах (Mueller et al., 2000). Ранее было показано, что введение лабораторным животным с экспериментальным диабетом диникоистеината хрома приводило к снижению уровня активированного NF-kB, что свидетельствует о возможном противовоспалительном действии соединений хрома (Jain et al., 2010). В то же время во всех вышеперечисленных исследованиях рассматривалась лишь одна из сторон взаимодействия хром/ванадий-ожирение, в частности, влияние употребления солей данных элементов на развитие экспериментальной патологии. В настоящей работе, напротив, исследовалось влияние ВЖД как следствие избыточного содержания жировой ткани на содержание в последней хрома и ванадия.

ВЫВОДЫ

Несмотря на то, что механизм снижения содержания хрома и ванадия в жировой ткани при развитии ожирения является невыясненным, результаты данного исследования позволяют предположить, что определенную роль в развитии инсулинорезистентности при ожирении может играть нарушение уровня данных металлов в жировой ткани.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Никонов А.А., Тиньков А.А., Железнов Л.М., Иванов В.В. Методический подход к изучению ожирения в эксперименте. Оренбург: Южный Урал, 2013. 238 с.

(Nikonorov A.A., Tinkov A.A., Zheleznov L.M., Ivanov V.V. [Methodical approach to experimental study of obesity]. Orenburg, 2013 [in Russ]).

Hajer G.R., van Haefen T.W., Visseren F.L. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*. 2008, 29(24):2959–71.

Hasan H.G., Ismael P.A., Tofiq D.I. Estimation of serum chromium levels in obesity. *Middle East J Intern Med*. 2012, 5(5):3–9.

Hasten D.L., Hegsted M., Keenan M.J., Morris G.S. Effects of various forms of dietary chromium on growth and body composition in the rat. *Nutr Res*. 1997, 17(2):283–94.

Iqbal N., Cardillo S., Volger S., Bloedon L.T., Anderson R.A., Boston R., Szapary P.O. Chromium picolinate does not improve key features of metabolic syndrome in obese non-diabetic adults. *Metab Syndr Relat Disord*. 2009, 7(2):143–50.

Jain S.K., Croad J.L., Velusamy T., Rains J.L., Bull R. Chromium dinitocysteinate supplementation can lower blood glucose, CRP, MCP-1, ICAM-1, creatinine, apparently mediated by elevated blood vitamin C and adiponectin and inhibition of NFκB, Akt, and GLUT-2 in livers of Zucker diabetic fatty rats. *Mol Nutr Food Res*. 2010, 54:1371–80.

Lee Y.H., Pratley R.E. The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*. 2005, 1(1):70–5.

Maury E., Brichard S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010, 314(1):1–16.

Mueller W.M., Stanhope K.L., Gregoire F., Evans J.L., Havel P.J. Effects of metformin and vanadium on leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Obes Res*. 2000, 8(7):530–9.

Onakpoya I., Posadzki P., Ernst E. Chromium supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Obes Rev*. 2013, 14(6):496–507.

Park S.J., Youn C.K., Hyun J.W., You H.J. The anti-obesity effect of natural vanadium-containing Jeju ground water. *Biol Trace Elem Res*. 2013, 151(2):294–300.

Seale A.P., de Jesus L.A., Park M.C., Kim Y.S. Vanadium and insulin increase adiponectin production in 3T3-L1 adipocytes. *Pharmacol Res*. 2006, 54(1):30–8.

Tinkov A.A., Polyakova V.S., Nikonorov A.A. Chronic administration of iron and copper potentiates adipogenic effect of high fat diet in Wistar rats. *Biometals*. 2013, 26(3):447–63.

Tuzcu M., Sahin N., Orhan C., Agca C.A., Akdemir F., Tuzcu Z. Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2011, 8:28.

Zhang Y., Scarpace P.J. The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol Behav*. 2006, 88(3):249–56.

IMPAIRED ADIPOSE TISSUE CHROMIUM AND VANADIUM BALANCE AS A POSSIBLE MECHANISM OF OBESITY-RELATED INSULIN RESISTANCE

A.A. Tinkov^{1,2}, E.V. Popova¹, E.R. Gatiatulina¹, V.S. Polyakova¹,
A.V. Skalny^{2,3}, A.A. Nikonorov¹

¹ Orenburg State Medical University, Sovetskaya str. 6, Orenburg, 460000, Russia

² P. G. Demidov Yaroslavl State University, Sovetskaya str. 14, Yaroslavl, 150000, Russia

³ ANO Centre for Biotic Medicine, Zemlyanoi val 46, 105064, Moscow, Russia

ABSTRACT. The primary aim of the current study was to assess the adipose tissue chromium and vanadium concentrations in rats fed a high-fat diet (HFD) and to estimate the correlations between adipose tissue metal levels and main markers of obesity. HFD consumption resulted in increased morphometric parameters, like body mass, body mass index, adipose tissue mass. Moreover, an increase in adipocyte cross-sectional area, perimeter, and minimal Feret diameter was observed in HFD-rats, being indicative of obesity development. Prolonged HFD consumption was accompanied by a significant decrease in adipose tissue chromium and vanadium content. The HFD-fed animals were also characterized by a hyperleptinemia, decreased adiponectin/leptin ratio, and increased proinflammatory cytokine levels, being indicative of adipose tissue endocrine dysfunction. Moreover, elevation of HOMA-IR characterized a state of insulin resistance. It was estimated that adipose tissue chromium and vanadium content inversely correlated with morphometric parameters, markers of endocrine dysfunction and insulin resistance. In particular, a significant inverse interrelation was observed between serum leptin levels and adipose tissue Cr and V levels. At the same time, adipose tissue metal content significantly correlated with serum adiponectin concentrations. Serum MCP-1, TNFα and especially IL-6 levels inversely correlated with metal content in adipose tissue. The same interrelation was observed for serum glucose, insulin and HOMA-IR values. The obtained data allow to propose a significant role of impaired adipose tissue chromium and vanadium balance in the development of insulin resistance.

KEYWORDS: obesity, rats, chromium, vanadium, adipose tissue.