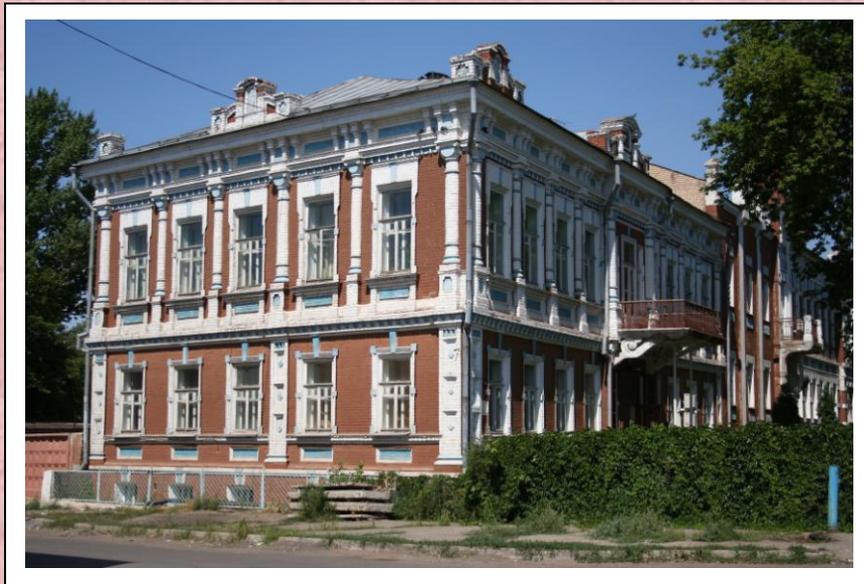


ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2013 * № 1

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© А.А. Тиньков, А.А. Никоноров, 2013

УДК 57.042

А.А. Тиньков, А.А. Никоноров

ИЗМЕНЕНИЕ ОСНОВНЫХ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРЫС WISTAR ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ СОЛЕЙ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ

Оренбургская государственная медицинская академия, Оренбург, Россия

Целью настоящего исследования явилось выявление адипогенного эффекта солей железа и меди, на уровне изменения основных морфометрических показателей крыс линии Wistar. Установлено, что длительное потребление сульфатов железа и меди, в концентрациях, превышающих предельно допустимые, приводит к изменению морфометрических параметров. Наряду с увеличением массы тела, у экспериментальных животных отмечалось увеличение как абсолютного, так и относительного содержания жировой ткани. Результаты проведенного исследования свидетельствуют в пользу адипогенного действия железа и меди.

Ключевые слова: железо, медь, жировая ткань, пищевое поведение, морфометрия.

A.A. Tinkov, A.A. Nikonorov

WISTAR RATS' MORPHOMETRIC PARAMETERS CHANGE DURING CHRONIC PERORAL SUPPLEMENTATION OF BIVALENT METAL SALTS

Orenburg State Medical academy, Orenburg, Russia

The primary objective of the study was to estimate the adipogenic effect of iron and copper salts manifested in the change of basic morphometric parameters of Wistar rats. It is estimated that prolonged consumption of iron and copper sulfates in doses exceeding maximal permissible concentrations leads to the change of rats' morphometric parameters. Along with the increasing body mass an elevation of absolute and relative adipose tissue content was observed. The obtained data gives evidence for adipogenic action of iron and copper.

Key words: iron, copper, adipose tissue, food behavior, morphometry.

Введение.

В последнее десятилетие значительно изменились взгляды на роль химических факторов в развитии ряда заболеваний. Подобная ситуация связана с выдвиганием концепции об эндокринных дисрапторах (*endocrine disruptors*, *англ.*) как веществах, способных нарушать функционирование эндокринной системы [15]. Согласно последним обзорам, к данной условной группе относятся значительное количество веществ, различных по своим свойствам и групповой принадлежности [2]. В то время как роль органических соединений

освещена в достаточной степени, роль неорганических соединений, в частности металлов, изучена лишь частично [5]. Ввиду того, что согласно современным представлениям жировая ткань также является эндокринной тканью, секретирующей значительное количество цитокинов и гормонов, называемых адипокинами [8], а ее гормональная дисфункция в свою очередь является основным звеном патогенеза ожирения [11], возникает вопрос о возможном негативном действии эндокринных дисрапторов на ее метаболизм [4]. В частности, открытым остается вопрос о влиянии солей железа и меди, как наиболее распространенных в окружающей среде металлов, но еще не признанных эндокринными дисрапторами на функцию жировой ткани. Имеющиеся в мировой литературе данные, в той или иной мере касающиеся влияния железа и меди на адипогенез крайне незначительны [13, 14]. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось выявление адипогенного эффекта солей железа и меди, на уровне изменения основных морфометрических показателей крыс линии Wistar.

Материалы и методы исследования.

Работа проведена на 36 крысах-самках линии Wistar 2-месячного возраста в соответствии с Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных». Экспериментальные животные были разделены на 6 групп ($n=6$): 1 контрольная группа, 5 опытных. Животные контрольной группы (I) получали бутилированную воду высшей категории с общей минерализацией <250 мг/л. Крысы опытных групп получали с водой соли двухвалентных металлов. Так, животные II и III групп получали с питьевой водой двенадцативодный сульфат железа (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) в концентрациях 3,00 и 6,00 мг/л соответственно. Крысы IV и V групп употребляли питьевую воду с содержанием сульфата меди (II) (CuSO_4) 4,88 и 9,76 мг/л. В то же время, животные VI группы получали смесь указанных солей железа и меди в концентрациях 3,00 мг/л и 4,88 мг/л соответственно. Используемые концентрации соединений были рассчитаны на основе предельно допустимых концентраций (ПДК) (ГН 2.1.5.1315-03) для указанных металлов в питьевой воде с превышением ПДК в 2 и 4 раза, соответственно, с целью создания условий избыточного поступления в организм. Экспериментальные животные всех групп содержались на стандартном рационе с общей калорийностью 270 ккал/100 г (20% белков; 70% углеводов; 10% жиров от общего калоража). С целью моделирования реальных условий, жи-

вотные имели неограниченный доступ к пище и питьевой воде. Ежедневно производилась оценка количества потребленного корма и питьевой воды путем взвешивания тары. На основании данных о потреблении пищи рассчитывался показатель потребления корма (г) на 1 г массы крысы. Перед началом эксперимента крысы содержались на карантине в условиях лаборатории в течение недели. Содержание животных осуществлялось в условиях вивария с 12-часовой длительностью светового дня (режим искусственного освещения) при температуре $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Плановое взвешивание животных производилось еженедельно с последующей оценкой динамики прироста веса (с целью наглядности результаты представлены на конец каждого месяца проведения эксперимента). Длительность эксперимента составила 3 лунных месяца. По окончании эксперимента животные были умерщвлены под наркозом путем перерезки магистральных сосудов шеи.

Оценка морфометрических параметров крыс производилась непосредственно перед умерщвлением под наркозом. Оценивалась длина тела (назоанальная длина), окружность грудной клетки (ОГ) (измеряется непосредственно за передними лапами), окружность живота (ОЖ) (измеряется непосредственно перед задними лапами). На основании полученных данных рассчитывались показатели соотношения ОЖ/ОГ, индекса массы тела (ИМТ) согласно общепринятой формуле [12]:

$$\text{ИМТ} = \text{вес (г)} / \text{длина тела (см)}^2,$$

а также индекса Lee:

$$\text{Индекс Lee} = (1/3 * \text{вес (г)} / \text{длина тела (см)}) * 1000$$

Исходя из значений общего прироста массы ($\text{вес}_{\text{конеч}} - \text{вес}_{\text{исх}}$), а также исходных значений веса рассчитывался удельный прирост массы:

$$\text{Удельный прирост} = \text{общий прирост массы} / \text{исходная масса}$$

После измерения морфометрических показателей производилось вскрытие путем срединной лапаротомии с послойным рассечением тканей. Для взвешивания забиралась параовариальная и околоматочная жировая ткань (параметрий) [3]. На основании данных о массе исследуемого фрагмента жировой ткани производился расчет процентного содержания исследуемого депо жировой ткани от общей массы животного.

Статистическая обработка полученных данных производилась с помощью U-критерия Манн-Уитни посредством программы Statistika 10.0 for Windows 7 (StatSoft). Различия оценивались как достоверные при уровне значимости $p < 0,05$ (*).

Результаты и их обсуждение.

Из данных, представленных в таблице 1 видно, что на момент начала эксперимента значимых различий в массе животных не наблюдалось, а к концу 3 месяца эксперимента у животных всех групп отмечалась положительная динамика веса. Масса тела контрольных животных на момент завершения эксперимента увеличилась на 69%, в то время как у крыс опытных групп прирост массы был более выражен. Так, наиболее выраженное увеличение, составляющее 80% от исходного значения, отмечалось в VI группе животных, получающих с питьевой водой комбинацию сульфатов железа (II) и меди (II) в концентрациях равных соответственно 3 и 4,88 мг/л. Более того, как конечная масса тела, так и общая прибавка веса за 3 месяца у крыс VI группы достоверно превосходила контрольные значения. Стоит также отметить, что конечная масса тела и общий прирост у животных, получающих изолированно 3 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (III группа) и 4,88 мг/л CuSO_4 (V группа) достоверно не отличались от контрольных значений.

Таблица 1. Характеристика изменения веса лабораторных животных при употреблении с питьевой водой солей железа и меди в течение 3 месяцев эксперимента

№	Соль металла	Доза (мг/л)	Исходный вес	Вес конечный	Прибавка веса	Удельный прирост
1	Контроль	-	173.0±1.8	291.6±1.7	118.6±2.3	0,71
2	$\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,00	172.5±4.5	292.0±8.1	119.5±4.6	0,72
3	$\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	6,00	176.8±1.9	302.6±6.0	125.8±6.7	0,74
4	CuSO_4	4,88	169.8±2.2	297.0±5.6	127,2±6.1	0,75
5	CuSO_4	9,76	174.2±4.2	298.7±3.0	124,5±4.3	0,72
6	$\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + \text{CuSO}_4$	3,00+ 4,88	171.8±3.2	308.7±4.7 *	136,9±5.7*	0,78

Примечание: * - достоверность отличия от контроля ($p < 0,05$).

Динамика изменения веса экспериментальных животных в течение эксперимента отражена на рисунках 1-3.

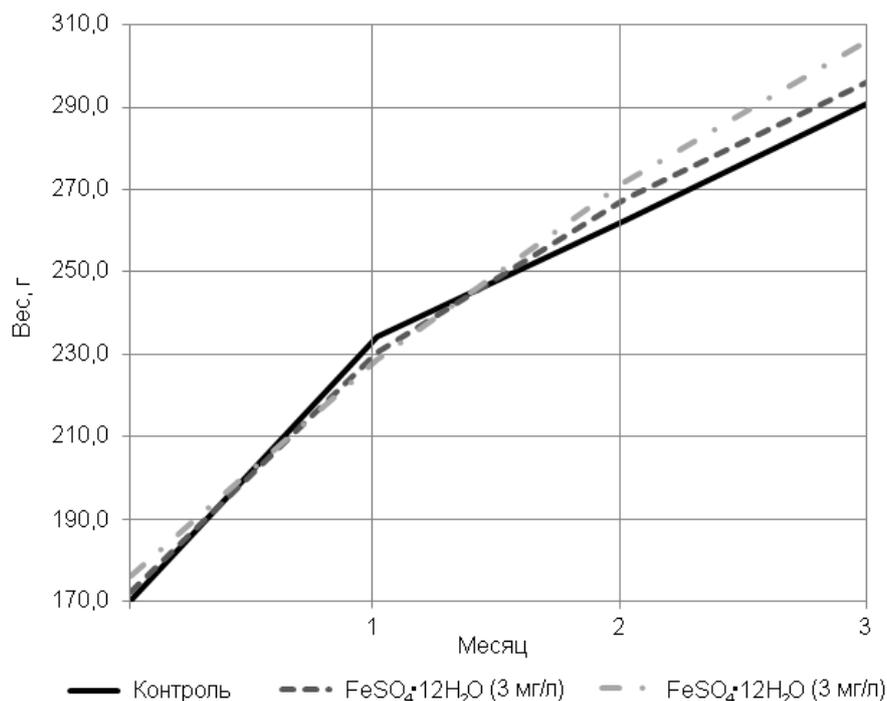


Рис. 1. Динамика веса крыс, получающих с питьевой водой сульфат железа (II) в различных концентрациях.

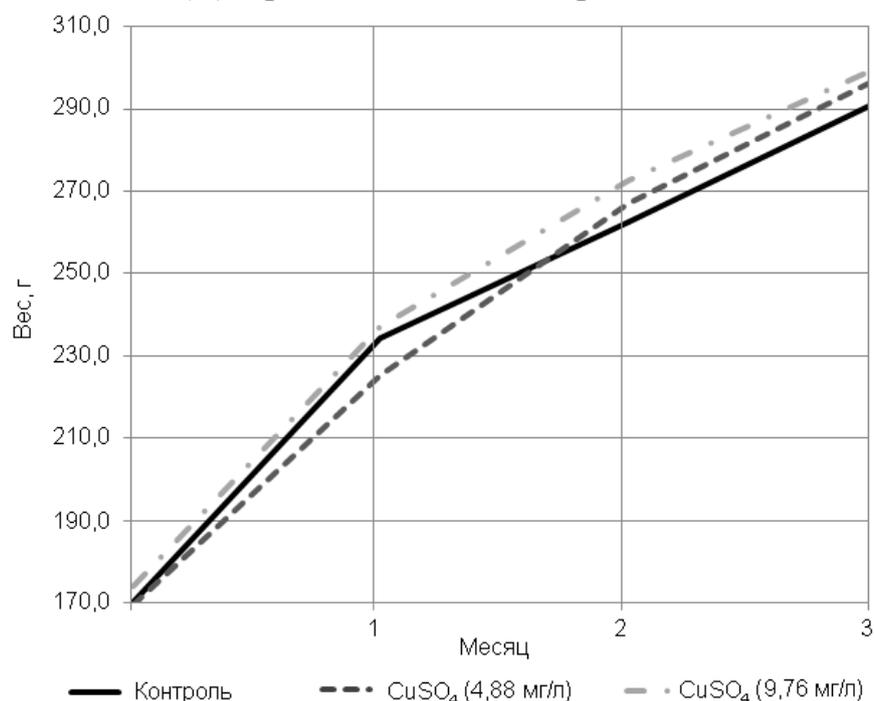


Рис. 2. Динамика веса крыс, получающих с питьевой водой сульфат меди (II) в различных концентрациях.

Из рисунков видно, что к моменту окончания 1 мес. эксперимента различий в массе животных контрольной и опытных групп не отмечалось. Более того, вес крыс употребляющих с питьевой водой сульфат железа в обеих исследуемых

двумя концентрациями (II и III группы), а также сульфат меди в концентрации 4,88 мг/л (IV группа) был несколько ниже контрольных значений (рис. 1 и 2). В течение 2 мес. эксперимента вес животных, получающих с питьевой водой соли железа (рис. 1) и меди (рис. 2), превзошел соответствующий показатель у контрольных животных. Подобная динамика сохранялась вплоть до завершения эксперимента (3 мес.). В тоже время из рисунка 3 видно, что, хотя в течение первых 1,5 мес. масса животных, получающих 3 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (II) и 4,88 мг/л CuSO_4 (IV) изолированно с питьевой водой, была ниже контрольных значений, масса животных, получающих комбинацию данных металлов в указанных дозах, характеризовалась иной динамикой – уже в начале 2 месяца опыта масса крыс VI группы имела тенденцию к увеличению по отношению к контрольному уровню.

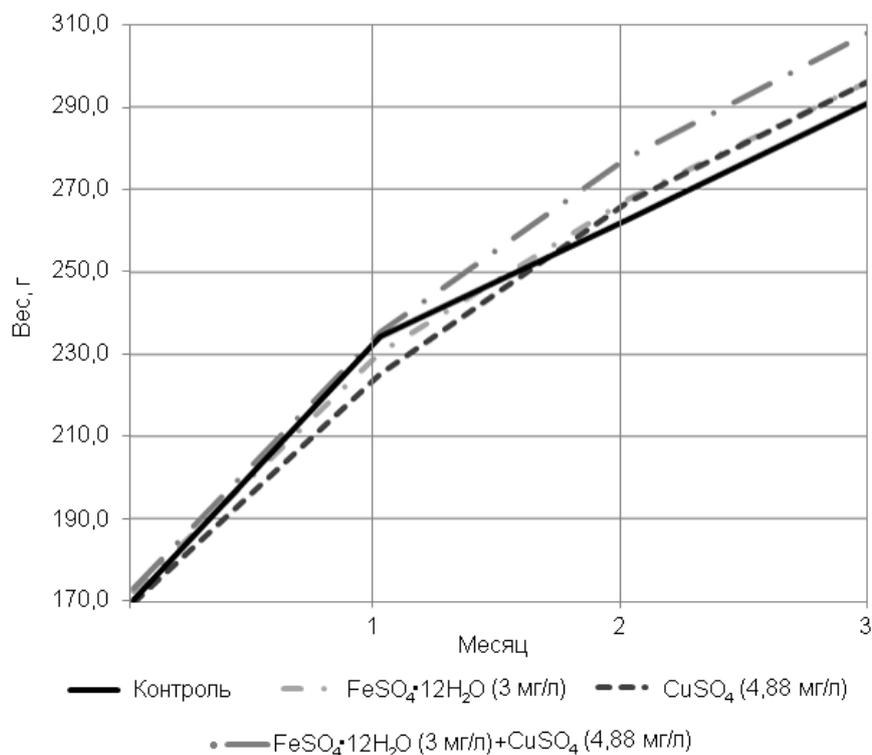


Рис. 3. Динамика веса крыс, получающих с питьевой водой комбинацию сульфата железа (II) и сульфата меди (II), а также в группах сравнения.

Из данных таблицы 2, где приведены значения основных морфометрических параметров животных, видно, что средние значения окружности грудной клетки (ОГ) и окружности живота (ОЖ) у животных всех опытных групп превышали контрольные. Так, ОГ крыс III и VI групп превышала соответствующую

ций показатель у интактных животных на 4 и 5% соответственно. Несмотря на незначительную в процентном отношении разницу, данные различия были статистически достоверны ($p < 0,05$). Величина ОЖ была наибольшей у животных, получающих с питьевой водой комбинацию сульфатов железа (3 мг/л) и меди (4,88 мг/л), достоверно превышая контрольные значения на 4,5% соответственно. Хотя имелись определенные различия в значениях ОЖ и ОГ у крыс анализируемых групп, соотношение ОЖ/ОГ, свидетельствующее о наличии абдоминального ожирения, практически не отличалось среди животных различных групп.

Таблица 2. Морфометрические показатели крыс

№	Соль металла	Доза (мг/л)	ОГ (см)	ОЖ (см)	ОЖ/ОГ	Длина (см)	ИМТ	Индекс Lee
1	Контроль	-	15,4± 0,3	17,0± 0,3	1,10± 0,01	21,2± 0,1	0,65± 0,01	4594,8± 76,4
2	FeSO ₄ ·12H ₂ O	3,00	15,8± 0,5	17,3± 0,6	1,10± 0,02	20,5± 0,1	0,69± 0,02	4744,9± 236,2
3	FeSO ₄ ·12H ₂ O	6,00	16,0± 0,1*	17,3± 0,3	1,08± 0,02	21,0± 0,3	0,70± 0,02	4872,1± 135,1
4	CuSO ₄	4,88	15,9± 0,3	17,3± 0,3	1,09± 0,02	20,8± 0,3	0,69± 0,01	4768,3± 91,2
5	CuSO ₄	9,76	15,6± 0,3	17,4± 0,3	1,12± 0,02	20,8± 0,1	0,69± 0,01	4788,9± 140,5
6	FeSO ₄ ·7H ₂ O+ CuSO ₄	3,00+ 4,88	16,3± 0,3*	17,8± 0,3*	1,09± 0,02	21,5± 0,2	0,67± 0,01	4785,8± 124,1

Примечание: * - достоверность отличия от контроля ($p < 0,05$).

Так же как и в случае соотношения ОЖ/ОГ, значения таких интегральных показателей, как ИМТ и индекс Lee у животных опытных групп достоверно не отличались от таковых у интактных крыс. Тем не менее, имелась выраженная тенденция к их росту относительно контрольных значений, что было наиболее заметно при анализе индекса Lee.

Наряду с этой выявленной тенденцией установлено, что употребление животными питьевой воды, содержащей соли двухвалентных металлов в течение трехмесячного периода, приводило к увеличению у них количества параметриальной и параовариальной жировой ткани (табл. 3).

Таблица 3. Содержание жировой (параовариальной+параметриальной) ткани у крыс контрольной и опытных групп

№	Соль металла	Доза (мг/л)	Масса (г)	% массы жировой подушки от массы тела
1	Контроль	-	4,97±0,13	1,70±0,04
2	FeSO ₄ ·12H ₂ O	3,00	7,50±0,51*	2,62±0,12*
3	FeSO ₄ ·12H ₂ O	6,00	6,17±0,37	2,03±0,15
4	CuSO ₄	4,88	7,43±0,27*	2,50±0,13*
5	CuSO ₄	9,76	7,22±0,42*	2,41±0,12*
6	FeSO ₄ ·12H ₂ O+ CuSO ₄	3,00+ 4,88	7,95±0,67*	2,57±0,21*

Примечание: * - достоверность отличия от контроля (p<0,05).

Наиболее выраженное увеличение содержания исследуемой жировой «подушки» отмечалось у животных, получающих с питьевой водой 3 мг/л сульфата железа (II группа), а также смесь солей железа и меди в концентрациях 3 мг/л и 4,88 мг/л соответственно (VI группа). Содержание параметрия и параовариума в указанных группах превышало контрольные значения на 51 и 60% соответственно. Достоверное увеличение на 50 и 45% от контроля также наблюдалось у животных, получающих с питьевой водой CuSO₄ в концентрациях 4,88 мг/л (IV группа) и 9,76 мг/л (V группа) соответственно.

В таблице 4 представлены данные, характеризующие динамику изменения потребления пищи экспериментальными животными.

Таблица 4. Потребление пищи экспериментальными животными (г пищи/г массы)

№	Соль металла	Доза (мг/л)	1 месяц	2 месяц	3 месяц
1	Контроль	-	0,108±0,003	0,077±0,001	0,070±0,001
2	FeSO ₄ ·12H ₂ O	3,00	0,116±0,006	0,080±0,003	0,070±0,003
3	FeSO ₄ ·12H ₂ O	6,00	0,102±0,003	0,079±0,002	0,068±0,002
4	CuSO ₄	4,88	0,131±0,004*	0,096±0,004*	0,083±0,003*
5	CuSO ₄	9,76	0,118±0,007	0,080±0,002	0,068±0,001
6	FeSO ₄ ·12H ₂ O+ CuSO ₄	3,00+ 4,88	0,122±0,007	0,083±0,001*	0,073±0,002

Примечание: * - достоверность отличия от контроля (p<0,05).

Так, в течение всего срока эксперимента у животных всех групп отмечалось снижение относительного потребленного количества пищи (г пищи/г мас-

сы тела), что связано с замедлением темпа роста организма. Полученные результаты свидетельствуют, что наибольшее потребление пищи в течение 1 месяца отмечалось у животных, получающих с питьевой водой сульфат меди (II) в концентрации 4,88 мг/л (IV группа), которое превышало контрольный уровень на 21%. Подобная тенденция в данной группе сохранялась на протяжении последующих сроков наблюдения (2 и 3 мес.), превышая базовый уровень на 25 и 19% соответственно. Стоит отметить, что потребление пищи достоверно превосходило контрольные значения в VI группе животных, получающих с питьевой водой смесь сульфатов железа и меди, на 2 мес. эксперимента, хотя данный параметр достоверно не отличался от базового уровня через 1 и 3 мес., имея лишь некоторую тенденцию к увеличению.

Результаты проведенного исследования указывают на возможное адипогенное действие солей металлов с переменной валентностью. Несмотря на отсутствие достоверного изменения ряда интегральных расчетных морфометрических показателей, таких как ИМТ, индекс Lee и соотношение ОГ/ОЖ, изменение массы тела, сопровождаемое увеличением содержания жировой ткани в организме экспериментальных животных, безусловно, свидетельствует о наличии предрасположенности к развитию ожирения. Анализ пищевого поведения показал, что в развитии избыточного содержания жировой ткани у крыс, употребляющих с питьевой водой соли меди, значительную роль может играть гиперфагия. Полученные нами данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований, где было показано повышение экспрессии орексигена нейропептида Y в гипоталамусе под влиянием солей меди [9]. В случае железа, возможным механизмом его адипогенного действия, по-видимому, является активация свободно-радикального окисления. Будучи металлом с переменной валентностью, железо, так же как и медь, способно принимать участие в неполном восстановлении кислорода, приводя к формированию активных форм кислорода (АФК) [7]. АФК в свою очередь индуцируют цепные реакции окисления макромолекул, при определенных условиях формируя состояние, известное как окислительный стресс [1]. В настоящее время окислительный стресс, как системный, так и локальный, рассматривается в качестве одного из механизмов развития эндокринной дисфункции жировой ткани [10], являющейся основой патогенеза ожирения. Стоит отметить, что наиболее выраженные изменения

массы тела, общей прибавки массы, основных морфометрических показателей, а также содержания жировой ткани были отмечены у животных, получающих с питьевой водой одновременно сульфат железа (II) и меди (II). Подобный эффект, на наш взгляд, может быть связан, с одной стороны, с сочетанием медь-индуцированной гиперфагии и прооксидантного действия железа, а с другой стороны, с возможным взаимодействием металлов, приводящим к потенцированию окислительно-восстановительных реакций в организме [6].

Заключение.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что соли железа и меди при их хроническом избыточном поступлении в организм экспериментальных животных способны оказывать влияние на систему регуляции веса и аппетита, приводя к предрасположенности к развитию ожирения. Однако общий вклад поведенческого и свободно-радикального механизмов в адипогенный эффект солей металлов с переменной валентностью слабо изучен и требует дальнейшего изучения.

Литература.

1. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс: антиоксиданты и прооксиданты. М.: Фирма «Слово», 2006. 556 с.
2. Casals-Casas C., Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol.* 2011. 73: 135-162.
3. Casteilla L., Penicaud L., Cousin B., Calise D. Choosing an adipose tissue depot for sampling. Factors in selection and depot specificity. *Methods Mol Biol.* 2001. 155: 1-19.
4. Grun F., Blumberg B. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol Cell Endocrinol.* 2009. 304 (1-2): 19-29.
5. Iavicoli I., Fontana L., Bergamaschi A. The effects of metals as endocrine disruptors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2009. 12 (3): 206-223.
6. Jomova K., Valko M. Thermodynamics of Free Radical Reactions and the Redox Environment of a Cell, In Andreescu S, Hepel M (eds) *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, ACS Symposium Series. Washington: DC. 2011: 71-82.
7. Jomova K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011. 283: 65-87.
8. Kershaw E.E., Flier J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004. 89 (6): 2548-2556.
9. Li J., Yan L., Zheng X., Liu G., Zhang N., Wang Z. Effect of high dietary copper on weight gain and neuropeptide Y level in the hypothalamus of pigs. *J Trace Elem Med Biol.* 2008. 22: 33-38.
10. Matsuzawa-Nagata N., Takamura T., Ando H., Nakamura S., Kurita S., Misu H., Ota T., Yokoyama M., Honda M., Miyamoto K., Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism.* 2008. 57.(8): 1071-1077.
11. Maury E., Brichard S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2010. 15. 314 (1): 1-16.

12. Novelli E.L., Diniz Y.S., Galhardi C.M., Ebaid G.M., Rodrigues H.G., Mani F., Fernandes A.A., Cicogna A.C., Novelli Filho J.L. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007. 41: 111-119.
13. Sinnott-Smith P.A., Woolliams J.A. Adipose tissue metabolism and cell size: variation between subcutaneous sites and the effect of copper supplementation. *Animal Production.* 1987. 45 (1): 75-80.
14. Tajima S., Ikeda Y., Sawada K., Yamano N., Horinouchi Y., Kihira Y., Ishizawa K., Izawa-Ishizawa Y., Kawazoe K., Tomita S., Minakuchi K., Tsuchiya K., Tamaki T. Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAy mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012. 302: 77-86
15. Zacharewski T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays. *Environ Health Perspect.* 1998. 106 (Suppl. 2): 577-582.

Поступила 30.12.2012

(Контактная информация: Тиньков Алексей Алексеевич – аспирант кафедры биологической химии Оренбургской государственной медицинской академии; e-mail: tinkov.a.a@gmail.com)