

© Шлыкова О. А., Микитюк М. В., Боброва Н.Л., Измайлова О. В., Мамонтова Т.В., Баранова А. Ф., Веснина Л.Э., Кайдашев И. П.  
УДК 615.276–612.062

## ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН И ХРОНИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ДИЕТЕ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ФРУКТОЗЫ\*

Шлыкова О. А., Микитюк М. В., Боброва Н.Л., Измайлова О. В., Мамонтова Т.В., Баранова А. Ф., Веснина Л.Э., Кайдашев И. П.  
Высшее учебное заведение Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава

*Досліджено вплив метформіну на ліпідний обмін і рівень експресії прозапальних факторів у тканинах печінки мишей, що знаходились на дієті з високим вмістом фруктози (ДВВФ) (60 г фруктози/100 г корму). Визначено концентрації загального холестерину (ЗХ), триглицеридів (ТГ), церулоплазмину (ЦП), глюкози у сироватці крові та експресію mRNA інгібітора NF-κB (IκBa), мРНК фактора некрозу пухлин α (TNFα) в гомогенатах тканин печінки 3-х місячних мишей лінії BALBc масою 25-30 г. Продемонстровано, що збільшення вмісту фруктози в раціоні харчування призводить до підвищення концентрації глюкози, ЗХ і ТГ у крові мишей. Посилюються прояви системної запальної відповіді, про що свідчить зростання рівня ЦП у сироватці крові і рівня експресії мРНК TNFα в тканинах печінки тварин, що знаходились на ДВВФ. Метформін у дозі 50 мг/кг/доб. знижував продукцію ТГ у сироватці крові мишей, що знаходились на ДВВФ, сприяв нормалізації печінкового глюконеогенезу. Введення метформіну спричиняло протизапальну дію, шляхом зниження концентрації сироваткового ЦП та експресії мРНК TNFα в тканинах печінки цих тварин. Таким чином, отримані дані свідчать про протективний ефект метформіну на ліпідний обмін, а також рівень експресії прозапальних факторів, пов'язаних з NF-κB-сигнальним шляхом у тканинах печінки мишей, які перебували на ДВВФ.*

Ключові слова: дієта з високим вмістом фруктози, метформін, експресія, прозапальні фактори.

Многочисленные исследования показывают, что диета с высоким содержанием фруктозы (ДВСФ) вызывает различные патологические изменения, в том числе окислительный стресс, нарушение толерантности к глюкозе, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа, болезни печени, артериальную гипертензию и другие сердечно-сосудистые заболевания [16]. Показано, что нарушения липидного обмена при развитии стресса гепатоцитов у животных, находящихся на ДВСФ, происходит в результате перенагрузки фруктозного метаболизма [11]. Увеличение продукции липидов в печени способствует повышению митохондриального бета-окисления жирных кислот, генерации продуктов перекисидации, которые стимулируют IκB-киназу (IKK), а следовательно и активацию NFκB [7]. Известно, что в тесной связи с активацией провоспалительных ядерных транскрипционных факторов (ЯТФ), прежде всего NFκB, находятся молекулярные механизмы развития хронического низкоинтенсивного системного воспаления (ХСВ) [5].

В последние годы была сформулирована концепция перманентной активации NF-κB (долгосрочной и низкоинтенсивной), как возможного типового патологического процесса, который обуславливает взаимосвязь инсулинорезистентности, хронического воспаления, артериальной гипертензии, эндотелиальной дисфункции и дислипидемии (Кайдашев И.П., 2012). В связи с этим, актуальным является поиск методов снижения транскрипционной активности NF-κB (диета, физические нагрузки, лечебные препараты), которые будут устранять молекулярную основу развития метаболического/инсулинорезистентного синдрома и снижать риск сердечно-сосудистых заболеваний [2]. В ранее проведенных исследованиях было

показано, что метформин снижает активацию NFκB, возможно, за счет ингибирования активации IKK [1].

Цель работы: исследование влияния метформина на уровень глюкозы, липидный обмен и уровень экспрессии провоспалительных факторов в тканях печени мышей, которые находились на диете с высоким содержанием фруктозы.

### Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на 3-х месячных мышах линии BALBc массой 25-30г, которых содержали в полипропиленовых клетках в контролируемых условиях 12 часового светового/12 часового темного цикла. Животные находились на стандартном рационе питания (60% растительного крахмала) и воде в неограниченном доступе одну неделю. Исследование проведено в соответствии с разрешением комиссии по биоэтике Высшего государственного учебного заведения Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия».

Через неделю акклиматизационного периода животные были разделены на 4 группы поровну: 1 группа – мыши, находящиеся на стандартном рационе питания и воде; 2 группа – мыши, находящиеся на стандартном рационе питания и воде, которым вводили метформин (per os) в дозе 50 мг/кг с 85-ого дня эксперимента в течении 49 дней [14,15]; 3 группа – мыши, которые находились на ДВСФ (60г фруктозы/100г корма); 4 группа – мыши, находящиеся на ДВСФ, которым вводили метформин (per os) в дозе 50 мг/кг с 85-ого дня эксперимента в течении 49 дней.

В состав стандартного рациона питания входила зерновая смесь (пшеница, овес, ячмень, просо), кукуруза, семена подсолнечника, горох, зерновой гранулят, орехи, сухие фрукты. Минеральные компоненты: соли

\* Цитування при атестації кадрів: Шлыкова О. А., Микитюк М. В., Боброва Н.Л., и др. Влияние метформина на липидный обмен и хроническое воспаление в тканях печени мышей при диете с высоким содержанием фруктозы // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 3-4. – С. 64 –67.

Таблиця 1.

Изменение массы тела в исследуемых группах животных (M ±SD).

Показатель	Группы			
	1	2	3	4
Исходная масса тела, г	28,4±2,2	31,2±1,56	25,9±2,1	29,2±1,13
Масса тела ч/з 84 дня, г	32,6±2,8	33,7±0,77	28,8±3,2	30,3±1,36
Масса тела ч/з 134 дня, г	32,9±2,0	34,7±2,33	29,9±5,29	31,1±2,08

кальция, фосфора, калия, натрия. Витамины: А, В1, В2, Д3, Е, Н. Содержание питательных веществ: сырой протеин – 11%, сырой жир – 4,0%, сырая клетчатка – 10,0%, кальций – 0,15%, фосфор – 0,1%, влага – 10%.

На 134 день эксперимента после 12-часового периода голодания животным проводили определение концентрации глюкозы в сыворотке крови до и через 120 минут после нагрузки глюкозой (2г/кг) (тест на толерантность к глюкозе). Концентрацию глюкозы (ГЛ) определяли в крови из хвостовой вены, при помощи глюкометра «ГЛЮКОФОТ» со стандартными индикаторными-полосками «ГЕМОГЛАН» (ПВП «НОРМА», Украина).

На 135 день экспериментального периода животные были умерщвлены путем цервикальной дислокации. Кровь отбирали в сухие пластиковые пробирки. Сыворотку отделяли центрифугированием при 400g 10 минут. В сыворотке крови определяли концентрацию общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) с помощью наборов реагентов (LACHEMA, Чехия), концентрацию церулоплазмينا (ЦП) методом ферментативного окисления п-фенилдиамина [3]. Проводили забор тканей печени на льду и гомогенизировали ее в охлажденном 0,1М фосфатном буфере, pH 7,4. В гомогенате печени определяли содержание матричной РНК (mRNA) ингибитора NF-κB (IκBα) и mRNA фактора некроза опухоли α (TNFα), выделенную при помощи комплекта реагентов «Рибозоль-В» (AmpliSens, Россия). Для получения кДНК в реакции обратной транскрипции использовали праймер олиго (dT) 18 и обратную транскриптазу M-MuLV (SibEnzyme, Россия). Анализировали экспрессию генов методом ПЦР в режиме «реального времени», применяя олигонуклеотидные праймеры к кДНК IκBα: 5'-TGAAGGACGAGGAGTACGAGC-3'; 5'-TTCGTGGATGATTGCCAAGTG-3' и TNFα: 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'; 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3', в присутствии красителя SYBR Green I («Синтол», Россия) с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322 («ДНК-Технология», Россия) путем относительного количественного анализа. В качестве референтного гена использовали ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH):

5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'; 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'

Для анализа данных применяли относительный Ct метод с расчетом ΔCt [18].

Результаты обработаны статистически при помощи программы STATISTICA 6.0. («StatSoft», США). Данные приведены в виде выборочного среднего (M), выборочного стандартного отклонения (S/D). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

### Результаты и их обсуждение

Как показали наши исследования в течении экспериментального периода наблюдалось постепенное увеличение массы тела в исследуемых группах мышей. В таблице 1 показано, что окончательная средняя масса тела мышей (г) составляла в 1 группе - 32,9±2,0; во 2, 3 и 4: 34,7±2,33; 29,9±5,29; 31,1±2,08, соответственно. Следует отметить, что средние значения окончательной массы тела мышей существенно не отличались друг от друга по группам.

При определении толерантности к глюкозе, в исследуемых группах мышей было отмечено статистически значимое возрастание концентрации ГЛ натошак в крови мышей находящихся на ДВСФ, в отличие от мышей 1 группы (p=0,0059) (рис.1). Под влиянием метформина концентрация глюкозы в сыворотке крови мышей 4 группы снижалась в сравнении с 3 группой мышей (p=0,052) (рис. 1)

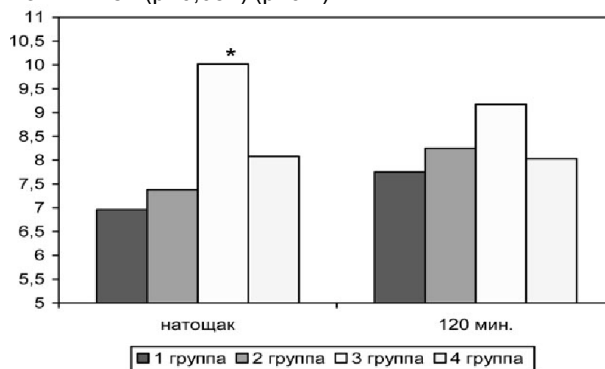


Рисунок 1. Уровень глюкозы в группах исследуемых животных натошак и через 120 минут после нагрузки глюкозой (2г/кг).

Примечание: \* – p<0,05 по сравнению с 1 группой.

В наших исследованиях под воздействием ДВСФ изменялись процессы липогенеза в клетках печени, о чем свидетельствовало повышение уровня ОХ до 3,05±0,57 ммоль/л и ТГ до 2,15±0,42 ммоль/л в сыворотке крови 3 группы мышей по сравнению с мышами 1 группы, которые находились на стандартном рационе питания без добавления фруктозы (p<0,05) (табл.2).

Таблиця 2.

Изменения уровня общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови исследуемых животных (M ±SD).

Показатель	Группы			
	1	2	3	4
ОХ, ммоль/л	1,6 ± 0,38	1,75 ± 0,31	3,05 ± 0,57*	2,6 ± 0,46
ТГ, ммоль/л	1,13 ± 0,57	1,3 ± 0,35	2,15 ± 0,42*	1,48 ± 0,23**

Примечание: \* – p<0,05 по сравнению с 1 группой; \*\* – p<0,05 по сравнению с 3 группой.

Метформин снижал интенсивность липогенеза в клетках печени 4 группы мышей, о чем свидетельствовало уменьшение уровня ТГ (1,48±0,23 ммоль/л) по сравнению с 3 группой (2,15±0,23 ммоль/л) (p=0,049), уровень ОХ статистически значимо не изменялся (p=0,2) (табл.2).

В тоже время по данным гистологических исследований не наблюдалось клинически значимых структурных изменений тканей печени ни у одной из групп мышей. Также не изменялись показатели коэффициента массы печени в исследуемых группах животных, которые составили для 1 группы - 0,056 ±0,008, 2

группы -  $0,054 \pm 0,003$ , 3 группы -  $0,06 \pm 0,009$ , 4 группы -  $0,061 \pm 0,01$ .

На следующем этапе работы оценивали проявления системного воспалительного ответа. В качестве маркеров воспалительного процесса определяли уровень ЦП в сыворотке крови и экспрессию мРНК TNF $\alpha$  и I $\kappa$ B $\alpha$  в гомогенатах тканей печени. В предыдущих исследованиях Кайдашев И. П. и соавт., 2008, было предположено, что содержание ЦП в сыворотке крови может служить маркером повышенного риска воспаления при метаболическом синдроме, и наряду с другими показателями, позволит оценить уровень развития системного воспалительного ответа [4]. Как видно из данных, представленных на рисунке 2, увеличение содержания фруктозы в рационе питания привело к достоверному увеличению уровня церулоплазмينا в сыворотке крови 3 группы мышей  $297,65 \pm 17,07$  мг/л по сравнению с 1 группой -  $221,9 \pm 18,5$  мг/л ( $p=0,0004$ ).

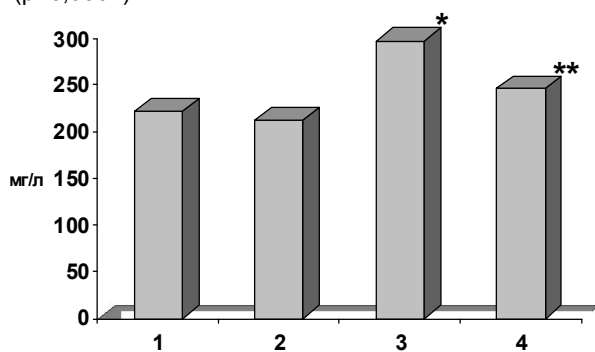


Рисунок 2. Изменение уровня церулоплазмينا в группах исследуемых животных.

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с 1 группой;  
\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с 3 группой.

Была изучена экспрессия мРНК TNF $\alpha$  и I $\kappa$ B $\alpha$  в тканях печени мышей при увеличении содержания фруктозы в рационе питания и при воздействии метформина.

В группе животных, находящихся на ДВСФ усиливалась экспрессия мРНК TNF $\alpha$  и практически не изменялась экспрессия мРНК I $\kappa$ B $\alpha$  (табл.3).

Под воздействием метформина уменьшались проявления хронического воспаления за счет снижения уровня церулоплазмينا в сыворотке крови животных 4 группы ( $246,67 \pm 15,41$  мг/л) в сравнении с 3 группой ( $297,65 \pm 17,07$  мг/л) ( $p=0,0044$ ) (рис.2). Под влиянием метформина снижался уровень экспрессии мРНК TNF $\alpha$  в клетках печени, исследуемых животных. Метформин практически не влиял на экспрессию мРНК I $\kappa$ B $\alpha$  (табл.3).

В нашем исследовании продемонстрировано, что увеличение содержания фруктозы в рационе питания приводит к повышению концентрации глюкозы, ОХ и ТГ в крови мышей. Усиливаются проявления системного воспалительного ответа, о чем свидетельствует повышение уровня церулоплазмينا в сыворотке крови и уровня экспрессии мРНК TNF $\alpha$  в тканях печени животных находящихся на ДВСФ. В тоже время, мы не наблюдали в таях увеличения массы тела и структурных изменений тканей печени мышей при высоком потреблении фруктозы с пищей.

Таблица 3.  
Изменения уровня относительных экспрессий мРНК TNF $\alpha$  и мРНК I $\kappa$ B $\alpha$  в тканях печени исследуемых животных ( $M \pm SD$ ).

Показатель	Группы			
	1	2	3	4
Экспрессия ФНО-альфа, $\Delta Ct$	$14,67 \pm 0,74$	$11,62 \pm 0,78$	$12,42 \pm 0,94^*$	$14,75 \pm 1,04^{**}$
Экспрессия I $\kappa$ B-альфа, $\Delta Ct$	$11,2 \pm 1,04$	$10,0 \pm 0,28$	$10,62 \pm 0,88$	$11,2 \pm 1,97$

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с 1 группой;  
\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с 3 группой.

Полученные данные об изменении процесса липогенеза в клетках печени мышей на ДВСФ согласуются с исследованиями Vasciano H. et al, 2005, в которых показано, что большое поступление фруктозы в печень, активирует метаболизм глюкозы и пути ее усвоения, и приводит к значительному повышению скорости de novo липогенеза, синтеза триглицеридов (ТГ), что обусловлено высоким потоком глицерина и ацил частей молекул фруктозного катаболизма. Эти метаболические нарушения, по всей видимости, могут быть одной из причин, лежащих в основе индукции резистентности к инсулину, которая часто наблюдается у людей и животных при большом потреблении фруктозы с пищей. [8].

Отсутствие увеличения массы тела мышей, изменений массы и структуры печени в наших исследованиях возможно связано с большим содержанием пищевых волокон в рационе их питания. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования показали благотворное влияние диеты с высоким содержанием пищевых волокон на течение метаболического синдрома [6, 9, 10].

Усиление системного воспалительного ответа в наших исследованиях, подтверждается повышением концентрации сывороточного церулоплазмينا и экспрессии мРНК TNF $\alpha$  в печени, а как известно TNF $\alpha$  является маркером активации NF $\kappa$ B. Существуют данные, показывающие, что печеночная инсулинорезистентность индуцированная активацией NF $\kappa$ B связана с повышением экспрессии TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-1 [12].

В предыдущих наших исследованиях было выдвинуто предположение, что метформин влияет на NF $\kappa$ B-сигнальный путь, возможно изменяя активность IKK [1]. Активация IKK является одним из ключевых медиаторов инсулинорезистентности, о чем свидетельствует повышение чувствительности к инсулину при направленных нарушениях в гене IKK [17] Учитывая, что в данном исследовании активация NF $\kappa$ B в тканях печени мышей может быть связана с избыточной экспрессией IKK и вызывает резистентность печени, скелетных мышц к действию инсулина и признаки системной воспалительной реакции (увеличение сывороточного IL-6) [13], мы продолжили изучение влияния метформина на NF $\kappa$ B-сигнальный путь в эксперименте.

В нашем исследовании, метформин в дозе 50 мг/кг снижал продукцию триглицеридов в клетках печени мышей находящихся на ДВСФ, способствовал нормализации печеночного глюконеогенеза. Введение метформина оказывало противовоспалительное действие, путем снижения концентрации сывороточного церулоплазмينا и экспрессии мРНК TNF $\alpha$  в тканях печени этих животных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о протективном эффекте метформина на углеводный, липидный обмен, а также уровень экспрес-

сии провоспалительных факторов, связанных с NFκB-сигнальным путем в тканях печени мышей, которые находились на диете с высоким содержанием фруктозы.

**Литература**

1. Влияние метформина на продукцию провоспалительных цитокинов и инсулинорезистентность (NFκB-сигнальный путь) / Лавренко А. В. [и др.] // Проблемы эндокринологии. - 2012. - №2. - С. 25 – 28
2. Кайдашев І.П. Активация NF-κB при метаболічному синдромі / І. П. Кайдашев // Фізіол. Журн. -2012. – Т.58, №1. – С. 93-101
3. Колб В. Г., Калашников В. С. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. – С. 219 – 220
4. Куценко Л. А. Место церулоплазмينا среди белков острой фазы как маркера системного воспаления / Л. А. Куценко, И. П. Кайдашев // Лабораторна діагностика. – 2011. – 3(57). –С. 59 – 68
5. Лавренко А. В. 4Метформин и пиоглитазон как средства борьбы с системным воспалением низкой интенсивности / А. В. Лавренко, Н. И. Винник, С. М. Расин, М. С. Расин, И. П. Кайдашев // Проблемы екології та медицини. – 2012. – Т. 16., №3-4. – С. 3 – 8.
6. Activation 15 of the AMP activated protein kinase by short-chain fatty acids is the main mechanism underlying the beneficial effect of a high fiber diet on the metabolic syndrome / Hu GX, Chen GR, Xu H, Ge RS, Lin J. // Med Hypotheses. -2010. – Vol.74(1). – P. 123-126.
7. Arkan M. C. 3Hevener AL, Greten FR, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance / M. C. Arkan, A. L. Hevener, F. R. Greten [et all.] // Nat.Med. – 2005. – N 11. – P. 191-198.
8. Basciano H. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia [Електронний ресурс] / H. Basciano, L. Federico, A. Khosrow // Nutrition & Metabolism. – 2005. - 2:5. – Режим доступу до журн.: doi:10.1186/1743-7075-2-5.

9. Ferguson L. R. Is the dietary fibre concept becoming too hard to digest? / L. R. Ferguson // British Journal of Nutrition. – 2008. - N 100. – P. 693–694
10. Health benefits of dietary fiber / James W Anderson, Pat Baird, Richard H Davis [et all.] // Nutrition Reviews®. - Vol. 67(4). – P. 188–205.
11. Kelley G. L. High dietary fructose induced a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation / G. L. Kelley, G. Allan, S. Azhar // Endocrinology. - 2004. - N 145. – P. 548 – 555.
12. Lazar M. A. 16 The tumoral side of insulin resistance / M. A. Lazar // Nat Med. – 2006. – N.12. – P.43 –44.
13. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB / D. Cai, M. Yuan, D. F. Frantz [et all.] // Nat Med. - 2005. – Vol. 11. – Vol. 183–190
14. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state / M. Foretz [et all.] // The Journal of Clinical Investigation. – Vol.120, N.7. - P. 2355 – 2369.
15. Metformin therapy in a hyperandrogenic anovulatory mutant murine model with polycystic ovarian syndrome characteristics improves oocyte maturity during superovulation / Sabatini M. E. Et all // Journal of Ovarian Research. – 2011. Vol. – 4. – P. 8.
16. Poss 1A. P. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats / A. P. Poss [et all.] // Neurobiol Learn Mem. - 2009. - Vol. 92, N. 3. – P. 410 – 416.
17. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta / Yuan M., Konstantopoulos N., Lee J. [et all.] // Science. – 2001. – Vol. 293(5535). – P. 1673–1677
18. Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>t</sub> method / T. D. Schmittgen, K. J. Livak // NATURE PROTOCOLS. – 2008. - Vol.3, N.6. – P. 1101 – 1108.

**ENGLISH VERSION: INFLUENCE OF METFORMIN ON LIPID METABOLISM AND CHRONIC INFLAMMATION IN THE LIVER TISSUES OF MICE ON A DIET RICH IN FRUCTOSE\***

Shlykova O.A., Mikityuk M.V., Bobrova N.L., Izmailova O.V., Mamontova T.V., Baranova A.F., Vesnina L.E., Kaidashev I.P.  
Higher State Educational Establishment of Ukraine “Ukrainian Medical Stomatological Academy”, Poltava

*The effect of metformin on lipid metabolism and the expression of pro-inflammatory factors in the liver tissue of mice that were on a diet rich in fructose (DRF) (60 g fructose / 100 g of food) has been studied. The concentrations of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), ceruloplasmin (CP), glucose in serum and mRNA expression of inhibitor of NF-κB (IκBa), mRNA of tumor necrosis factor α (TNFα) have been determined in homogenates of liver tissues in 3-months-aged mice of BALBc line weighing 25-30 g. It has been demonstrated that increasing the content of fructose in the diet leads to increased concentrations of glucose, TC and TG in the blood of mice. Manifestations of systemic inflammatory response become stronger, as evidenced by the increase in CP in the blood serum and the expression level of mRNA of TNFα in liver tissues of animals that were on a DRF. Metformin in the dose of 50 mg / kg per day reduced the production of triglycerides in the blood serum of mice that were on a DRF; it contributed to the normalization of hepatic gluconeogenesis. Administering metformin caused anti-inflammatory effect by lowering serum CP and expression of mRNA of TNFα in liver tissues of these animals. Thus, the data suggest the protective effect of metformin on lipid metabolism and the expression of pro-inflammatory factors associated with NF-κB-signaling pathway in the liver tissues of mice which were on a DRF.*

Keywords: diet rich in fructose, metformin, expression, proinflammatory factors.

Numerous studies display that diet rich in fructose (DRF) causes various pathological changes, including oxidative stress, impaired glucose tolerance, insulin resistance, type 2 diabetes, liver conditions, hypertension and other cardiovascular diseases [16]. It is shown that lipid metabolism in the development of stress of hepatocytes in animals on DRF occurs in the result of fructose metabolism overload [11]. It is assumed that the in-

creased production of lipids in the liver enhances mitochondrial beta-oxidation of fatty acids, generation of peroxidation products that stimulate IκB-kinase (IKK), and therefore the activation of NFκB [7]. It is known that molecular mechanisms of chronic low-level systemic inflammation (CSI) are closely associated with the activation of proinflammatory nuclear transcription factors (NTF), primarily NFκB [5].

\* To cite this Shlykova O.A., Mikityuk M.V., Bobrova N.L., et al. Influence of metformin on lipid metabolism and chronic inflammation in the liver tissues of mice on a diet rich in fructose // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 3-4. - P. 67 -70.

In recent years, the concept of permanent NF-κB activation (long-term and low-intensity) has been formulated as a possible model of pathological process that determines the relationship between insulin resistance, chronic inflammation, hypertension, endothelial dysfunction and dyslipidemia (I.P. Kaidashev, 2012). In this regard, the search for methods to reduce the transcriptional activity of NF-κB (diet, exercise, therapeutic drugs) is relevant, since it will eliminate the molecular basis of the metabolic / insulin resistance syndrome and reduce the risk of cardiovascular diseases [2]. Previous studies have shown that activation of metformin reduces NFκB, possibly by inhibiting the activation of IKK [1].

The aim of the research is to study the influence of metformin on blood glucose, lipid metabolism and the level of expression of proinflammatory factors in the liver tissues of mice that were on a diet rich in fructose.

**Materials and methods of the research**

The experiment was performed on mice of BALBc line aged 3 months, weighing 25-30 g, kept in polypropylene cages under controlled conditions of 12 hours light / 12 hours dark cycle. Animals were on a standard diet (60% of vegetable amyllum) and with unlimited access to water for one week. The study was conducted in accordance with authorization of the Bioethics Commission of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy".

In a week after acclimation period, the animals were divided into four equal groups: group 1 – mice on a standard diet and water; group 2 – mice on a standard diet and water, which were administered metformin (per os) in a dose of 50 mg / kg from the 85th day of the experiment for 49 days [14, 15]; group 3 – mice on a DRF (60 g fructose / 100 g of food); group 4 – mice on a DRF, which were administered metformin (per os) in a dose of 50 mg / kg from the 85th day of the experiment for 49 days.

The standard diet comprised the grain mixture (wheat, oats, barley, and millet), maize, sunflower seeds, peas, corn granules, nuts, and dried fruit. Mineral component were: calcium, phosphorus, potassium, sodium. Vitamins: A, B1, B2, D3, E, N. The nutrient content: crude protein – 11%; crude fat – 4.0%; crude fiber – 10.0%; calcium – 0.15%, phosphorus – 0.1%; moisture – 10%.

On the 134th day of the experiment, after 12-hour fasting period, the concentration of glucose in blood serum of animals was determined before and in 120 minutes after the glucose load (2 g / kg) (test the glucose tolerance). The concentration of glucose (GL) was determined in blood from the tail vein using "GLYUKOFOT" glucometer with standard indicator strips "GEMOGLAN" (PIE "NORM", Ukraine).

On the 135th day of the experimental period, the animals were euthanized by cervical dislocation. Blood was collected in dry plastic vials. Serum was separated by centrifugation at 400 g for 10 minutes. In blood serum, concentration of total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) using the reagents kit (LACHEMA, Czech Republic), the concentration of ceruloplasmin (CP) by enzymatic oxidation of p-phenyldiamine were determined [3]. The sampling of liver tissue was performed and homogenised on ice in refrigerated 0.1M phosphate buffer, pH 7.4. In liver homogenate, the content of RNA messenger (mRNA), NF-κB inhibitor (IκBα) and mRNA of tumor necrosis factor α (TNFα), isolated using the reagents kit "Ribo-sol-B" (AmpliSens, Russia), were determined. For obtaining cDNA in the reverse transcription reaction, pri-

mer oligo (dT) 18 and reverse transcriptase M-MuLV (SibEnzyme, Russia) were used. Gene expression was analyzed by PCR method in "real time", using oligonucleotide primers for cDNA IκBα: 5'-TGAAGGACGAGGAGTACGAGC-3'; 5'-TTCGTGGATGATTGCCAAGTG-3' and TNFα: 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'; 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3', in the presence of the dye SYBR Green I ("Synthol", Russia), using the detecting amplifier DT-322 ("DNA Technology", Russia) via relative quantitative analysis. The gene of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a reference gene: 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'; 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'.

For data analysis, relative Ct method with the calculation formula ΔCt was used [18].

The results were processed statistically using the program STATISTICA 6.0. ("StatSoft", USA). The data are presented as the sample average (M), the sample standard deviation (S / D). The critical level of significance when testing the statistical hypotheses was set at 0.05.

**Results and discussion**

As our research has shown, the gradual increase in body weight of mice in the studied groups during the trial period was observed. Table 1 displays that the final average body weight of mice (g) in group 1 was 32,9 ± 2,0; in groups 2, 3 and 4: 34,7 ± 2,33; 29,9 ± 5,29; 31,1 ± 2,08, respectively. It should be noted that the average value of the final weight of mice in groups did not differ significantly from each other.

*Table 1. Change in body weight in the studied groups of animals (M ± SD).*

Parameter	Groups			
	1	2	3	4
Initial body weight, g	28,4±2,2	31,2±1,56	25,9±2,1	29,2±1,13
Body weight in 84 days, g	32,6±2,8	33,7±0,77	28,8±3,2	30,3±1,36
Body weight in 134 days, g	32,9±2,0	34,7±2,33	29,9±5,29	31,1±2,08

When determining the glucose tolerance, a statistically significant increase in concentration of GL (in fasting state) in the blood of mice on DRF was observed, unlike the mice of group 1 (p = 0.0059) (Fig.1). Under the influence of metformin, glucose concentration in the blood serum of mice from group 4 was reduced in comparison with group 3 (p = 0.052) (Figure 1)

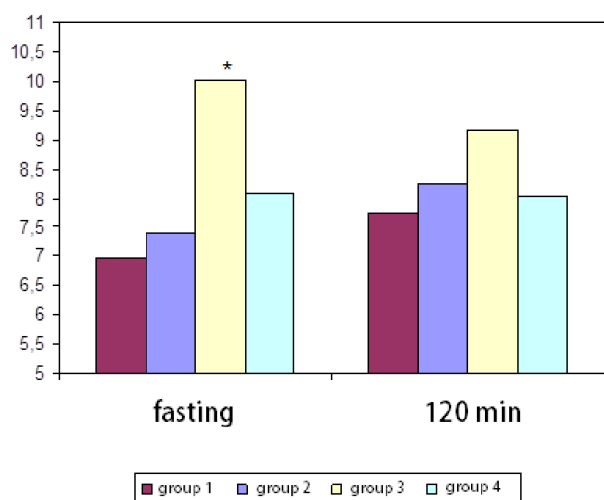


Figure 1. Glucose level in groups of studied animals in fasting state and in 120 min after the glucose load (2 g / kg).

Note: \* –  $p < 0.05$  as compared with group 1.

In our studies, the lipogenesis processes in liver cells varied under the influence of DRF, as evidenced by the increase in TC to  $3.05 \pm 0.57$  mmol / l and triglyceride to  $2.15 \pm 0.42$  mmol / l in the serum of group 3 as compared with mice of group 1, who were on a standard diet with no added fructose ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

Table 2. Changes in the level of total cholesterol and triglycerides in the serum of studied animals (M + SD).

Parameter	Groups			
	1	2	3	4
TC, mmol / l	$1,6 \pm 0,38$	$1,75 \pm 0,31$	$3,05 \pm 0,57^*$	$2,6 \pm 0,46$
TG, mmol / l	$1,13 \pm 0,57$	$1,3 \pm 0,35$	$2,15 \pm 0,42^*$	$1,48 \pm 0,23^{**}$

Note: \* –  $p < 0.05$  as compared with group 1;

\*\* –  $p < 0.05$  as compared with group 3.

Metformin reduced the intensity of lipogenesis in liver cells of group 4, as evidenced by reduction in triglycerides ( $1,48 \pm 0,23$  mmol / l) as compared to group 3 ( $2,15 \pm 0,23$  mmol / l) ( $p = 0.049$ ), the TC level did not significantly change ( $p = 0.2$ ) (Table 2).

At the same time, according to histological studies, no clinically significant structural changes in liver tissues were observed in the studied groups of mice. The indicators of liver mass coefficient in the studied groups of animal did not change as well, amounting in group 1 –  $0,056 \pm 0,008$ , group 2 –  $0,054 \pm 0,003$ , group 3 –  $0,06 \pm 0,009$ , group 4 –  $0,061 \pm 0,01$ .

At the next stage of work, manifestations of systemic inflammatory response were assessed. As markers of the inflammatory process, the level of CP in blood serum and the expression of mRNA of TNF $\alpha$  and I $\kappa$ B $\alpha$  in liver homogenates were determined. In previous studies of I. P. Kaidashev et al., 2008, it was assumed that the contents of CP in serum may be a marker of increased risk of inflammation and metabolic syndrome, and along with other indicators, it will allow assessing the level of systemic inflammatory response [4]. As seen from the data presented in Figure 2, the increase in fructose content in the diet led to a significant increase in the level of ceruloplasmin in serum of group 3 –  $297.65 \pm 17.07$  mg / l as compared with group 1 –  $221.9 \pm 18,5$  mg / l ( $p = 0.0004$ ).

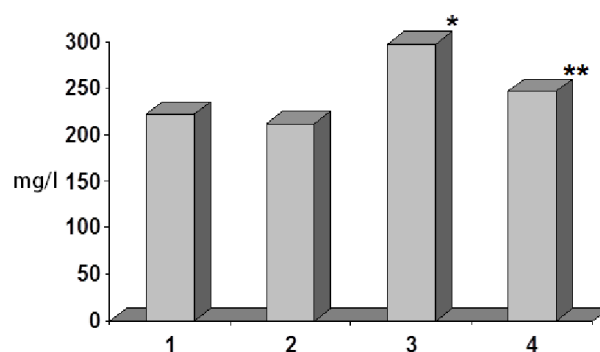


Figure 2. Changes in the level of ceruloplasmin in groups of studied animals.

Note: \* –  $p < 0.05$  as compared with group 1;

\*\* –  $p < 0.05$  as compared with group 3.

The expression of mRNA of TNF $\alpha$  and I $\kappa$ B $\alpha$  in liver tissues of mice by increasing the content of fructose in the diet, as well as under exposure to metformin, was studied.

In the group of animals on a DRF, expression of mRNA of TNF $\alpha$  increased and expression of mRNA of I $\kappa$ B $\alpha$  did not virtually change (Table 3).

Under the action of metformin, the manifestations of chronic inflammation reduced due to decrease of ceruloplasmin level in serum of animals from group 4 ( $246,67 \pm 15,41$  mg / l) as compared to group 3 ( $297,65 \pm 17,07$  mg / L) ( $p = 0.0044$ ) (Figure 2). Under the influence of metformin, expression of mRNA of TNF $\alpha$  in liver cells decreased. Metformin had virtually no effect on expression of mRNA of I $\kappa$ B $\alpha$  (Table 3).

Table 3. Changes in the relative mRNA expression of mRNA of TNF $\alpha$  and I $\kappa$ B $\alpha$  in liver tissues of studied animals (M  $\pm$  SD).

Parameter	Groups			
	1	2	3	4
Expression of TNF-alpha, $\Delta$ Ct	$14,67 \pm 0,74$	$11,62 \pm 0,78$	$12,42 \pm 0,94^*$	$14,75 \pm 1,04^{**}$
Expression of I $\kappa$ B-alpha, $\Delta$ Ct	$11,2 \pm 1,04$	$10,0 \pm 0,28$	$10,62 \pm 0,88$	$11,2 \pm 1,97$

Note: \* –  $p < 0.05$  as compared with group 1;

\*\* –  $p < 0.05$  as compared with group 3.

In our study it has been demonstrated that the increase of fructose content in the diet leads to increased concentrations of glucose, TC and TG in the blood of mice. Manifestations of systemic inflammatory response are exacerbated, as evidenced by the increase in the level of ceruloplasmin in serum and the level of expression of mRNA of TNF $\alpha$  in liver tissues of animals that were on DRF. At the same time, we observed no increase in body mass and structural changes in the liver tissue of mice by high fructose intake with food.

The data on the changes in the process of lipogenesis in liver cells of mice on a DRF are consistent with studies of H. Basciano et al, 2005, in which it is shown that large admission of fructose to the liver activates the metabolism of glucose and the way of its assimilation, leads to a significant increase in the rate of de novo lipogenesis, the synthesis of triglycerides (TG), which is due to the high flux of glycerol and acyl molecule units of fructose catabolism. These metabolic disorders appear to be one of the reasons underlying the induction of insulin resistance, which is often observed in humans

and animals with large consumption of dietary fructose [8].

No increase in body weight of mice, as well as the lack of changes in weight and structure of the liver in our studies may be due to the high content of dietary fiber in the diet of mice. Numerous experimental and clinical studies have shown beneficial effects of a diet high in dietary fiber for metabolic syndrome [6, 9, 10].

Strengthening the systemic inflammatory response in our study is confirmed by an increased concentration of serum ceruloplasmin and expression of mRNA of TNF $\alpha$  in the liver, and as is known, TNF $\alpha$  is a marker of activation of NF $\kappa$ B. There is evidence to show that hepatic insulin resistance induced by NF $\kappa$ B activation is associated with increased expression of TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-1 [12].

In our previous studies it has been suggested that metformin affects NF $\kappa$ B-signaling pathway, possibly by changing the activity of IKK [1]. IKK activation is one of the key mediators of insulin resistance, as evidenced by the increased sensitivity to insulin in directed disorders in IKK gene [17]. Considering the fact that in this study the activation of NF $\kappa$ B in the liver of mice may be associated with overexpression of IKK, causing resistance of liver and skeletal muscle to the action of insulin and signs of systemic inflammatory response (increase of serum IL-6) [13], we continued to study the effect of metformin on NF $\kappa$ B-signaling pathway in the experiment.

In our study, metformin at 50 mg / kg reduced the production of triglycerides in liver cells of mice that were on DRF, facilitated normalization of hepatic gluconeogenesis. Administering metformin has anti-inflammatory effect, by reducing the concentration of serum ceruloplasmin and expression of mRNA of TNF $\alpha$  in liver tissues of these animals.

Thus, the findings suggest that metformin has protective effect on carbohydrate and lipid metabolism, as well as the level of expression of proinflammatory factors associated with NF $\kappa$ B-signaling pathway in liver tissues of mice that were on a diet rich in fructose.

### References

1. Vliyanie metformina na produkziyu provospalitel'nykh zitokinov i insulinorezistentnost' (NF $\kappa$ B-signal'nyy put') / Lavrenko A. V. [i dr.] // Problemy endokrinologii. - 2012. - №2. - S. 25 - 28
2. Kaydashev I.P. Aktivaziya NF-kB pri metabolichnomu sindromi / I. P. Kaydashev // Fiziol. Zhurn. -2012. - T.58, №1. - S. 93-101
3. Kolb V. G., Kalashnikov V. S. Klinicheskaya biochimiyayu - Minsk: Belarus',1976. - S. 219 - 220
4. Kuzenko L. A. Mesto zeruloplazmina sredi belkov ostroy fazy kak markera sistemnogo vospaleniya / L. A. Kuzenko, I. P. Kaydashev // Laboratorna diagnostika. - 2011. - 3(57). -S. 59 - 68
5. Lavrenko A. V. Metformin i pioglitazon kak sredstva bor'by s sistemnym vospaleniem nizkoy intensivnosti / A. V. Lavrenko, N. I. Vinnik, S. M. Rasin, M. S. Rasin, I. P. Kaydashev // Problemi ekologii ta medizini. - 2012. - T. 16., №3-4. - S. 3 - 8.
6. Activation of the AMP activated protein kinase by short-chain fatty acids is the main mechanism underlying the beneficial effect of a high fiber diet on the metabolic syndrome / Hu GX, Chen GR, Xu H, Ge RS, Lin J. // Med Hypotheses. -2010. - Vol.74(1). - P. 123-126.
7. Arkan M. C. Hevener AL, Greten FR, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance / M. C. Arkan, 3 A. L. Hevener, F. R. Greten [et all.] // Nat.Med. - 2005. - N 11. - P. 191-198.
8. Basciano H. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia [Elektronniy resurs] / H. Basciano, L. Federico, A. Khosrow // Nutrition & Metabolism. - 2005. - 2:5. - Режим доступу до журн.: doi:10.1186/1743-7075-2-5.
9. Ferguson L. R. Is the dietary fibre concept becoming too hard to digest? / L. R. Ferguson // British Journal of Nutrition. - 2008. - N 100. - P. 693-694
10. Health benefits of dietary fiber / James W Anderson, Pat Baird, Richard H Davis [et all.] // Nutrition Reviews®. - Vol. 67(4). - P. 188-205.
11. Kelley G. L. High dietary fructose induced a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation / G. L. Kelley, G. Allan, S. Azhar // Endocrinology. - 2004. - N 145. - P. 548 - 555.
12. Lazar M. A. The tumoral side of insulin resistance / M. A. Lazar // Nat Med. - 2006. - N.12. - P.43 -44.
13. Local 19 and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB / D. Cai, M. Yuan, D. F. Frantz [et all.] // Nat Med. - 2005. - Vol. 11. - P. 183-190
14. Metformin 7 inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state / M. Foretz [et all.] // The Journal of Clinical Investigation. - Vol.120, N.7. - P. 2355 - 2369.
15. Metformin therapy in a hyperandrogenic anovulatory mutant murine model with polycystic ovarian syndrome characteristics improves oocyte maturity during superovulation / Sabatini M. E. Et all // Journal of Ovarian Research. - 2011, 4:8
16. Poss A. P. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats / A. P. Poss [et all.] // Neurobiol Learn Mem. - 2009. - Vol. 92, N. 3. - P. 410 - 416.
17. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta / Yuan M., Konstantopoulos N., Lee J. [et all.] // Science. - 2001. - Vol. 293(5535). - P. 1673-1677
18. Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>t</sub> method / T. D. Schmittgen, K. J. Livak // NATURE PROTOCOLS. - 2008. - Vol.3, N.6. - P. 1101 - 1108

Матеріал надійшов до редакції 10.09.2014