

Молекулярный водород улучшает состояние при ожирении и диабете, индуцируя печеночный FGF21 и стимулируя энергетический метаболизм у мышей *db/db*

Наоми Камимура¹, Киэми Нисимаки¹, Икурох Осава^{1,2} и Шигео Охта¹

Недавние обширные исследования показали, что молекулярный водород (H₂) обладает большим потенциалом для лечения заболеваний, связанных с окислительным стрессом, путем вдыхания газа H₂, инъекций физиологического раствора с растворенным H₂ или питьевой воды с растворенным H₂ (H₂-вода); однако мало что известно о динамическом перемещении H₂ в организме. Во-первых, мы показываем, что гликоген печени накапливает H₂ после перорального приема H₂-воды, объясняя, почему потребление даже небольшого количества H₂ в течение короткого промежутка времени эффективно улучшает различные модели заболеваний. Этот вывод был подтвержден экспериментом *in vitro*, в котором раствор гликогена поддерживал уровень H₂. Затем мы исследовали пользу от употребления H₂-воды по желанию при сахарном диабете 2 типа с использованием мышей модели ожирения *db/db*, у которых отсутствует функциональный рецептор лептина. Употребление H₂-воды снижало окислительный стресс печени и значительно уменьшало жировую дистрофию печени у мышей *db/db*, а также вызванную диетой с высоким содержанием жиров жировую дистрофию печени у мышей дикого типа. Длительное употребление H₂-воды значительно контролировало содержание жира и массу тела, несмотря на отсутствие увеличения потребления диеты и воды. Более того, употребление H₂-воды снижало уровни глюкозы, инсулина и триглицеридов в плазме крови, влияние которых на гипергликемию было аналогично ограничению диеты. Чтобы изучить, как употребление H₂-воды улучшает ожирение и метаболические параметры на молекулярном уровне, мы изучили профили экспрессии генов и обнаружили повышенную экспрессию гормона печени, фактора роста фибробластов 21 (FGF21), который способствует увеличению расхода жирных кислот и глюкозы. Действительно, H₂ стимулировал энергетический метаболизм, измеряемый потреблением кислорода. Настоящие результаты свидетельствуют о потенциальной пользе H₂ в лечении ожирения, диабета и метаболического синдрома.

Ожирение (2011) **19**, 1396-1403. doi:10.1038/oby.2011.6

Введение

Окислительный стресс участвует во многих заболеваниях, связанных с образом жизни, включая диабет, атеросклероз, сердечную недостаточность, болезнь Альцгеймера и болезни Паркинсона (1-6). Недавние исследования показали, что молекулярный водород (H₂) действует как новый антиоксидант и предотвращает или улучшает течение заболеваний, связанных с окислительным стрессом, в экспериментах на животных (7-18) и клинических испытаниях (19-22). Мозг, сердце, печень и кишечник были защищены от окислительного стресса путем вдыхания 1-2% газа H₂ (7-11). Интересно, что помимо вдыхания газа H₂, употребление воды с растворенным H₂ (H₂-вода) защищало мозг и почки от окислительного стресса (12-15). Эти исследования убедительно свидетельствуют о потенциале H₂ в качестве эффективного терапевтического и профилактического антиоксиданта; однако вода растворяет H₂ при концентрации 0,8 ммоль / л при насыщении. Таким образом, остается открытым вопрос, почему потребление даже небольшого количества H₂ эффективно при различных моделях заболеваний.

Окислительный стресс является одной из причин сахарного диабета 2 типа (1-3). Чтобы изучить, оказывает ли H₂ влияние на диабет 2 типа, мы использовали мышей *db/db*, у которых окислительный стресс накапливается в печени и приводит к гипергликемии и гиперлипидемии (23). ДБ/дБ мышей отсутствие функционального рецептора лептина, и интенсивно исследуются в качестве модели для 2 типа диабета (24,25).

В этом исследовании мы показали, что H₂ может накапливаться в печени вместе с гликогеном после перорального приема. Далее, хроническое потребление H₂-воды снижало окислительный стресс в печени мышей *db/db*, а также улучшало ожирение и диабет. В качестве механистического исследования мы показали, что длительное потребление H₂-воды усиливало экспрессию печеночного гормона, фактора роста фибробластов 21 (FGF21), который является регулятором расхода энергии (26-29). Эти результаты свидетельствуют о большом потенциале водородной терапии и профилактики метаболического синдрома.

¹ Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Sciences, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, Kawasaki, Kanagawa, Japan; ²Department of Environmental Gerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, Japan. Correspondence: Shigeo Ohta (ohta@nms.ac.jp)

Received 27 July 2010; accepted 3 January 2011; published online 3 February 2011. doi:10.1038/oby.2011.6

Методы и процедуры животных

Самцы крыс Sprague–Dawley в возрасте 10 недель и самцы мышей C57BL/6 в возрасте 12 недель были приобретены у Nippon SLC (Хамамаци, С.Хизуока, Япония). Генетически большие диабетом самцы *мышей db/db* (BKS.Cg *Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jcl*) и их недиабетические гетерозиготные пометы *db/+* (BKS.Cg *m+/+lepr^{db}/Jcl*) были приобретены в возрасте 5 недель у CLEA Japan (Токио, Япония). Мышам давали воду H₂ с 6-недельного возраста. Для исследования ожирения, вызванного диетой, мышам C57BL/6 давали диету с высоким содержанием жиров (F2HFD1; Восточные дрожжи, Токио, Япония) в течение 1 или 2 недель. Уход и использование лабораторных животных осуществлялись в соответствии с руководящими принципами Национальных институтов здравоохранения. Это исследование было одобрено Комитетом по уходу и использованию животных Японской медицинской школы (Токио, Япония).

Водородная вода

H₂-воду готовили, как описано ранее (12). вкратце, H₂ растворяли в воде под высоким давлением (0,4 МПа) до пересыщенного уровня, а насыщенную H₂-воду хранили при атмосферном давлении в алюминиевом пакете без мертвого объема. Насыщенную H₂-воду использовали в качестве 100% H₂-воды. Ч₂-В качестве контрольной воды использовали воду, дегазированную при осторожном перемешивании. Насыщенную H₂-воду разбавляли девятикратным количеством контрольной воды и использовали в качестве 10% насыщенной H₂-воды. Мышам свободно давали воду, используя закрытые стеклянные сосуды, оснащенные выпускной линией, содержащей два шарикоподшипника, которые предохраняли воду от дегазации. Сосуд каждый день в 14:00 заново наполнялся водой H₂.

Ограничение в питании

Мышей, страдающих диабетом, подвергали контролируемому диетическому ограничению таким образом, чтобы ежедневное потребление рациона было эквивалентно 80% или 50% от потребления рациона *ad libitum*. Контрольным группам был разрешен свободный доступ к пище и воде на протяжении всего эксперимента. В группе с ограниченным рационом мышам разрешали *воду без ограничений*, но потребление пищи было ограничено.

Измерение концентрации h2

Концентрацию H₂ в ткани печени крысы измеряли с помощью водородного электрода игольчатого типа (Unisense, Орхус, Дания). Крыса получала стакан воды перорально через желудочный зонд в дозе 15 мл/кг. На протяжении всего эксперимента ток электрода измеряли пикоамперметром (Кейтли, Кливленд, Огайо), а концентрацию H₂ определяли по калибровочной кривой, сгенерированной с использованием известных уровней H₂-насыщенного физиологического раствора.

В результате в лабораторных условиях эксперимент, ч₂ концентрации гликогена, глюкозы, растворов, питьевой воды в стеклянный сосуд был измерен УЗИНГ в needletype водородный электрод, как описано выше.

Сбор проб и биохимический анализ

Мышей умерщвляли под наркозом, кровь брали из сердца, а ткани печени вырезали и замораживали жидким азотом или фиксировали 4%-ным параформальдегидом для дальнейшего анализа. Антиоксидантный эффект H₂ определяли путем измерения перекисей липидов в печени с использованием набора для анализа на малоновый диальдегид (Northwest Life Science Specialties, Ванкувер, Вашингтон), а уровень перекисей липидов

выражали в нмоль малонового диальдегида (МДА)/мг белка. Концентрации общих кетоновых тел, триглицеридов и общего холестерина в плазме крови определяли с помощью коммерчески доступных наборов (Wako Pure Chemical Industries, Осака, Япония). Уровень холестерина липопротеинов низкой плотности холестерина липопротеинов высокой плотности в плазме крови измеряли с помощью наборов (Sekisui Medical, Токио, Япония). Уровень глюкозы в плазме и неэтерифицированные жирные кислоты определяли с помощью наборов, выпускаемых фирмами Shino-Test (Токио, Япония) и Eiken Chemical (Токио, Япония) соответственно. Уровень инсулина в плазме крови определяли с помощью набора для ИФА инсулина (Институт биологических наук Моринога, Канагава, Япония).

Окрашивание в масляно-красный цвет

Печень мышей фиксировали в 4% параформальдегиде в фосфатно-буферном физиологическом растворе, заливали и подвергали криосечению 10 мм тонкимсрезом. Срезы промывали 60%-ным изопропанолом, окрашивали 0,25%-ным масляным раствором Repro O, промывали 60%-ным изопропанолом и монтировали в водный растворитель. Площадь окрашенного липида (%) рассчитывали с использованием программы Image J (версия 1.41; Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд) по четырем срезам для каждой мыши.

Анализ состава жировых отложений

Для компьютерно-томографического анализа состава жира в организме мышей анестезировали галотаном в смеси закиси азота и кислорода (70%:30% по объему), а затем консервировали с использованием экспериментальной компьютерной томографической системы для животных LaTheta LCT-100 (Aloka, Токио, Япония). Смежные изображения срезов размером 1 мм использовались для количественной оценки с использованием программного обеспечения LaTheta (версия 1.00). Были выделены и количественно оценены висцеральный жир, подкожный жир и мышцы.

Выделение РНК и обратная транскриптаза-ПЦР

Общую РНК выделяли из ткани печени с использованием набора RNeasy Mini (QIAGEN, Валенсия, Калифорния). Комплементарную ДНК, сгенерированную обратной транскриптазой SuperScript II (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния), анализировали методом количественной ПЦР с использованием термоциклической системы Dice реального времени TP800 (TAKARA BIO, Сига, Япония). Все образцы были нормализованы по экспрессии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Последовательности праймеров и зондов для каждой ПЦР показаны в [таблице 1](#).

Поведенческий анализ

Двигательную активность у *мышей регистрировали автоматически, используя систему мониторинга лабораторных животных (ACTIMO-100; Shinfactory, Фукуока, Япония) db/+ и db/db* - у мышей. Мышей содержали по отдельности и поддерживали температуру на уровне 22 °С. Продукты питания и вода с водородом или без него были доступны *свободно*. Мышей акклиматизировали в камерах в течение 24 ч перед началом записи, а затем наблюдали в течение 48 ч. Двигательную активность измеряли в виде амбулаторных отсчетов по записи постоянных эффективных перерывов в работе соседних инфракрасных лучей. Суммарный амбулаторный подсчет по осям x и y регистрировался каждые 10 мин.

Непрямой калориметрический анализ

Скорость метаболизма измеряли методом непрямого калориметрического анализа у мышей db/+ и db/db с использованием калориметра с открытым контуром (Охумах; Columbus Instruments, Колумбус, Огайо). Мышей помещали по отдельности в камеру (20 × 10 × 12,7 см) и поддерживали температуру на уровне 22°C при расходе воздуха 0,5 л/мин. Пища и вода с H₂ или без него были доступны в неограниченном количестве. Мышей акклиматизировали в камерах в течение 48 ч перед началом записи, а затем наблюдали в течение 48 ч. VO₂ и VCO₂ измеряли каждые 10 мин с помощью электрохимического анализатора O₂ и датчика CO₂ (Охумах), и коэффициент дыхательного обмена рассчитывали как VCO₂/VO₂ (объем произведенного CO₂ на объем потребленного O₂ (мл/кг/ч)).

Статистический анализ

Мы провели статистический анализ с использованием программного обеспечения StatView (SAS Institute), применив непараметрический двухфакторный t-критерий Стьюдента и ANOVA с последующим точным тестом Фишера, как описано ранее (7). Различия считались статистически значимыми при P < 0,05.

Табл. 1 Праймеры и зонды для обратной транскриптазы-ПЦР

Gene	Sequence
FGF21	F primer 5'-CCGCAGTCAGAAAGTCTCTCT-3'
	R primer 5'-TCTGAAGCTGCAGGCCTCA-3'
	Probe 5'-AGCTCTCTATGGATCGCCTCACTTTGATCC-3'
PEPCK	F primer 5'-TGCTGCAACAACAAGGCG-3'
	R primer 5'-TTTGCCGAAGTTGTAGCCG-3'
	Probe 5'-TCATCATGCACGACCCCTTTGCC-3'
G6PC	F primer 5'-CGCCATGCAAGGACTAGGA-3'
	R primer 5'-AGGGCCGATGTCAACACCT-3'
	Probe 5'-TAAAGCCTCTGAAACCCATTGTGAGGCC-3'
GAPDH	F primer 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGA-3'
	R primer 5'-ATGTTCTGGGACCC-3'
	Probe 5'-TGGATGGCCCTCTGGAAGCTG-3'

FGF21, фактор роста фибробластов 21; GAPDH, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; G6PC, глюкозо-6-фосфатаза, каталитическая субъединица; PEPCK, фосфоенолпируваткарбоксикиназа.

Результаты

Молекулярный водород накапливается в печени вместе с гликогеном

Мы отслеживали динамическое движение H₂ в печени после перорального приема H₂-воды. Крыса получала H₂-воду перорально через желудочный зонд, и уровни H₂ в печени контролировали путем непосредственного введения водородного датчика игольчатого типа в печень на час (рисунок 1а). Профиль концентрации H₂ достигал максимума через 5 мин после введения H₂-воды как в сытой, так и натощак печени; однако между сытой и натощак печенью была обнаружена большая разница; максимальный уровень H₂ в сытой печени был в два раза выше, чем в печени натощак. Более того, сытая печень поддерживала значительный уровень H₂ в течение часа, в то время как в печени натощак он возвращался к базовому уровню через 25 минут.

Поскольку сытая печень богата гликогеном, мы предположили, что более высокие полимеры углеводов, включая гликоген, обладают способностью поддерживать уровень H₂. Чтобы проверить это предположение, мы исследовали насыщенную растворимость H₂ в ионах гликогена и глюкозного раствора с помощью водородного датчика. H₂ растворяли в растворе гликогена или глюкозы путем барботирования газа H₂ до насыщенного уровня (рисунок 1b).

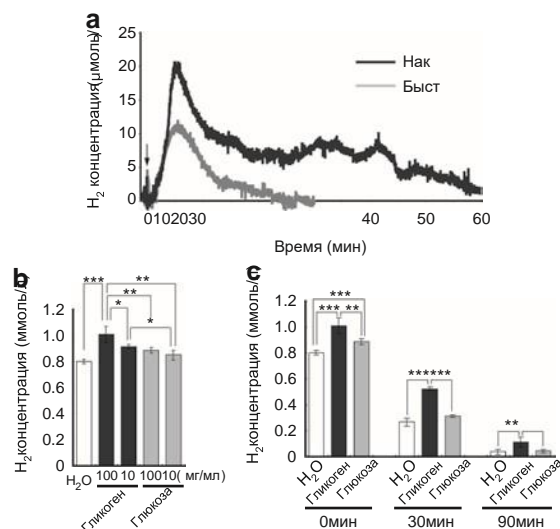


Рис. 1 Водород накапливается и поддерживается в питающейся печени и в растворе гликогена *in vitro*. (а) Концентрацию молекулярного водорода в печени контролировали с помощью игольчатого датчика водорода в печени крыс, которых кормили или голодали на ночь. Крыса получала водородную воду (0,8 ммоль/л ч₂ в воде) перорально через желудочный зонд в дозе 15 мл/кг. Стрелка указывает точку time, когда крысе вводили водородную воду. (b) Насыщенная концентрация водорода в растворах гликогена и глюкозы, а также в воде. Молекулярный водород растворяли в указанных растворах путем барботирования газа H₂ до насыщенного уровня. Концентрацию водорода в растворе измеряли с помощью водородного датчика. Данные представляют собой средние значения ± s.d. (n = 3). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 по сравнению с группами со 100 или 10 мг/мл гликогена. (с) Концентрация водорода в воде, 100 мг/мл раствора гликогена и 100 мг/мл раствора глюкозы после прекращения барботирования. Насыщенные водородом растворы выдерживали в пластиковой пробирке с закрытой крышкой при температуре 20°C в течение 0, 30 или 90 мин при атмосферном давлении. Концентрацию водорода в растворе измеряли с помощью датчика водорода. Данные представляют собой среднее значение ±s.d. (n = 3). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

По сравнению с раствором глюкозы и водой, раствор гликогена растворял значительно большее количество H₂. Гликоген и глюкоза не влияли на гликогеновый сенсор hydro (данные не показаны). Кроме того, H₂ дольше сохранялся в насыщенном растворе гликогена, чем в насыщенном растворе глюкозы или воде в пластиковой пробирке с откинутой крышкой при атмосферном давлении (рисунок 1с). Период полувыведения составил 19,1 ± 2,3, 30,9 ± 3,0 и 20,3 ± 0,4 мин (среднее значение ± с.д., n = 3) в растворах воды, 100 мг/мл гликогена и глюкозы соответственно. Период полураспада растворения H₂ в растворе гликогена был увеличен в 1,6 раза. Таким образом, предполагается, что H₂ может накапливаться и резервироваться в печени вместе с гликогеном, предполагая, что расщепление гликогена должно сопровождаться высвобождением H₂.

Потребление водородной воды снижает окислительный стресс в печени и улучшает жировую дистрофию печени

Поскольку ожирение является провоспалительным заболеванием, потребление H₂-воды может подавлять ожирение, действуя как противовоспалительное средство. Чтобы изучить антиоксидантный эффект H₂ на печень, мы использовали мышей на модели ожирения и сахарного диабета 2 типа *db/db*, у которых отсутствуют функциональные рецепторы лептина, поскольку в печени накапливается окислительный стресс. Мыши *db/db* и их худые собратья по помету *wild-type* в количестве H₂ не содержащем в себе H₂, без ограничений, в течение 3 месяцев. H₂-воду заменяли на свежую насыщенную или 10%-ную насыщенную воду через 1400 ч каждый день. Концентрацию растворенного H₂ измеряли как, как описано в Методах и процедурах (рисунок 2а). Поскольку мыши *db/db* пили гораздо больше воды, чем мыши дикого типа, H₂ гораздо быстрее дегазировался в воздушную фазу в сосуде, используемом для мышей *db/db*; однако с помощью этого метода сохранялось значительное количество H₂.

Влияние H₂ на окислительный стресс в печени оценивали по уровню малонового диальдегида (MDA), маркера окислительного стресса, получаемого из перекисей липидов. Уровень MDA в печени мышей, получавших H₂, значительно снизился почти до уровня контрольных мышей без диабета, что указывает на то, что

потребление H₂-воды в неограниченном количестве заметно подавляло окислительный стресс (рис. 2б). Пунктирный рисунок, вызванный накоплением fat, исчез в печени мышей *db/db* с H₂, по сравнению с контрольными мышами, которым вводили воду *db/db* (рисунок 2с, вставки верхних панелей). Масляно-красное окрашивание О показало, что введение H₂ значительно уменьшало накопление нейтральных липидов в печени *мышей db/db* (рисунок 2б, нижние панели и рисунок 2д, левый график). Кроме того, даже при кратковременном введении (1-2 недели) H₂ значительно снижал накопление жира в печени мышей с ожирением, индуцированным диетой с высоким содержанием жиров, используя мышей дикого типа (рисунок 2д, середина и правый график). Эти данные ясно указывают на то, что потребление H₂ заметно снижает уровни окислительного стресса в печени и улучшает жировую дистрофию печени у *мышей с db/db*, а также у мышей с ожирением, вызванным диетой.

Потребление водородной воды подавляло увеличение массы тела и снижало уровни глюкозы и триглицеридов в плазме крови

Для изучения влияния H₂ на ожирение у *мышей db/db*-мышей, вес тела контролировали в течение всего периода эксперимента, а массу жира в организме в возрасте 18 недель измеряли с помощью компьютерной томографии. Мышей случайным образом разделили на 3 группы. I группе (контрольной) разрешили свободно пить воду без H₂.

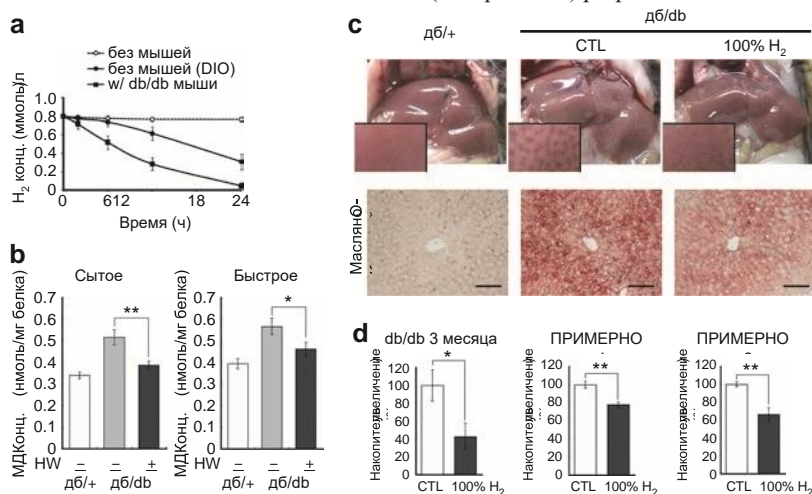


Рисунок 2 Потребление водорода подавляет окислительный стресс в печени и улучшает жировую дистрофию печени. (а) Концентрацию водорода в стеклянном сосуде, описанную в разделе "Методы и процедуры", измеряли без участия мышей (открытый круг), показывая, что оборудование удерживает водород. Профиль концентрации водорода в питьевой воде в стеклянном сосуде, полученный у *мышей db/db* (замкнутый квадрат) или мышей дикого типа, используемых для лечения ожирения, вызванного диетой (DIO) (замкнутый круг), указывает на то, что газообразный водород выделялся в воздушную фазу при употреблении воды. Данными являются среднее значение \pm s.d. ($n = 3$). (б) Malondialdehyde concentration in a fed and голодавшей на ночь. Мышам *db/db* в течение 3 месяцев давали воду с водородом или без него. Данные представляют собой среднее значение \pm s.e.m. ($n = 10$ for each *db/+* group and $n = 15$ for each *db/db* в ДБ). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. (с) Внешний вид и репрезентативное масляно-красное окрашивание печеночными *db/+* и *db/db* мышей, получавших воду с водородом и без него в течение 3 месяцев соответственно. Шкала: 100 мкм. (д) Уровни накопления жира в печени. Мышам *db/db* течение 3 месяцев (левая панель). Мышам DIO (ожирение, вызванное диетой с высоким содержанием жиров) давали воду с водородом или без него в течение 1 или 2 недели (средняя или правая панель). Накопление жира в печени рассчитывали по окрашиванию в масляно-красный цвет О с использованием программы анализа изображений, Image J program. Данные представляют собой среднее значение \pm s.e.m. ($n = 12$ for each *db/db* и *db/db*, как правило, по 8 для каждой группы DIO). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Группе II и Group III давали H₂-воду с содержанием 0,8 ммоль/л (насыщенная H₂-вода; 100%) и 0,08 ммоль/л (10% насыщенный уровень H₂) соответственно. На начальной фазе эксперимента прирост массы тела животных всех групп был сходным, что свидетельствует об отсутствии токсического эффекта H₂-впосле; однако, в то время как контрольные мыши демонстрировали прогрессирующее увеличение массы тела, мыши в группах,

которым вводили 100% и 10% H₂, достигли умеренного увеличения массы тела (рисунок 3б). Мыши II группы (100% H₂) были стройнее, а их масса тела была значительно ниже, чем у мышей I группы (контрольной) в возрасте 18 недель (рисунок 3а, б). Подавление увеличения массы тела наблюдалось у мышей, употреблявших 10% воды с содержанием H₂ (группа III) (рисунок 3б). Жировые отложения также были существенно ниже у мышей,

потреблявших 100% H₂ (рисунок 3с, d). Поскольку количество потребляемой пищи и воды не различалось между группами (рисунок 3е, f), предполагается, что потребление H₂ стимулирует энергетический обмен, подавляя увеличение жира и массы тела.

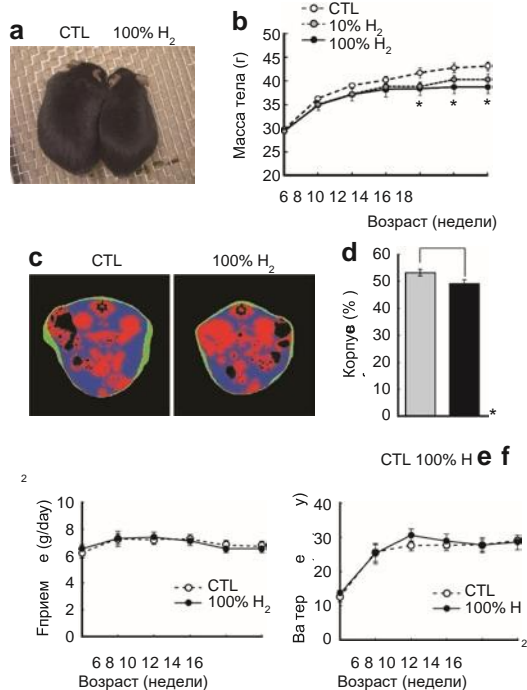


Рисунок 3 Потребление молекулярного водорода подавляет ожирение. (a) Внешний вид мышей db/db, которым давали воду с водородом или без него в течение 3 месяцев. Каждая среднестатистическая мышь была сфотографирована. (b) массу тела мышей db/db, которым давали воду со 100% (0,8 ммоль/л) или 10% (0,08 ммоль/л) водородом, оценивали каждые 2 недели. Контрольные мыши (CTL) получали воду без водорода. *P < 0,05; 100% H₂ по сравнению с контрольной группой (n = 9 для H₂ и n = 6 для контрольной группы). (c) репрезентативные КТ-изображения брюшной полости средних мышей db/db, пьющих воду с водородом или без него в течение 3 месяцев. Синий, зеленый и красный представляют висцеральный жир, подкожно-жировую клетчатку и мышцы соответственно. (d) Общий жировой состав тела мышей db/db, рассчитанный путем интегрирования площади жира в каждом срезе по изображениям компьютерной томографии. Данные являются средними ± s.e.m. (n)

Затем мы провели биохимические исследования крови. Уровни глюкозы и инсулина в плазме были значительно снижены в группе, получавшей 100% H₂, а триглицериды были значительно снижены как в группах, получавших 100%, так и в группах, получавших 10% H₂ (рисунок 4а-с). Общее количество кетоновых тел в плазме имело тенденцию к увеличению в группе, получавшей 100% H₂ (рисунок 4d), в то время как не было обнаружено изменений в уровнях свободных жирных кислот в плазме, холестерина липопротеидов высокой плотности, холестерина липопротеидов низкой плотности, общего холестерина, и адипонектина (рисунок 4е-и). Эти данные показывают, что употребление H₂ заметно улучшает ожирения, гипергликемии и плазменным триглицеридов диабетической db/db мышей.

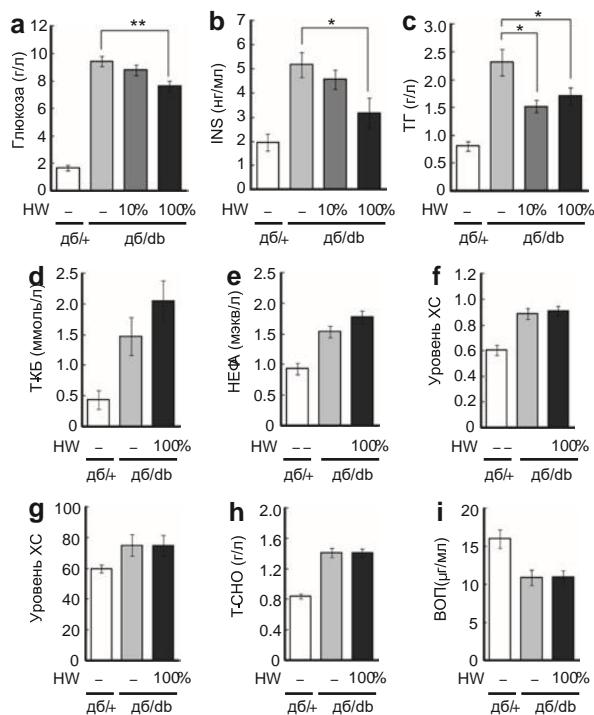


Рис. 4. Потребление молекулярного водорода подавляет гипергликемию, гиперинсулинемию и уровень триглицеридов в плазме крови. Мышам Db/db давали воду со 100% (0,8 ммоль/л) или 10% (0,08 ммоль/л) водородом в течение 3 месяцев. Мышам Db/+ и db/db давали воду без содержания водорода (HW) в течение того же периода времени, что и контрольным. Для получения параметров плазмы мышей db/+ и db/db были проведены биохимические анализы. (a) Концентрация глюкозы в плазме, (b) инсулина, (c) триглицеридов (TG), (d) общего количества кетоновых тел (Т-КВ), (e) свободных жирных кислот (NEFA), (f) холестерина липопротеидов высокой плотности (HDL-C), (g) липопротеины низкой плотности-холестерин ЛПНП (С-ЛПНП), (h) общий холестерин (Т-СНО) и (i) адипонектин (ADN) показаны как среднее значение ± s.e.m. (n = 15). *P < 0,05, **P < 0,01.

Потребление водородной воды оказывает эффект, аналогичный ограничению в питании

Поскольку db/db не могут регулировать свой аппетит при употреблении избыточного рациона с помощью дефицитного гена рецептора лептина, ограничение рациона должно быть эффективным для улучшения состояния при ожирении и диабете (30). Когда *мышей* db/db подвергали контролируемому диетическому ограничению, уровни **глюкозы в плазме, инсулина и триглицеридов значительно снижались** (рисунок 5а-с). При сравнении эффектов от употребления воды H₂ и диетического ограничения уровень глюкозы в плазме крови мышей, получавших 80% *рациона ad libitum*, был таким же, как у мышей, которым вводили H₂ (рисунок 5а). Кроме того, наблюдался аддитивный эффект, когда мышам давали как воду с содержанием H₂, так и ограниченную диету (рисунок 5а). Аналогичный аддитивный эффект наблюдался в отношении уровней триглицеридов в плазме крови (рисунок 5с). В частности, когда H₂-воду и 80%-ное ограничение рациона давали мышам с db/db, уровень триглицеридов в плазме достиг уровня контрольных db/+ (рисунок 5с).

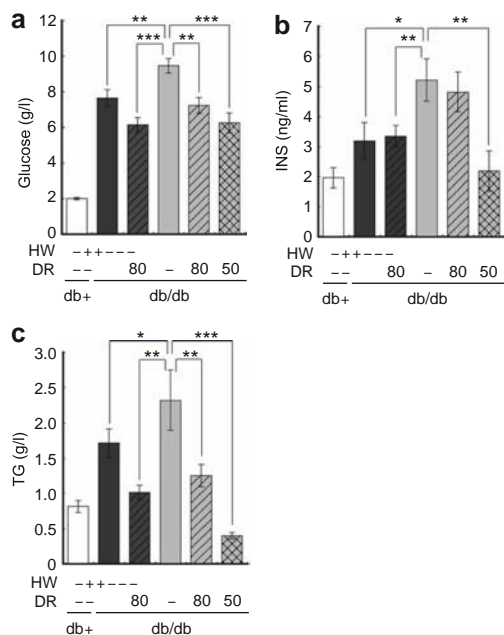


Рис. 5. Действие водорода аналогично действию диетических ограничений. Мышам Db/db давали воду с водородом или без него (HW) и подвергали диетическому ограничению (DR). Контрольным группам был разрешен свободный доступ к пище и воде на протяжении всего эксперимента. В группах с ограниченным питанием мышам разрешали воду ad libitum, но потребление пищи было ограничено до 80% или 50% от общего рациона. Концентрации (а) глюкозы, (б) инсулина (INS) и (в) триглицеридов (TG) в плазме крови были измерены после 3-месячного лечения. Данные являются средними ± s.e.m. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; по сравнению с группой HW (-)/DR (-) (n = 8-15).

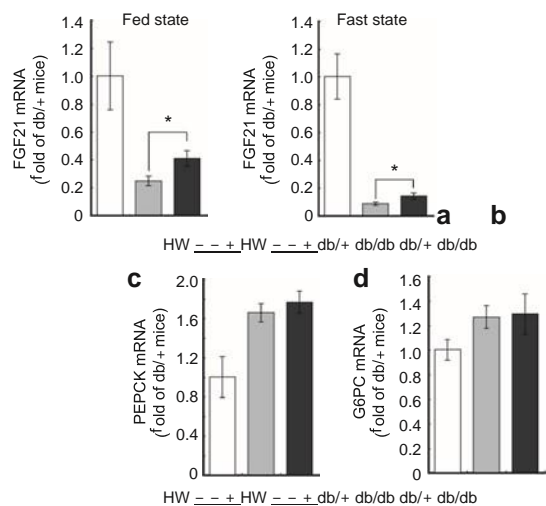


Рис. 6. Хроническое воздействие водорода на экспрессию гена фактора роста фибробластов 21 (FGF21) в печени. Мышам Db/+ и db/db давали воду с водородом или без него в течение 3 месяцев. (а) измеряли экспрессию гена FGF21 в печени, получавшей питание, (б) FGF21 в печени, получавшей быстрое питание, (с) фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK) и (д) глюкозо-6-фосфатазы, каталитической субъединицы (G6PC). Данные являются средними ± s.e.m. *P < 0,05; контроль по сравнению с водородной водой у мышей db/db (n = 15).

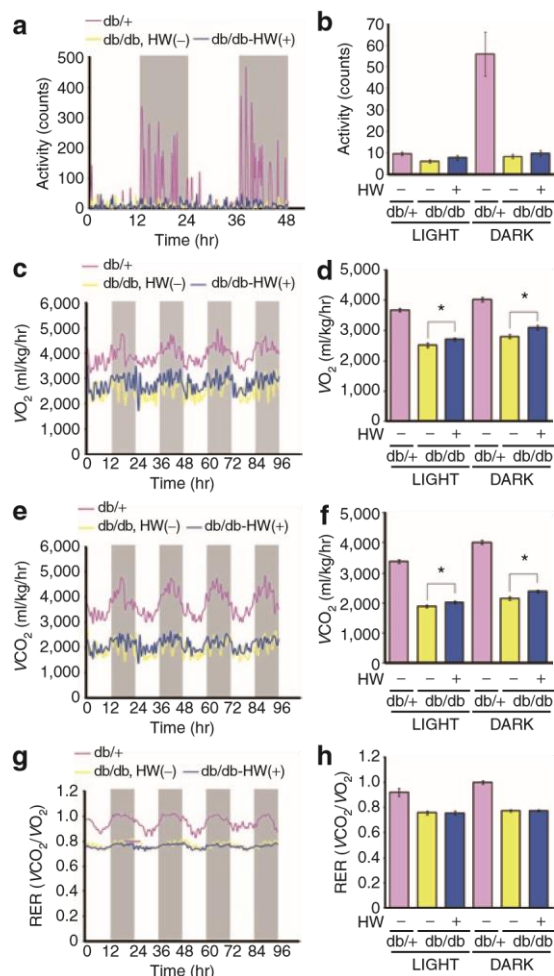


Рис 7. Молекулярный водород увеличивает потребление кислорода и выработку углекислого газа, не влияя на двигательную активность. (а и б) двигательная активность, (с и d) потребление кислорода, (е и f) выработка углекислого газа и (g и h) RER (скорость дыхательного обмена) у мышей db/+ и db/db, которым давали воду со 100% (0,8 ммоль/л) водородом или без него, в течение 3 месяцев. (а, с, е и g) Репрезентативные профили для каждого параметра. Серая область представляет темную фазу. (b, d, f и h) Данные представляют собой среднее значение ± s.e.m. (n = 9 и n = 6, для групп db/db и для групп db/+ соответственно). *P < 0,05.

Потребление водородной воды повышает уровень мРНК FGF21 в печени

Печень играет важную роль в контроле уровня глюкозы в крови, модулируя катаболизм глюкозы и глюконеогенез. Чтобы понять механизм того, как H₂ регулирует уровень глюкозы и триглицеридов, мышам db/db, получавшим H₂-воду в течение 3 месяцев, подвергли анализу экспрессии генов, связанных с регуляцией глюконеогенеза. Фосфоенолпируваткарбоксикиназа катализирует начальную стадию глюконеогенеза, а глюкозо-6-фосфатаза катализирует последнюю завершённую стадию этого процесса (31). Данные ПЦР в реальном времени показали, что введение H₂ не оказывало влияния на уровни мРНК фосфоенолпируваткарбоксикиназы и глюкозо-6-фосфатазы, каталитической субъединицы (G6PC) в печени (рис. 6с, d).

Поскольку FGF21, атипичный представитель семейства факторов роста фибробластов, участвует в энергетическом метаболизме, мы сосредоточились на экспрессии гена FGF21 после комплексного изучения экспрессии гена. Введение H₂

индуцировало уровни мРНК FGF21 в печени независимо от того, питалась печень или натошак (рис. 6а, б). Эти результаты указывают на то, что, по крайней мере частично, индукция печеночного FGF21 способствует снижению уровня глюкозы и триглицеридов в плазме крови. питьевая водородная вода стимулирует энергетический обмен. Чтобы проверить, стимулирует ли питьевая H₂-вода энергетический обмен, мы исследовали потребление кислорода (O₂) и выработку углекислого газа (CO₂). Сначала мы сравнили физические способности, обнаружив движение мышей с помощью инфракрасных лучей. Хотя мыши db/db, по-видимому, были менее активны на свету и в темноте, чем контрольные мыши db/+, не было обнаружено различий между мышами db/db с H₂-водой и без нее (рис. 7а, б).

Мыши db/db с H₂-водой или без нее потребляли меньше O₂ и производили меньше CO₂, чем контрольные мыши db/+ (рис. 7с–f).

Более того, важно, что мыши db/db, употреблявшие H₂, потребляли больше O₂, на 10%, и производили больше CO₂, на 10%, чем мыши db/db, не получавшие H₂-воды, как ночью, так и днем (рис. 7с–f). Поскольку показатели дыхательного обмена (VCO₂/VO₂) не различались у мышей db/db с H₂-водой и без нее, источник углерода для производства энергии не изменялся для стимуляции энергетического метаболизма (рис. 7g, h).

Таким образом, употребление H₂-воды подавляет накопление жира и массы тела и улучшает метаболические параметры, стимулируя энергетический обмен.

Обсуждение

В этом исследовании мы показываем новое преимущество H₂, оно может быть полезно при терапии и профилактике ожирения и диабета. К настоящему времени многие сообщения подтвердили, что потребление H₂ снижает окислительный стресс в различных моделях заболеваний и клинических тестах (7,8,10–16,19). Клинические тесты показали, что употребление H₂-воды снижает уровень окислительного стресса у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (19) или субъектов с потенциальным метаболическим синдромом (20), а также влияет на метаболизм глюкозы (19) и холестерина (20).

Митохондрии являются основным источником активных форм кислорода во время метаболизма, связанного с производством энергии, и H₂ непосредственно защищает митохондрии, которые подвергаются воздействию активных форм кислорода (7). Таким образом, может быть разумным, что митохондриальный энергетический метаболизм, особенно метаболизм жирных кислот, функционирует против окислительного стресса, эффективно расходуя глюкозу и жирные кислоты.

Первоначально H₂ растворяли в питательной среде, и было показано, что он защищает клетки и органеллы путем прямого взаимодействия высокоактивных активных форм кислорода (7). Затем мозг, сердце, печень и кишечник были защищены от окислительного стресса вдыханием газа H₂ (7-11). Интересно, что вместо вдыхания газа H₂ вода H₂water эффективно защищала мозг и почки от окислительного стресса (12-15) и снижала маркеры окислительного стресса у пациентов с сахарным диабетом и потенциальным метаболическим синдромом (19,20). Питьевая H₂-вода - самый удобный способ употребления H₂; однако, когда H₂ потребляется из H₂-воды, может быть потреблено очень ограниченное количество H₂, поскольку H₂

растворяется в воде при насыщенном уровне всего 0,8 ммоль/л при атмосферном давлении. После употребления H₂-воды большая часть H₂ в крови становится незаметной в течение 30 мин (14), вероятно, при выдохе из легких; таким образом, остается открытым вопрос, почему H₂-вода эффективна, несмотря на ее небольшое количество и короткое воздействие. В этом исследовании было обнаружено, что H₂ может накапливаться и запасаться в печени с помощью гликогена, что, по крайней мере, частично объясняет этот вопрос.

Более того, сообщалось, что H₂ действует как противовоспалительный и противоаллергический регулятор, индуцируя воспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли-α, интерлейкин-6 и некоторые фосфорилирующие сигнальные факторы (9,10,14,32). С другой стороны, была принята концепция о том, что ожирение является провоспалительным заболеванием (33); таким образом, потребление H₂-воды может подавлять ожирение, действуя как противовоспалительное средство.

В качестве альтернативы, мы обнаружили, что потребление H₂-воды усиливает экспрессию FGF21. Поскольку не было показано, что H₂ непосредственно регулирует транскрипцию, H₂ косвенно участвует в экспрессии FGF21. Поскольку FGF21 является метаболическим гормоном, который улучшает чувствительность к инсулину и клиренс глюкозы, снижает концентрацию триглицеридов в плазме крови и подавляет увеличение веса при диете с высоким содержанием жиров (26-29), все результаты, показанные в этом исследовании, были объяснены повышенной экспрессией FGF21.

Действительно, мы обнаружили, что употребление H₂-воды стимулирует энергетический обмен, измеряемый потреблением O₂ и выработкой CO₂. Усиление энергетического метаболизма может полностью объяснить, почему потребление H₂-воды подавляет увеличение жира и массы тела и улучшает метаболические параметры; однако остается неизвестным, полностью ли индукция FGF21 объясняет усиление энергетического метаболизма. Более того, взаимосвязи между снижением окислительного стресса, индукцией экспрессии FGF21 и стимуляцией энергетического метаболизма все еще неясны. Следует проанализировать, являются ли эти взаимосвязи прямыми или косвенными. Возможно, было бы полезно изучить взаимосвязь ожирения с окислительным стрессом. Хотя основная мишень H₂, по существу, остается неизвестной, эти результаты дают ключ к пониманию механизма хронического лечения H₂-водой.

Наконец, мы хотели бы подчеркнуть, что новое преимущество H₂ в терапевтическом и профилактическом применении при метаболическом синдроме может быть достигнуто наиболее удобным способом - H₂-водой.

Подтверждения

Мы благодарим BlueMercury (Токио, Япония) за щедрый дар водородной воды и М. Такеду за техническую помощь. Эта работа была поддержана грантом Министерства образования, культуры, спорта, науки и техники Японии (№20300230 для S.O. и №20500723 для N.K.) и Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения для S.O. (Грант на очные исследования (20В-13) для неврологических и психиатрических учреждений. Нарушения NCNP).

Раскрытие

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

© 2011 The Obesity Society

Рекомендации

1. Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:771–779.
2. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 2009;84:705–712.
3. Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009;16:763–774.
4. Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:372–381.
5. Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:643–650.
6. Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol* 2008;4:600–609.
7. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K *et al*. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007;13:688–694.
8. Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M *et al*. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:670–674.
9. Nakao A, Kaczorowski DJ, Wang Y *et al*. Amelioration of rat cardiac cold ischemia/reperfusion injury with inhaled hydrogen or carbon monoxide, or both. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:544–553.
10. Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R *et al*. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 2008;8:2015–2024.
11. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I *et al*. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;373:30–35.
12. Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 2009;34:501–508.
13. Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64:753–761.

14. Cardinal JS, Zhan J, Wang Y *et al*. Oral hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rats. *Kidney Int* 2010;77:101–109.
15. Fujita K, Seike T, Yutsudo N *et al*. Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *PLoS ONE* 2009;4:e7247.
16. Fu Y, Ito M, Fujita Y *et al*. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2009;453:81–85.
17. Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:1195–1198.
18. Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T *et al*. Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51: 487–492.
19. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M *et al*. Supplementation of hydrogenrich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 2008;28:137–143.
20. Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome—an open label pilot study. *J Clin Biochem Nutr* 2010;46:140–149.
21. Nakayama M, Kabayama S, Nakano H *et al*. Biological effects of electrolyzed water in hemodialysis. *Nephron Clin Pract* 2009;112:c9–15.
22. Suzuki Y, Sano M, Hayashida K *et al*. Are the effects of α -glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? *FEBS Lett* 2009;583:2157–2159.
23. Kumashiro N, Tamura Y, Uchida T *et al*. Impact of oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 2008;57:2083–2091.
24. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetesobesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978;14:141–148.
25. Leibel RL, Chung WK, Chua SC Jr. The molecular genetics of rodent single gene obesities. *J Biol Chem* 1997;272:31937–31940.
26. Reitman ML. FGF21: a missing link in the biology of fasting. *Cell Metab* 2007;5:405–407.
27. Kharitonov A, Shyanova TL, Koester A *et al*. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005;115:1627–1635.
28. Kharitonov A, Wroblewski VJ, Koester A *et al*. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 2007;148:774–781.
29. Kharitonov A, Shanafelt AB. FGF21: a novel prospect for the treatment of metabolic diseases. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10: 359–364.
30. Lee SM, Bressler R. Prevention of diabetic nephropathy by diet control in the db/db mouse. *Diabetes* 1981;30:106–111.
31. Ruderman NB. Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. *Annu Rev Med* 1975;26:245–258.
32. Itoh T, Fujita Y, Ito M *et al*. Molecular hydrogen suppresses Fc ϵ s1R-mediated signal transduction and prevents degranulation of mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;389:651–656.
33. Aggarwal BB. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. *Annu Rev Nutr* 2010;30:173–199.

Перевод на русский язык осуществлен при помощи сервиса ЯндексПереводчик. Приносим извинения за возможные неточности перевода.

Оригинал размещен адресу: National Library of Medicine, National Center for Biotechnological Information <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21293445/>

Национальный центр биотехнологической информации способствует развитию науки и здравоохранения, предоставляя доступ к биомедицинской и геномной информации.

Для цитирования: Kamimura N, Nishimaki K, Ohsawa I, Ohta S. Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jul;19(7):1396-403. doi: 10.1038/oby.2011.6. Epub 2011 Feb 3. PMID: 21293445.