



ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Взаимовлияния микроэлементов в крови лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении

А.О. Ревякин¹, Н.Н. Каркищенко¹, Е.Б. Шустов¹, В.Н. Каркищенко¹,
Д.А. Ксенофонов²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»,
Московская область

² – РГАУ – МСХА им. К.А.Тимирязева, Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, scbmt@yandex.ru

Методом атомно-абсорбционной спектрометрии изучено содержание кальция, магния, железа, меди, марганца и цинка в тканях лабораторных животных при уровнях пищевого потребления, составляющих 100, 120 и 140% от суточной потребности. Выявлены статистические закономерности их взаимосвязи в крови.

Ключевые слова: металлохелаты, микроэлементы, содержание в крови, атомно-абсорбционная спектрометрия.

Данная статья является продолжением анализа данных, полученных при исследовании особенностей распределения металлов в тканях лабораторных животных при их нормальном и избыточном пищевом потреблении, и опубликованных нами ранее [2, 3].

Схема проведения экспериментальной работы

Исследование планировалось и проводилось в соответствии с требованиями ГОСТ 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и РД 64-126-91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологиче-

ских средств. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией НЦБМТ ФМБА России.

Исследование выполнялось на лабораторных белых аутбредных крысах, поступивших из филиала «Андреевка» НЦБМТ ФМБА России. Карантин, содержание животных, осмотры и рандомизация, введение препаратов и эвтаназия осуществлялись в соответствии с утвержденными СОП (Стандартные операционные процедуры) организации. Животные содержались в вентилируемых клетках RairIsoSystem. В качестве корма животным использовался стандартный экструдированный грану-

лированный полнорационный комбикорм для лабораторных животных ПК-120, произведенный в соответствии с ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось в свободном режиме, исходя из суточных нормативов. Водопроводная очищенная вода давалась всем животным *ad libitum* в стандартных поилках.

Полнорационный комбикорм в суточной дозе (из расчета на одну крысу массой 250 г) содержал кальция - 54 мг, железа - 0,54 мг, цинка - 0,136 мг, марганца - 0,27 мг, меди - 0,072 мг, магния - 0,8 мг, кобальта - 0,0054 мг.

Так как в исследовании планировалось изучение содержания металлов в тканях животных при избыточном их поступлении, то дополнительное количество металлов, обеспечивающее превышение суточной нормы потребления на 20 и 40%, вводилось животным в виде смеси хелатных комплексов ежедневно, однократно, внутривентрально в

объеме 0,1 мл водного раствора, на протяжении 28 дней.

Животные выводились из эксперимента методом декапитации с отбором крови и тканей. Ткани высушивались в сухожаровом шкафу при температуре +105 °С до достижения постоянной сухой массы, затем озолялись в муфельной печи при температуре +850 °С. Навески золы растворяли в 30% химически чистой соляной кислоте и определяли содержания металлов методом атомно-абсорбционной спектроскопии [4] (прибор «Спектр 5-4», производство ОАО «Союзцветметавтоматика», Россия, номер Государственного реестра средств измерений 13743-04). Полученные количественные результаты измерений из золных навесок пересчитывались в содержание металлов в тканях (мг / 100 г ткани).

Исследуемые металлохелатные комплексы были получены путем совместной инкубации при комнатной темпера-

Таблица 1
Статистические характеристики распределения металлохелатов в крови крыс

Статистический параметр	Ca	Cu	Mn	Fe	Mg	Zn
Среднее	3,6914	0,857963	0,093917	228,2269	1,819633	2,424767
Стандартная ошибка	0,135	0,045167	0,011326	17,06994	0,040148	0,101818
Медиана	3,8365	0,8428	0,069	207,4905	1,783	2,2385
Мода	4,1	0,83	0,04	160	1,594	2,161
Стандартное отклонение	0,739425	0,247391	0,062037	93,49589	0,2199	0,557679
Дисперсия выборки	0,54675	0,061202	0,003849	8741,481	0,048356	0,311006
Экссесс	-0,41035	0,259695	0,76253	1,228308	0,860984	5,283579
Асимметричность	-0,10138	0,26055	1,230637	0,984952	0,918417	2,288396
Интервал	3,035	1,029	0,2289	428,652	0,903	2,403
Минимум	2,369	0,36	0,0262	69,888	1,49	1,873
Максимум	5,404	1,389	0,2551	498,54	2,393	4,276
Коэффициент вариации.	0,148114	0,071335	0,040979	0,409662	0,120848	0,229993
Счет	30	30	30	30	30	30

туре и $pH=7,1 - 7,2$ водных растворов солей металлов с низкомолекулярной фракцией (< 10 кДа) ферментативных гидролизатов сывороточных белков молока [1]. Полученные жидкие хелаты лиофильно высушивали и определяли в них содержание металлов атомно-абсорбционным методом.

В работе исследовалось содержание металлов в кров (суммарно плазма и форменные элементы крови).

Содержание металлов в крови (мг/100 г ткани) животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении имеет следующие статистические характеристики (табл. 1).

На следующем этапе анализировалось возможное взаимовлияние металлохелатов на содержание их в крови. С этой целью с помощью анализа частотных кривых распределения для каждого из анализируемых металлохелата были определены границы зон низкой, средней и высокой концентрации в крови животных. Затем последовательно методом дисперсионного факторного анализа оценивались возможные влияния одного из металлохелатов (независимый металл) на распределение значений других металлов в крови (табл. 2). Для показателей, имевших достоверные влияния, проводился корреляционный анализ.

Анализ таблицы 2 показывает, что между содержанием кальция в крови и уровнем железа в этой ткани существуют конкурентные взаимоотношения (коэффициент корреляции $r=-0,53$) – чем ниже уровень кальция, тем выше уровень железа, и наоборот, чем выше уровень кальция в крови, тем меньше в крови уровень железа. Как правило, такие взаимоотношения характерны при

конкуренции веществ за переносчик (белок-носитель) при доминирующей роли в этой паре кальция. Именно его содержание в крови определяет содержание железа (коэффициент детерминации 0,34, влияние фактора значимо при $p=0,003$). При этом уровень содержания железа не оказывает достоверного влияния на содержание кальция (коэффициент детерминации 0,15, $p=0,12$).

Эти данные позволяют предположить, что в крови существует *два белка-переносчика* – первый, более афинный к кальцию, но способный также переносить ионы железа на не оккупированных кальцием местах связывания, и второй, специализированный по железу. В роли второго (специализированного по железу) переносчика, скорее всего, может выступать трансферрин, а в роли первого переносчика (более афинного к кальцию) – альбумины (именно с альбуминами связано до 45% сывороточного кальция).

Влияние меди на содержание железа в крови описывается куполообразной кривой: низкому содержанию меди соответствует и низкое значение железа, среднему уровню меди – самое высокое содержание железа, высокому содержанию меди – умеренное, более низкое значение содержания железа. Можно предположить, что железо-связывающая способность основного переносчика железа в крови – трансферрина в какой-то степени зависит от уровня меди (при более низком содержании меди или количестве переносчика снижено, или его конформация при этом не является оптимальной для связывания с железом).

При среднем уровне концентрации меди переносчик железа находится в оп-

Таблица 2

Дисперсионный факторный анализ влияния металлохелатов на распределение значений других металлов в крови лабораторных животных

Металл независимый	Металл зависимый	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания независимого металла в крови			Коэффициент детерминации модели, D	Уровень значимости, p
		низкий	средний	высокий		
Кальций	Медь	0,83	0,82	1,08	0,12	0,16
	Марганец	0,08	0,11	0,08	0,06	0,42
	Железо	299	192	172	0,34	0,003
	Магний	1,79	1,84	1,85	0,01	0,83
	Цинк	2,39	2,32	2,90	0,12	0,19
Медь	Кальций	4,06	3,50	4,21	0,16	0,10
	Марганец	0,05	0,09	0,13	0,11	0,20
	Железо	138	256	198	0,24	0,026
	Магний	1,66	1,83	1,99	0,18	0,07
	Цинк	2,20	2,50	2,31	0,05	0,52
Марганец	Кальций	3,14	3,80	3,94	0,15	0,11
	Медь	0,68	0,87	1,02	0,18	0,07
	Железо	246	220	236	0,01	0,83
	Магний	1,73	1,77	2,12	0,38	0,002
	Цинк	2,45	2,45	2,31	0,01	0,88
Железо	Кальций	4,11	3,76	3,18	0,15	0,12
	Медь	0,58	0,91	0,88	0,20	0,045
	Марганец	0,06	0,10	0,09	0,06	0,46
	Магний	1,67	1,87	1,77	0,11	0,21
	Цинк	2,19	2,40	2,67	0,07	0,40
Магний	Кальций	3,61	3,77	3,48	0,02	0,71
	Медь	0,72	0,89	0,92	0,09	0,29
	Марганец	0,08	0,08	0,18	0,35	0,003
	Железо	242	221	237	0,01	0,88
	Цинк	2,61	2,42	2,20	0,06	0,46
Цинк	Кальций	3,49	3,71	3,86	0,2	0,76
	Медь	0,69	0,89	0,89	0,10	0,25
	Марганец	0,09	0,10	0,09	0,004	0,95
	Железо	175	227	300	0,14	0,13

тимальной активности, а при высоком содержании меди в крови, возможно, может возникать частичная конкуренция между медью и железом за переносчик (избыточная медь вытесняет железо из связи с сывороточным белком, что способствует более быстрой элиминации железа из крови).

Существует и своеобразное встречное влияние (уровня железа на содержание меди в крови) – низкому уровню железа в крови соответствует и низкие значения меди, в то же время среднему и повышенному уровню железа соответствует средний уровень меди в крови (коэффициент детерминации этой модели

равен 0,20, уровень значимости модели $p=0,045$).

Возможно, такое влияние может быть объяснено через влияние железа на синтез в печени основного переносчика меди – церулоплазмينا (с этим белком связано до 60-65% переносимой меди) или иных переносчиков меди: транскуприн (12-14%), альбуминов (12-17%), аминокислот гистидина, треонина, глутамина (10-15%) [5]. При этом может реализовываться следующая цепочка: низкий уровень железа – низкий уровень синтеза переносчика – низкое содержание меди в крови.

Для меди также выявлена статистическая тенденция влияния на уровень магния в крови (динамика центроидов монотонно возрастающая, коэффициент корреляции $r=0,36$, коэффициент детерминации равен 0,18, $p=0,07$). Известно [5], что 25% сывороточного магния связано с альбуминами. Возможно, уровень меди влияет на синтез альбуминов в печени.

Достаточно своеобразные взаимовлияния выявлены между содержанием марганца и магния в крови. Коэффициент корреляции между содержанием этих металлов в крови $r=+0,55$. Однако динамика центроидов этих металлов не является монотонной. Так, низким и средним значениям марганца в крови соответствует умеренно повышенный уровень содержания магния, а высоким значениям – высокие значения магния в крови. Аналогичная динамика характерна и для анализа фактора «содержание магния»: низким и средним значениям магния в крови соответствует умеренно сниженный уровень содержания марганца, а высоким значениям – средние значения марганца в крови. В обоих случаях коэффициент детерминации модели

равен 0,35, уровень значимости $p<0,003$.

На уровне статистических тенденций (коэффициент детерминации 0,18, $p=0,07$) проявляется позитивное влияние уровня марганца на уровень меди в крови (повышение содержания меди при повышении уровня марганца). Содержание цинка в крови не проявляло влияния на содержание других анализируемых металлов в крови.

Таким образом, взаимные влияния металлов на их содержание в крови могут быть представлены следующим графом связей (рис.).

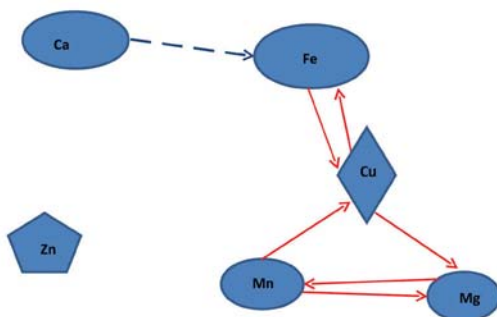


Рис. Граф взаимовлияний металлов на их содержание в крови. Обозначения: непрерывная красная линия – влияние по типу усиления, синяя пунктирная линия – влияние по типу конкуренции.

Выводы

Статистический анализ характеристик значений содержания металлов в крови животных при нормальном или избыточном их пищевом потреблении показал, что только для меди распределение значений соответствует распределению случайной величины (не испытывает дополнительного влияния внешних факторов). Наибольшее влияние внешних факторов характерно для содержания кальция и цинка в крови. Низкая вариативность показателей содержания в крови меди и марганца отражает су-

ществование жестких механизмов их гомеостатического регулирования.

Между содержанием кальция в крови и уровнем железа в этой ткани существуют конкурентные взаимоотношения (коэффициент корреляции $r=-0,53$), которые могут быть объяснены конкуренцией веществ за транспортный белок-переносчик при доминирующей роли в этой паре кальция. Предположительно в роли такого транспортного белка могут выступать альбумины крови.

Выявлено влияние железа на содержание меди в крови, что может быть связано с его влиянием на синтез медь-переносящих белков (церулоплазмينا, транскуприна).

Выявлены взаимосвязи между содержанием меди, магния и марганца в крови, механизм которого пока еще не установлен.

Уровень цинка в крови не оказывал влияния на содержание других микроэлементов.

Список литературы

1. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Люблинский С.Л., Капанадзе Г.Д., Шустов Е.Б., Ревякин А.О., Болотских Л.А., Касинская Н.В., Станкова Н.В. Роль микроэлементов в спортивном питании и без-опасность металлохелатов // Биомедицина. 2013. № 3. С. 12-41.
2. Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонов Д.А., Касинская Н.В. Особенности распределения металлов в организме лабораторных животных при разных уровнях их пищевого потребления // Биомедицина. 2013. № 3. С. 82-90.
3. Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонов Д.А., Касинская Н.В. Влияние колебаний содержания металлов в крови на их содержание в тканях лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении металлохелатов // Биомедицина. 2013. № 4. С. 16-28.
4. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ. Л.: Химия. 1983. 144 с.
5. Элементный статус населения России. Ч. 1. Общие вопросы и современные методические подходы к оценке элементного статуса индивидуума и популяции / под ред. А.В.Скального. М.Ф.Киселева. СПб.: Медкнига «Элби-СПб». 2010. 416 с.

Interferences of microcells in blood of laboratory animals at normal and excess food consumption

A.O. Revyakin, N.N. Karkischenko, E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, D.A. Ksenofontov

The method of a nuclear and absorbing spectrometry studied the quantity of calcium, magnesium, iron, copper, manganese and zinc in tissues of laboratory animals at levels of food consumption, components of 100, 120 and 140% of daily requirement. Statistical regularities of their interrelation in blood are revealed.

Key words: metalchelates, microcells, blood composition, nuclear and absorbing spectrometry.