



Взаимовлияния микроэлементов в печени 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 – ФГБОУ ВПО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, ar_info@mail.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 - 4].

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 фармакологических 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 гранулированный полнорацонный 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.

Полнораационный 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, внутривентрикулярно 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 сушильном 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 [5] (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 совмест-

Таблица 1.

Статистические характеристики содержания металлов в тканях печени крыс при нормальном и избыточном его пищевом потреблении.

Статистический параметр	Ca	Cu	Mn	Fe	Mg	Zn
Среднее	2,51	1,50	0,53	104,6	6,49	3,89
Стандартная ошибка	0,10	0,09	0,02	3,6	0,14	0,16
Медиана	2,48	1,37	0,54	105,8	6,45	3,92
Мода	2,10	1,30	0,53	129,0	5,34	5,30
Стандартное отклонение	0,54	0,50	0,08	19,8	0,78	0,88
Дисперсия выборки	0,30	0,25	0,01	395,1	0,60	0,78
Экссесс	0,024	2,446	-0,545	-0,573	-0,589	-1,203
Асимметричность	0,307	1,602	-0,164	-0,378	0,266	0,134
Интервал	2,25	2,01	0,30	74,7	2,8	3,2
Минимум	1,51	0,91	0,38	58,6	5,3	2,4
Максимум	3,76	2,92	0,68	133,3	8,1	5,6
Коэффициент вариации.	0,22	0,33	0,15	0,18	0,12	0,22
Счет	30	30	30	30	30	30
Нижняя граница среднего уровня, мг/100 г ткани	2,0	1,1	0,45	85,0	6,0	2,9
Нижняя граница верхнего уровня	3,0	2,0	0,60	125,0	7,2	4,9

ной инкубации при комнатной температуре 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 печени лабораторных животных.

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

Анализ таблицы 1 показывает, что основная масса металлов (за исключением меди и цинка) имеет характер распределения содержания в печени близкий, к кривой нормального распределения (близкие значения средней величины, медианы и моды распре-

Таблица 2.
Влияние уровня металла в тканях печени животных на содержание других металлов в печени

Металл независимый	Металл зависимый	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням содержания независимого металла в печени			Кoeffици- ент детер- минации модели, D	Уровень значи- мости, p
		низкий	средний	высокий		
Кальций	Медь	1,30	1,51	1,59	0,03	0,68
	Марганец	0,44	0,56	0,52	0,26	0,02
	Железо	100	104	112	0,03	0,67
	Магний	7,17	6,34	6,63	0,14	0,14
	Цинк	3,45	4,03	3,68	0,06	0,42
Медь	Кальций	2,72	2,41	2,81	0,09	0,29
	Марганец	0,57	0,53	0,53	0,03	0,66
	Железо	106	104	109	0,01	0,91
	Магний	6,29	6,57	6,41	0,02	0,74
	Цинк	4,27	3,92	2,97	0,15	0,11
Марганец	Кальций	1,71	2,75	2,31	0,45	0,0003
	Медь	1,37	1,60	1,31	0,07	0,38
	Железо	109	103	109	0,02	0,75
	Магний	7,58	6,36	6,24	0,31	0,007
	Цинк	2,92	3,84	4,61	0,32	0,005
Железо	Кальций	2,36	2,49	2,72	0,04	0,53
	Медь	1,18	1,65	1,36	0,16	0,09
	Марганец	0,57	0,51	0,60	0,24	0,02
	Магний	5,63	6,74	6,62	0,30	0,006
	Цинк	4,36	3,58	4,38	0,20	0,06
Магний	Кальций	2,23	2,74	2,18	0,24	0,03
	Медь	1,24	1,61	1,44	0,08	0,32
	Марганец	0,57	0,56	0,43	0,43	0,0005
	Железо	83	110	114	0,37	0,002
	Цинк	4,57	3,90	3,08	0,31	0,007
Цинк	Кальций	2,47	2,57	2,22	0,05	0,51
	Медь	2,27	1,40	1,28	0,38	0,002
	Марганец	0,51	0,54	0,58	0,05	0,47
	Железо	101	109	87	0,14	0,13
	Магний	6,63	6,61	5,72	0,16	0,09

ления, не высокие значения параметров «эксцесс» и «асимметрия»), и, следовательно, в отношении содержания в печени кальция, марганца, железа и магния не выявляются значимые внешние факторы воздействия. На распределение же значений содержания меди и цинка имеются влияния каких-либо внешних факторов (таблица 2).

Анализ таблицы 2 показывает, что уровень кальция в печени оказывает достоверное влияние на уровень марганца в печени (низкому уровню кальция соответствует и низкий уровень марганца, среднему и высокому уровню кальция соответствует средний уровень марганца, коэффициент детерминации модели 0,26, $p=0,02$). Такое взаимоотношение может объяснено, если синтез тканевых структур, с которыми связывается в печени марганец, зависит от кальция.

Существует и обратная взаимосвязь: уровень марганца оказывает аналогичное достоверное и еще более выраженное влияние на содержание кальция в печени (низкому уровню марганца соответствует и низкое значение кальция, средним и высоким значениям уровня марганца в печени соответствуют средние значения уровня кальция, коэффициент детерминации модели 0,45, $p=0,0003$).

Для меди не было выявлено никакого влияния на содержание исследованных металлов в печени.

Между содержанием марганца и магния в печени выявлены конкурентные взаимоотношения (коэффициент корреляции между значениями $r=-0,53$): низкому содержанию марганца соответствуют высокие значения содержания магния, и увеличение содержания марганца в печени ведет к снижению содержания в ней магния (коэффициент де-

терминации модели 0,31, $p=0,007$). Эта конкуренция проявляется и в обратном направлении – высокому содержанию магния в крови соответствует более низкий уровень марганца (коэффициент детерминации модели 0,43, $p=0,0005$). На основании таких взаимосвязей можно предположить, что в печени марганец и магний конкурируют за места связывания в тканевом депо, причем белки-носители этого тканевого депо более афинны к магнию (при низком уровне марганца преобладает связывание с магнием, при среднем уровне содержания марганца наблюдается примерно равнозначная оккупация сайтов связывания обоими металлами, а высокий уровень магния в печени ведет к вытеснению марганца из депо).

Марганец оказывает влияние на содержание цинка в печени (коэффициент корреляции между значениями $r=+0,64$) – чем выше концентрация марганца, тем выше и концентрация цинка (коэффициент детерминации модели 0,32, $p=0,005$).

Для железа установлено умеренное влияние на содержание меди, марганца, магния и цинка. Более отчетливо оно проявляется в отношении магния (коэффициент корреляции между значениями $r=+0,57$): низкому уровню железа соответствует и более низкий уровень магния в печени, среднему и высокому значению содержания железа в печени соответствует умеренно повышенное содержание магния в печени (коэффициент детерминации модели 0,30, $p=0,006$).

Можно предположить, что при более низких значениях железа в печени нарушается формирование тканевого депо магния, а при увеличении содержания железа тканевое депо магния в

печени функционирует полноценно. В то же время существует и аналогичное обратное влияние магния на содержание железа в печени (при низком уровне магния депо в печени для железа не способно его кумулировать на среднем уровне концентраций).

Особый интерес могут представлять данные о конкурентных взаимоотношениях на уровне печеночных тканевых депо между магнием и цинком (коэффициент корреляции между значениями $r=-0,52$). Низкому уровню содержания магния в крови соответствует высокое содержание цинка, при увеличении содержания магния в печени содержание цинка в ней достоверно снижается (коэффициент детерминации модели 0,31, $p=0,007$). В то же время, высокое содержание цинка в печени сопровождается вытеснением магния из этого тканевого депо (коэффициент детерминации модели 0,16, $p=0,09$).

Аффинитет печеночного тканевого депо к цинку более высокий (насыщение происходит при более низких концентрациях металла), но степень связи

у магния более прочная (вытеснение магния из депо происходит только на высоких уровнях концентрации цинка в печени).

В свою очередь цинк оказывает конкурентное влияние на содержание меди в печени (при низких значениях цинка содержание меди в печени более высокое, увеличение концентрации цинка до среднего уровня сопровождается понижением содержания меди также до среднего уровня, дальнейшее повышение уровня цинка в печени способствует вытеснению меди из тканевого депо (коэффициент корреляции между значениями этих показателей $r=-0,52$, коэффициент детерминации модели 0,37, $p=0,002$).

Для оценки интегрального влияния металлов на их содержание в печени были рассчитаны два индекса – индекс влияния и индекс зависимости, которые определялись как среднеквадратичное значение соответствующих коэффициентов детерминации при факторном анализе возможного влияния металлов друг на друга. Полученные индексы отражены на рис. 1.

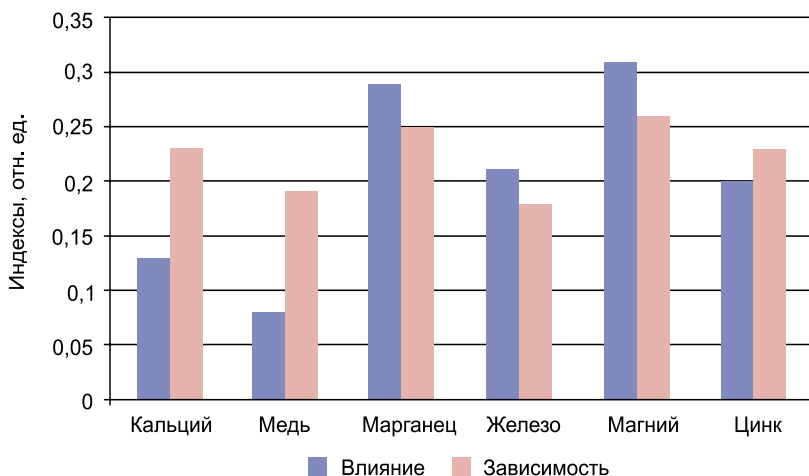


Рис. 1. Интегральная оценка влияния и зависимости металлов друг от друга в печени крыс

Анализ рисунка 1 показывает, что меньше всего влияют на концентрацию в печени других металлов медь и кальций (их возможное влияние находится в диапазоне до 15% всей вариативности содержания других металлов в печени). Средняя степень влияния имеют железо и цинк (их возможное влияние находится в диапазоне 20-25% всей вариативности содержания других металлов в печени). Наиболее выраженное влияние на содержание других металлов в печени оказывают магний и марганец (29-31% вариативности).

В то же время зависимость металлов от содержания в печени других металлов может быть отнесена как средняя (для всех металлов индекс зависимости находится в диапазоне 0,18-0,26 отн.ед). Чуть более зависимыми можно считать уровни магния и марганца в печени. Интересно, что эти же металлы являются и наиболее влияющими на другие металлы в печени.

В обобщенном виде взаимовлияния металлов на их содержание в печени представлены на рис. 2.

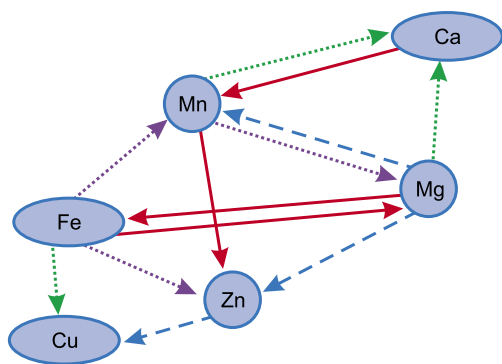


Рис. 2. Граф взаимовлияний металлов на их содержание в печени. Обозначения: непрерывная красная линия – влияние по типу усиления, синяя пунктирная линия – влияние по типу конкуренции, зеленая точечная линия – «куполообразный» тип влияния, фиолетовая точечная линия – «чашеобразный» тип влияния.

ВЫВОДЫ:

Статистический анализ характеристик значений содержания металлов в крови животных при нормальном или избыточном их пищевом потреблении показал, что для кальция, марганца, железа и магния распределение значений соответствует распределению случайной величины (они не испытывают дополнительного влияния каких-либо внешних факторов). Наибольшее влияние внешних факторов характерно для содержания меди и цинка в крови. Низкая вариативность показателей содержания в крови магния, железа и марганца отражает существование жестких механизмов их гомеостатического регулирования.

Между содержанием марганца в печени и уровнем магния в этой ткани существуют конкурентные взаимоотношения (коэффициент корреляции $r = -0,53$), которые могут быть объяснены конкуренцией веществ за места связывания в белках тканевых депо при доминирующей роли в этой паре магния. Аналогичные конкурентные взаимоотношения выявлены в парах магний-цинк и цинк-медь. При этом аффинитет печеночного тканевого депо к цинку более высокий (насыщение происходит при более низких концентрациях металла), но степень связи у магния более прочная (вытеснение магния из депо происходит только на высоких уровнях концентрации цинка в печени). Повышение уровня цинка в печени способствует вытеснению меди из тканевого депо.

Выявлено влияние марганца на содержание цинка в печени, что может быть связано с его влиянием на синтез цинк-связывающих белков.

Взаимодействие железа с другими металлами в тканях печени носит сложный, не линейный характер, что необходимо учитывать при применении препаратов железа в клинической практике.

Для меди не было выявлено никакого влияния на содержание исследованных металлов в печени.

ЛИТЕРАТУРА

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 безопасность металлохелатов // Биомедицина, 2013. - № 3. – С. 12 – 41.
2. Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонтов 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., Ксенофонтов 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. Ревякин А.О., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Ксенофонтов Д.А., Касинская Н.В. Взаимовлияния микроэлементов в крови лабораторных животных при нормальном и избыточном пищевом потреблении // Биомедицина, 2014. - №1. – С. 61-66.
5. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ. Л.: Химия, 1983. – 144с.

Interferences of trace elements in liver of laboratory animals at normal and excess food consumption

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

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

Key words: metallochelates, trace elements, quantity of trace elements in liver, nuclear and absorbing spectrometry.