

ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА СОДЕРЖАНИЕ МЕДИ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС

Р.И.Зарипова¹, Г.Г.Яфарова^{1,2}, В.В.Андрианов^{1,2}, М.И.Сунгатуллина¹,
Н.И.Зиятдинова¹, Х.Л.Гайнутдинов^{1,2}, Т.Л.Зефирова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, РФ; ²Казанский физико-технический институт им. Е.К.Завойского, ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, РФ

Методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) исследовали содержание меди при моделировании нарастающего ограничения двигательной активности у крыс с 21-дневного возраста, анализируя количество медь-содержащих парамагнитных комплексов в тканях сердца и печени. Количество меди оценивалось по интенсивности характерного ЭПР-сигнала, принадлежащего комплексу Cu^{2+} с диэтилдитиокарбаматом (Cu^{2+} -ДЭТК₂). Установлено, что после ограничения двигательной активности длительностью 30 сут происходит увеличение содержания меди в тканях сердца и печени в 2.2 и 2.9 раза соответственно.

Ключевые слова: медь; сердце; печень; ограничение двигательной активности

Физические нагрузки и двигательная активность составляют биологическую необходимость для жизни и здоровья человека. Современные условия жизнедеятельности приводят к уменьшению доли физической активности на производстве и в быту. Ограничение двигательной активности вызвано автоматизацией и механизацией труда, профессиональной деятельностью, длительным постельным режимом, образом жизни и т. д. Меняется естественная двигательная активность современного ребёнка. По сравнению с детьми дошкольного возраста, школьники проводят больше времени в статическом положении. С каждым годом дети всё больше свободного от учёбы времени проводят с развлекательными гаджетами, у экрана телевизора или монитора компьютера. Большую актуальность приобрела проблема изменений физиологических функций и механизмов их развития у растущего организма в условиях снижения двигательной активности.

Адрес для корреспонденции: ratno1992@mail.ru. Зарипова Р.И.

DOI 10.47056/0365-9615-2024-178-9-291-295

Одним из важнейших микроэлементов для нормального функционирования организма человека является медь. Медь участвует в процессах клеточного дыхания, метаболизма железа, продукции нейротрансмиттеров, образования пигмента, в биосинтезе соединительной ткани, гормональной регуляции, иммунных нарушениях. Медь входит в состав многих важнейших ферментов, таких как церулоплазмин, цитохромоксидаза, тирозиназа, аскорбиназа, аминоксидаза и т. д. [1,2]. Медь участвует в системе антиоксидантной защиты организма, являясь кофактором фермента СОД, катализирующей дисмутацию супероксидных анион-радикалов [2–6]. СОД — важнейший компонент антиоксидантной системы. Важность сбалансированного гомеостаза меди и её безопасного транспорта подтверждается существованием ряда медь-ассоциированных заболеваний. Исследователи указывают на высокую степень распространённости медь-зависимых состояний и заболеваний, особенно среди лиц с генетическими заболеваниями нервной системы, хроническими воспалительными заболеваниями, анемиями, болезнями опорно-двигательного аппарата и т. д.

Адекватная обеспеченность организма медью приводит к улучшению фибринолитической активности крови, снижая риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [7,8]. Учитывая жизненно важную роль меди, точная регуляция её содержания имеет решающее значение для поддержания гомеостаза живых организмов.

Целью данного исследования являлось изучение интенсивности накопления меди в тканях сердца и печени растущих крыс после ограничения двигательной активности.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось в соответствии с Директивой 86/609/ЕЕС о защите животных, используемых в экспериментальных и научных целях, и рекомендациями локального биоэтического комитета Казанского федерального университета (Протокол № 39 от 22.12.2022 г.). В работе использовали белых беспородных крыс обоих полов, которых делили на две группы: 1-я (контроль, $n=10$) — растущие в условиях неограниченной двигательной активности в пределах стандартной клетки; 2-я (ОДА, $n=10$) — растущие в условиях нарастающего 30-суточного ограничения двигательной активности (ОДА).

Для симуляции нарастающего ограничения двигательной активности крыс содержали в индивидуальных клетках-пеналах в течение 30 сут, начиная с 21-дневного возраста; подробно данный метод описан нами ранее [9]. Особенности данной модели является уменьшение влияния иммобилизационного стресса, что достигается постепенным увеличением времени нахождения животных в условиях ОДА. По истечении 30 сут крысы достигали 51-дневного возраста. Контрольная группа по возрасту соответствовала экспериментальной. Согласно данным литературы, 51-дневный возраст у крыс соответствует пубертатному периоду развития, сопровождающемуся выраженными изменениями эндокринной системы, оказывающей активное влияние на регуляцию сердечной деятельности [10,11].

Содержание меди в органах крыс определяли по методике, разработанной в Институте химической физики РАН, в которой используется метод спиновой захвата. Подробности эксперимента и методики описаны нами ранее [12,13]. Компоненты спиновой ловушки вводили наркотизированному животному. В качестве наркоза использовали 25 % раствор уретана из расчёта 800 мг/кг массы, который вводили внутривенно. Все используемые препараты

разводились в физиологическом растворе. Для формирования спиновой ловушки внутривенно вводили ДЭТК-Na в дозе 500 мг/кг (в объёме 2 мл воды на 300 г массы животного). Ловушка захватывает медь и формируется устойчивый комплекс Cu^{2+} -(ДЭТК)₂. Через 40 мин после введения ловушки крысу фиксировали на операционном столе, вскрывали, сердце и печень извлекали полностью, извлечённые органы быстро просушивали. Миокард и паренхиму печени механически измельчали и замораживали в жидком азоте в специальных одноразовых шприцах для измерений. Непосредственно перед измерением готовый образец, усечённый по форме кюветы для измерений, взвешивали; масса образцов составляла около 100 мг.

Измерения спектров биологических образцов проводили на спектрометре Bruker X-диапазона (9.5320 GHz) EMX/plus. Образец в пальчиковом Дьюаре (Bruker) помещали в полость двойного резонатора (model ER 4105DR), а эталонный образец — в другую полость того же резонатора. Поскольку каждый исследуемый образец находился в одинаковых условиях с эталонным образцом, это позволило определять количественно интенсивность исследуемых образцов и сравнивать их по интенсивности друг с другом. Частота модуляции магнитного поля — 100 кГц, амплитуда модуляции — 2 Гс, мощность СВЧ-излучения — 2 мВ, временная константа — 327 мс, температура измерений — 77 К. Амплитуду модуляции, усиление и мощность СВЧ во всех экспериментах подбирали с условием отсутствия перемодуляции и насыщения сигнала ЭПР и сохраняли одинаковыми на протяжении всех измерений. Амплитуду спектров ЭПР нормировали на массу образца.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе SigmaPlot 11.0. При обработке данных выполнялась проверка выборок на нормальность (критерий Шапиро—Уилка) и равенство дисперсий. Достоверность различий исследуемых показателей определяли с применением t критерия Стьюдента (при нормальном распределении) и U критерия Манна—Уитни (при ненормальном распределении). Данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартной ошибки среднего (SEM). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методом ЭПР-спектроскопии определяли содержание меди в сердце и печени крыс после

30-суточного ОДА. ЭПР-спектр образца, взятого из сердца крысы контрольной группы, и эталонный спектр комплекса Cu^{2+} -(ДЭТК)₂ представлены на рисунке 1. В составе спектра образца виден характерный сигнал от комплекса, амплитуду которого вычисляли в ходе анализа спектров образцов тканей сердца и печени. Интенсивность сигнала от комплекса прямо пропорциональна содержанию меди в образце.

На рисунке 2 показаны полученные ЭПР-спектры тканей сердца контрольной крысы и крысы группы ОДА. На рисунке 3 приведены статистические данные по интегральным интенсивностям сигнала Cu^{2+} -(ДЭТК)₂ в спектрах исследованных образцов сердца и печени. Ограничение двигательной активности крыс в течение 30 сут приводило к значимому увеличению содержания меди в тканях сердца и печени в среднем в 2.2 и 2.93 раза соответственно ($p < 0.05$).

Хронический избыток меди в тканях ведёт к остановке роста, гемолизу, снижению содержания гемоглобина, к деградации тканей печени, почек, мозга. Гомеостаз меди в организме сопровождается быстрым связыванием меди органическими молекулами. В клетках ионы меди находятся в виде комплексных соединений с биологически активными веществами — нуклеиновыми кислотами, аминокислотами, биогенными аминами, гормонами, или входят в состав белков. Большая часть меди, которую человек получает с пищей, поступает в печень, где связывается с белками сыворотки крови — α -глобулинами (церулоплазмин). Низкий уровень церулоплазмينا приводит к накоплению "свободной", несвязанной с церулоплазмином меди. Вопрос о том, какую форму меди захватывает спиновая ловушка — "свободную" или

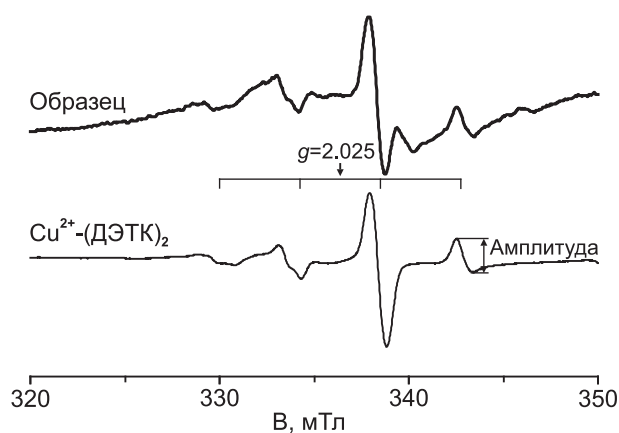


Рис. 1. Спектр ЭПР тканей сердца контрольной крысы (образец) и эталонный спектр комплекса Cu^{2+} -(ДЭТК)₂ с амплитудой, равной вкладу в спектр образца. Спектры получены при 77 К.

"связанную" с белком-носителем — остаётся открытым. Основной токсический эффект меди на клеточный метаболизм принадлежит "свободной" фракции.

Уровень сывороточной меди и церулоплазмينا повышается при различных воспалительных процессах, инфарктах миокарда, заболеваниях печени. Данный факт подтверждается увеличением частоты сердечно-сосудистых заболеваний у лиц с повышенным уровнем меди в крови. Было установлено, что при гипокинезии разной длительности содержание церулоплазмينا повышается [14]. Максимальное увеличение обнаружено на 7-й день гипокинезии, что по мнению исследователей указывает на наличие компенсированной стрессовой реакции при гипокинезии. На более поздних сроках (14, 21, 28 дней) содержание церулоплазмينا несколько снижалось, но оставалось выше контроля, что отражает определённые этапы метаболических изменений при ОДА [14]. Накопление меди инициирует оксидативный стресс, нарушение выработки цитохром-с-оксидазы и СОД-1, накопление провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-6, IL-12 и др.) [15]. Любой экспериментальный способ формирования ОДА включает в себя стрессорный компонент. По данным литературы, при 30-суточной гипокинезии происходит увеличение синтеза и секреции провоспалительных цитокинов. Провоспалительные цитокины — IL-1, IL-6, (TNF α) — способствуют синтезу церулоплазмينا, который увеличивается в плазме крови при действии гипокинезии и обеспечивает антиоксидантную защиту организма [16].

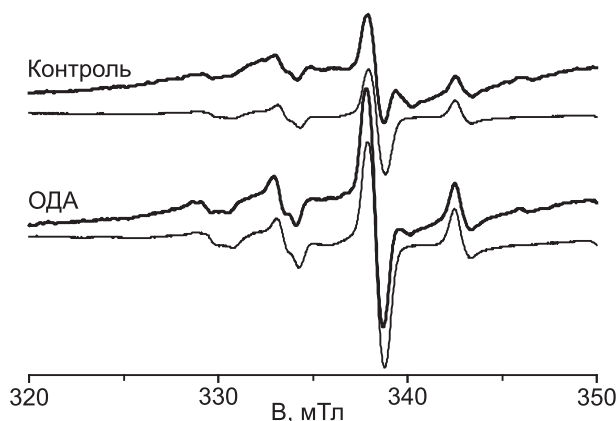


Рис. 2. Спектры ЭПР тканей сердца контрольной крысы и после 30-суточного ОДА.

Тонкие линии — эталонные спектры комплекса Cu^{2+} -(ДЭТК)₂ с амплитудами, равными вкладу в спектр соответствующего образца. Спектры получены при 77 К.

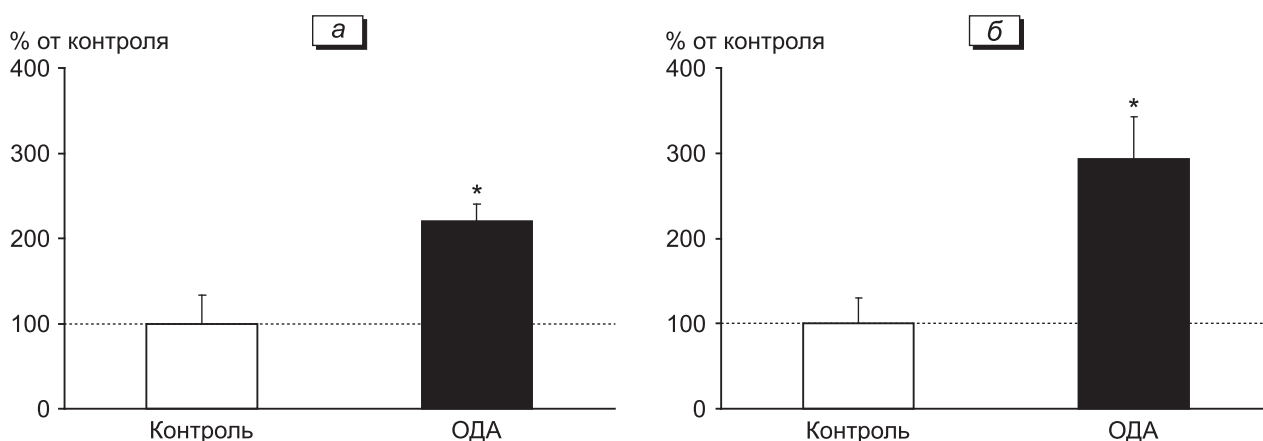


Рис. 3. Относительное содержание меди в сердце (а) и печени (б) крыс через 30 сут ОДА. * $p < 0.05$.

Полученные нами результаты показывают, что под влиянием нарастающего ограничения двигательной активности содержание меди в органах повышается. Врождённые или приобретённые нарушения метаболизма меди вызывают развитие множественных дефектов. Ранее показано, что после 16 дней гипокинезии у животных в печени наблюдаются признаки венозного полнокровия, гипоксии, потери гликогена, дистрофии, очагов некроза и увеличение размеров печени [17]. ОДА вызывает изменения в функционировании сердечно-сосудистой системы: наблюдается уменьшение массы сердца, ослабление сердечной мышцы, обнаруживаются дегенеративные изменения и т.д. Нарушение сердечного ритма, боли в области сердца, возникающие в состоянии покоя, являются показанием для определения уровня меди в сыворотке крови. К сожалению, изучение дефицита или избытка меди при различных заболеваниях проводится редко, что снижает эффективность профилактики и лечения многих болезней.

Повышение содержания меди при ОДА позволяет сделать вывод о наличии тесных связей её уровня в организме с режимом двигательной активности. Данные литературы, свидетельствующие о значительных изменениях в сердечно-сосудистой системе, внутренних органах, системе кровотока и снабжения организма кислородом на фоне ОДА, также позволяют предположить, что часть этих изменений вызвана увеличением содержания меди в ключевых для деятельности организма тканях.

Измерения спектров ЭПР образцов проводились в КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН в рамках выполнения государственного задания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Kozyreva T., Zovo K., Palumaa P. Affinity gradients drive copper to cellular destinations // *Nature*. 2010. Vol. 465. P. 645–648. doi: 10.1038/nature09018
2. Festa R.A., Thiele D.J. Copper: an essential metal in biology // *Curr. Biol*. 2011. Vol. 21, N 21. P. R877–R883. doi: 10.1016/j.cub.2011.09.040
3. Miller A.F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights // *FEBS Lett*. 2012. Vol. 586, N 5. P. 585–595. doi: 10.1016/j.febslet.2011.10.048
4. Sheng Y., Abreu I.A., Cabelli D.E., Maroney M.J., Miller A.F., Teixeira M., Valentine J.S. Superoxide dismutases and superoxide reductases // *Chem. Rev*. 2014. Vol. 114, N 7. P. 3854–3918. doi: 10.1021/cr4005296
5. Fukai T., Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases // *Antioxid. Redox Signal*. 2011. Vol. 15, N 6. P. 1583–1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999
6. Sheng Y., Capri J., Waring A., Valentine J.S., Whitelegge J. Exposure of solvent-inaccessible regions in the amyloidogenic protein human SOD1 determined by hydroxyl radical footprinting // *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 2019. Vol. 30, N 2. P. 218–226. doi: 10.1007/s13361-018-2075-y
7. Парахонский А.П. Роль меди в организме и значение ее дисбаланса // *Естественно-гуманитарные исследования*. 2015. № 10. С. 72–84.
8. López B., González A., Hermida N., Valencia F., de Teresa E., Díez J. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2010. Vol. 299, N 1. P. H1–H9. doi: 10.1152/ajpheart.00335.2010
9. Зарипова Р.И., Яфарова Г.Г., Андрианов В.В., Гайнутдинов Х.Л., Сунгатуллина М.И., Зиятдинова Н.И., Зефирова Т.Л. Продукция оксида азота в тканях крыс 7- и 16-недельного возраста при

- ограничении подвижности // Журнал технической физики. 2022. Т. 92, № 7. С. 999–1003. doi: 10.21883/JTF.2022.07.52657.336-21
10. Зефирова Т.Л., Зиятдинова Н.И., Хабибрахманов И.И., Зефирова А.Л. Возрастные особенности холинергической регуляции сердца крысы // Рос. физиол. журн. 2015. Т. 101, № 2. С. 189–199.
 11. Kuptsova A.M., Ziyatdinova N.I., Biktemirova R.G., Zevfirov T.L. Cholinergic regulation of the developing heart contractility // IJPT. 2016. Vol. 8, N 3. P. 14 999–15 007.
 12. Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Koshelev V.B. EPR study of the intensity of the nitric oxide production in rat brain after ischemic stroke // Appl. Magn. Reson. 2011. Vol. 40, N 3. P. 267–278.
 13. Зарипова Р.И., Яфарова Г.Г., Андрианов В.В., Гайнутдинов Х.Л., Зефирова Т.Л. Продукция оксида азота в тканях крыс в постнатальном онтогенезе: исследование методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса // Биофизика. 2021. Т. 66, № 3. С. 572–576. doi: 10.31857/S0006302921030170
 14. Elikov A.V. Indicators of LPO and antioxidant protection in rats during long-term restriction of motor activity // Bull. Exp. Biol. Med. 2023. Vol. 176, N 2. P. 133–136. doi: 10.1007/s10517-024-05982-8
 15. Squitti R. Copper dysfunction in Alzheimer’s disease: from meta-analysis of biochemical studies to new insight into genetics // J. Trace Elem. Med. Biol. 2012. Vol. 26, N 2–3. P. 93–96. doi: 10.1016/j.jtemb.2012.04.012
 16. Камскова Ю.Г. Роль цитокинов в динамике 30-суточной гипокинезии // Вестник ЮУрГУ. 2003. Т. 5, № 21. С. 129–131.
 17. Ткаченко А.В., Губина-Вакулик Г.И. Морфофункциональные изменения в печени крыс при экспериментальной гипокинезии // Буковинский медицинский вестник. 2006. Т. 10, № 2. С. 111–114.

Получено 28.05.24
