

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ АЦИЗОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ БИОЭЛЕМЕНТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ, ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНАХ И ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС

А.Ф. Якимовский^{1,3}, И.И. Шантырь², М.А. Власенко², М.В. Яковлева², С.Ю. Крыжановская¹*

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого 6/8; эл. почта: jakim2010@gmail.com

²Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова, Санкт-Петербург

³Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург

Содержание биоэлементов в плазме крови, печени, поджелудочной железе и головном мозге крыс изучалось методом аналитической масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Содержание основного объекта исследования – цинка у контрольных животных (с введением физиологического раствора) в плазме крови составило $3,6 \pm 1,4$ мкг/мл, в печени – $12,5 \pm 2,5$ мкг/мг сырой ткани, в поджелудочной железе – $10,9 \pm 4,1$ мкг/мг, головном мозге – $8,7 \pm 3,0$ мкг/мг. При однократном внутривенном введении донатора цинка ацизола (24 мг/кг) обнаружена тенденция к снижению содержания этого микроэлемента в исследуемых тканях, особенно в ткани головного мозга. При курсовом введении ацизола (7 инъекций в течение двух недель) происходило увеличение содержания цинка в плазме и тканях исследованных органов крыс. Повышение содержания цинка в плазме крови под влиянием ацизола коррелировало с его уровнем в тканях органов. Резкое возрастание содержания цинка в плазме крови и печени зарегистрировано через 15 ч после последней инъекции. Колебания содержания селена, кальция, меди и железа носили более сложный корреляционный характер. Полученные данные показывают, что при длительном применении ацизола происходят сдвиги в обмене биоэлементов, которые необходимо учитывать при использовании этого донатора цинка как лекарственного препарата.

Ключевые слова: ацизол, биоэлементы, плазма крови, печень, поджелудочная железа, головной мозг

DOI: 10.18097/PBMC20186402183

ВВЕДЕНИЕ

Изучение ионного гомеостаза живого организма относится к одному из актуальных разделов биоэлементологии. С учётом экологии и реальных жизнедеятельности человека актуализируются исследования состояний, в основе которых лежит дисбаланс биоэлементов, в частности – дефицит цинка [1, 2].

Препарат ацизол активно используется в медицине критических состояний как антидот и протектор при отравлениях продуктами горения органических соединений, прежде всего – оксидом углерода [3]. Вместе с тем, фармакологический профиль этого металлокомплекса продолжает интенсивно изучаться, что диктуется расширением спектра его применения, например, в качестве донатора цинка в терапии цинк-дефицитных состояний различной этиологии [1, 4, 5]. Есть данные о способности ацизола нормализовать в организме человека содержание кальция, железа и кобальта [6]. В то же время, данных о влиянии ацизола на содержание микроэлементов в тканях организма в доступной нам литературе не обнаружено. Наши исследования в определённой мере восполняют этот пробел. Ранее [7] нами были опубликованы данные о влиянии ацизола на содержание цинка в отделах головного мозга крыс. В данной работе изучается влияние ацизола на содержание не только цинка, но и других биоэлементов в плазме крови, паренхиматозных органах и в целом головном мозге крыс при его однократном и многократном внутривенном введении.

МЕТОДИКА

Опыты проведены на 25 белых крысах-самцах линии Вистар массой 250 г. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых для научных целей. В плазме крови, ткани паренхиматозных органов (печени и поджелудочной железы) и в головном мозге крыс исследовали содержание биоэлементов. Животным контрольной группы (7 крыс) внутривенно однократно вводили 0,1 мл стерильного апиrogenного физиологического раствора. Животным трёх экспериментальных групп (по 6 крыс в каждой) производили внутривенные инъекции 6 мг (24 мг/кг) ацизола – 0,1 мл официального ампулированного раствора диацетат бис (1винилмидазола-N) цинка. В 1-й экспериментальной группе ацизол вводили однократно, во 2-й – 7 раз в течение 15-16 дней с промежутком в 1-2 дня. На 20-й мин (во 2-й группе – после 7-й инъекции) под лёгким нембуталовым наркозом производили забор крови из хвостовой вены. После 10 мин центрифугирования в центрифуге СМ-6М (“ЭЛМИ”, Латвия) при 2000 об/мин, отбиралась плазма крови. На 40-й мин на фоне глубокого наркоза нембуталом животных забивали путём декапитации. Пробы печени, поджелудочной железы, головного мозга взвешивали и промывали бидистиллированной водой. В 3-й группе, также с многократным введением ацизола, забор биоматериала производили на следующий день (через 15 ч) после его последней инъекции.

* - адресат для переписки

Для анализа брали навеску каждого биоматериала равную 0,1 г, помещали во фторопластовый вкладыш и добавляли 5 мл концентрированной азотной кислоты. Процесс разложения проводили с использованием микроволновой системы MARS 5 фирмы “СЕМ Corporation” (США) [8]. Автоклав с пробой во вкладыше помещали в микроволновую печь и разлагали пробу, используя программу разложения: подъем температуры до 200°C в течение 5 мин, выдерживание в течение 5 мин при 200°C, охлаждение до 45°C. Растворенную пробу количественно переносили в пробирку, разбавляя пробу в 1000 раз в растворе 2% азотной кислоты. Для определения концентрации биоэлементов использовали метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, позволяющий одновременно определять большое количество элементов в пробе. Измерения проводили на приборе ICP-MS X Series (“Thermo Elemental”, США).

Из 30 оцениваемых химических элементов статистическому анализу подвергли данные по тем биоэлементам, которые в наибольшей степени связаны с эффектами донатора цинка: сам цинк, селен, кальций, медь, железо. При статистическом анализе рассчитывали средние арифметические значения по каждой группе животных, стандартные ошибки и стандартные отклонения. Данные оценивали с использованием непараметрических методов статистики (по Манну-Уитни, Уилкоксоу, Фридману, дисперсионный анализ Фишера). По t-критерию Стьюдента значимость различий считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основным биоэлементом, в содержании которого следовало ожидать изменений, был естественно цинк (рис. 1). В плазме крови животных контрольной группы содержание цинка определялось на уровне

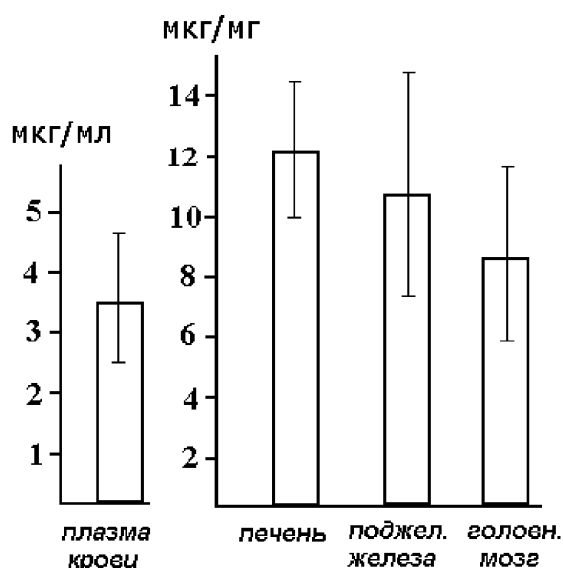


Рисунок 1. Содержание цинка (средние значения по группе контрольных животных) в плазме крови, печени, поджелудочной железе и в головном мозге крыс.

3,6±1,4 мкг/мл, в паренхиматозных органах уровень был выше: в печени – 12,5±2,5 мкг/мг сырой ткани, в поджелудочной железе – 10,9±4,1 мкг/мг. В головном мозге – 8,7±3,0 мкг/мг.

Однократное введение ацизола не влияло на содержание цинка в плазме крови, а в исследуемых тканях органов наблюдалась тенденция к понижению его содержания (рис. 2) Особенно заметным такое понижение было в головном мозге – до 5,5±0,8 мкг/мг, $p=0,05$. В отличие от однократной инъекции ацизола, его курсовое введение в течение двух недель привело к повышению содержания цинка как в плазме крови (более чем в три раза), так и в ткани органов. Но наиболее существенным повышением цинка оказалось у крыс 3-й экспериментальной группы – в пробах, взятых не сразу после последней седьмой инъекции, а через 15 ч после неё (рис. 2). В плазме крови у этих животных зарегистрировано шестикратное повышение содержания цинка – до 22,5±1,9 мкг/мл, $p=0,05$; в ткани исследованных органов цинк повышался в 2-3 раза (в печени – до 36,3±1,3 мкг/мг, в поджелудочной железе – до 23,4±0,8 мкг/мг, в головном мозге – 17,7±0,3 мкг/мг) и тоже статистически достоверно.

Более сложная динамика изменений зарегистрирована у других биоэлементов, в том числе в той или иной мере связанных с обменом цинка. Следует заметить, что анализ и статистическая обработка полученных данных затруднялись высокой вариативностью содержания биоэлементов, а иногда и их низкой концентрацией в пробах. Тем не менее, определенные тенденции в динамике биоэлементов обнаруживаются. Наиболее чётко менялось содержание селена в плазме и паренхиматозных органах: однократное введение ацизола вызывало снижение этого биоэлемента, многократное – повышение: содержание селена в печени возрастало с 0,62±0,2 до 1,02±0,3 мкг/мг; в поджелудочной железе – с 0,49±0,2 до 1,0±0,4 мкг/мг. Через 15 ч – содержание селена возвращалось к исходному уровню. В головном мозге изменения были не столь чёткими. Таким образом, динамика содержания селена (кроме третьей группы животных) была сходна с таковой у цинка.

Определённое сходство с цинком наблюдалось и у кальция. Зарегистрировано снижение содержания кальция в плазме крови (регистрировался общий кальций) после однократного введения ацизола (с 94,9±66,7 мкг/мг до 51,3±37,3 мкг/мг) и его повышение после курсового введения (до 149,5±104,6 мкг/мг). Аналогичная тенденция была обнаружена и в поджелудочной железе: 52,8±56,8 мкг/мг в контроле, 9,9±6,8 мкг/мг после однократного введения и 59,3±55,2 мкг/мг после многократного введения ацизола. Уровень кальция сохранялся высоким в тканях исследованных органов и через 15 ч после последней инъекции ацизола, в то время как в плазме крови его содержание нормализовалось. Своеобразная двухфазность изменения содержания зарегистрирована и для меди. В поджелудочной железе: после однократного введения ацизола содержание меди снижалась

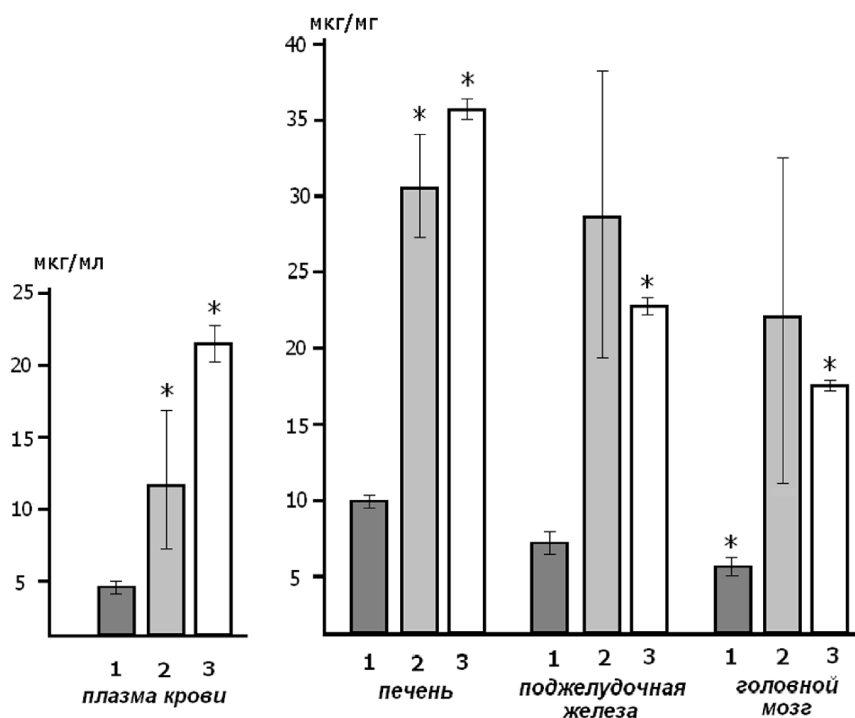


Рисунок 2. Изменение содержания цинка (средние значения по группе животных) в плазме крови, печени, поджелудочной железе и в головном мозге крыс - после однократного введения 24 мкг/кг ацизола (1), непосредственно после последней инъекции многократного двухнедельного цикла введений ацизола (2) и через 15 ч после последней инъекции многократных введений (3). * - достоверность отличий по сравнению с контрольной группой ($p=0,05$).

в два раза (с $0,96 \pm 0,12$ мкг/мг до $0,5 \pm 0,09$ мкг/мг), а после курсового – в той же мере повышалось ($1,95 \pm 0,43$ мкг/мг) и оставалось повышенным через 15 ч после последней инъекции.

Существенный прирост концентрации железа зарегистрирован в тканях всех исследованных органов через 15 ч после последней из семи инъекций ацизола. Напротив, в плазме крови содержание железа повышалось сразу после последней инъекции – до $51,69 \pm 20,00$ мкг/мг, а через 15 ч после неё снижалось до $21,6 \pm 0,41$ мкг/мг, причём вариативность внутри группы была минимальной. Следует напомнить, что именно в этот период содержание цинка в плазме крови данной группы животных достигало максимальных значений. Изменение содержания биоэлементов в плазме крови и в тканях органов в ряде случаев совпадало (селен и, отчасти медь), но, как в случае с железом, наблюдалась и обратная корреляция. Показательно, что изменения содержания в исследованных тканях других металлов (например, натрия и калия) были незначительны и колебались в пределах 10-15% от уровня показателей контрольной группы животных, получавших инъекции физиологического раствора.

И всё же главным объектом исследования в данной работе был цинк. Как известно, этот биоэлемент не имеет неактивной формы хранения и его избыток не может депонироваться, но может пополняться его подвижный пул в плазме крови в виде металлопротеинов, а в тканях – в форме металлотионеинов [9, 10].

Цинк активно переходит из плазмы в ткани органов, его проведение через плазматические мембраны осуществляется посредством нескольких семейств транспортеров, трансмембранных белков, от состояния которых во многом зависит содержание цинка в тканях. Семейства мембранных транспортеров цинка, сенсоров и металл-связывающих белков тионеинов (металлотионеинов) являются основными регуляторами цинка на клеточном и молекулярном уровне [11, 12]. Транспорт цинка у эукариот опосредован семейством трансмембранных белков ZIP (Zinc-Iron related transporter Proteins). ZIP белки расположены в плазматической мембране и образуют канал из восьми трансмембранных доменов. Эти каналы участвуют в регуляции внутриклеточного уровня цинка. Отток цинка через плазматическую мембрану обеспечивают специальные цинковые транспортеры, когда уровень внутриклеточного цинка превышен или когда цинк должен транспортироваться из клетки [13, 14].

В ранее проведенных исследованиях были получены данные о распределении наночастиц цинка с использованием технологии меченых атомов в организме крыс [15]. Максимально цинк обнаруживался в печени и почках через 24-72 ч после его введения в желудок через зонд. Минимальным оказался его прирост в головном мозге (поджелудочная железа занимала по этому показателю промежуточное положение), но в паренхиматозных органах уровень цинка прогрессивно снижался и только в головном мозге он оставался повышенным

и на 5-6 сутки после введения. Полученные данные подтверждают способность введённого цинка проникать через гематоэнцефалический барьер.

Роль цинка в деятельности ЦНС шире, чем обеспечение активности металлоферментов и связанных с этим биохимических процессов. Нейроны мозга способны активно захватывать цинк и везикулировать его. Некоторые нейрональные пулы (глутамат-, глицин-, пептид-ергические) потенциалзависимо выделяют цинк в синаптическую щель подобно медиатору [16, 17]. Нами продемонстрирована эффективность цинка в отношении двигательного поведения крыс, как при его системном введении с водой [18], так и при микроинъекции непосредственно в подкорковые узлы мозга [19, 20].

Известно, что из функциональных антагонистов цинка главными являются медь, кадмий и свинец. К дефициту цинка может приводить и избыток кальция. Конкурентные отношения цинка с другими биоэлементами могли проявиться не только в печени и поджелудочной железе, но и в почках, так как экспериментально была доказана способность ацизола влиять на почечную обработку ионов [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Результаты наших экспериментов выявили определённую закономерность в биокинетике цинка и некоторых, связанных с ним биоэлементов (селена, кальция, меди, железа) в плазме крови, паренхиматозных органах и головном мозге крыс. Их содержание после однократного введения донатора цинка ацизола не меняется или даже снижается, а когда при курсовом введении нивелируется фактор первых введений, их содержание возрастает. Цинк в наибольшей степени повышался через 15 ч после последней из семи инъекции ацизола.

Ацизол разработан для нужд медицины критических состояний, но всё активнее применяется там, где требуется коррекция ионного гомеостаза. Последнее время он стал использоваться как общеукрепляющий и ноотропный препарат, например, в сфере высоких спортивных достижений, для потенцирования адаптивных свойств организма при психоэмоциональных и физических нагрузках [22, 23]. Расширяющееся практическое применение этого донатора цинка требует тщательного изучения его влияния на ионный состав организма. В этих случаях особенно необходимо учитывать выявленную нами динамику, фазность в показателях цинка и других биоэлементов, сопровождающих разный режим и стадии длительного введения ацизола. Полученные результаты следует рассматривать как один из первых этапов исследований. Их расширение и детализация, позволит получить более чёткие биохимические и физиологические обоснования к использованию ацизола в практической сфере.

ЛИТЕРАТУРА

1. Скальная М.Г. (2013) Микроэлементы в медицине, **14**, 18-24.
2. Шантырь И.И., Яковлева М.В., Власенко М.А. (2015) Профил. клин. мед., **57**, 12-16.
3. Баринов В.А., Алексанин С.С., Радионов И.А., Шантырь И.И. (2011) Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях, **5**, 14-19.
4. Бабаниязова З.Х., Бабаниязов Х.Х., Радионов И.А., Скальный А.В., Бобр И.С. (2010) Микроэлементы в медицине, **11**, 25-30.
5. Prasad A.S. (2014) Микроэлементы в медицине, **15**, 3-12.
6. Лебедева С.А., Бабаниязова З.Х., Бабаниязов Х.Х., Радионов И.А. (2011) Вестник ОГУ, **134**, 78-81.
7. Якимовский А.Ф., Шантырь И.И., Власенко М.А., Яковлева М.В. (2016) Бюлл. эксперим. биол. мед., **162**, 268-270.
8. Подунова Л.Г., Скачков В.Б., Скальный А.В., Демидов В.А., Скальная М.Г., Серебрянский Е.П., Грабеклис А.Р., Кузнецов В.В., Тимофеев П.В. (2003) Методика определения микроэлементов в диагностируемых биосубстратах методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Методические рекомендации. ФЦГСЭН МЗ РФ. М.
9. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А.В. (2008) Биологическая роль макро-и микроэлементов у человека и животных, Наука, СПб., 544 с.
10. Vasak M. (2005) J. Trace. Elem. Med. Biol., **19**, 13-17.
11. Maret W., Krezel A. (2007) Mol. Med., **13**, 371-375.
12. Cousins R. (2011) in: 14th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals. China, September 19-24, p. 46.
13. Gaither L.A., Eide D.J. (2001) Biometals, **14**, 251-270.
14. Ackland M.L., Michalczyk A.A., Kumarl L. (2011) in: 14th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals. China, September 19-24, p. 48.
15. Котенко К.В., Беляев И.К., Бузулуков Ю.П., Бушманов А.Ю., Демин В.Ф., Жорова Е.С., Калистратова В.С., Марченков Н.С., Нисимов П.Г., Распопов Р.В., Соловьев В.Ю. (2011) Медицинская радиология и радиационная безопасность, **56**, 5-10
16. Frederickson Ch.J., Suh S.W., Silva D., Frederickson C.J. (2000) J. Nutrition, **130**, 1471-1483.
17. Smart T.G., Hosie A.M., Miller P.S. (2004) Neuroscientist, **10**, 432-442.
18. Якимовский А.Ф. (2014) Микроэлементы в медицине, **15**, 27-32.
19. Якимовский А.Ф., Крыжановская С.Ю. (2015) Мед. акад. журн., **15**, 50-54.
20. Якимовский А.Ф., Крыжановская С.Ю. (2015) Бюлл. эксперим. биол. мед., **160**, 252-254.
21. Брин В.В., Кокаев Р.И., Бабаниязов Х.Х., Пронина Н.В. (2008) Вестник новых медицинских технологий, **15**, 213-216.
22. Фесенко А.Г. (2011) Вестник ОГУ, **134**, 144-149.
23. Скальный А.В., Фесюн А.Д., Ивакиев И.И., Грабеклис С.А., Скальный А.А. (2011) Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, **9**, 47-55.

Поступила: 09. 19. 2017.
Принята к печати: 01. 03. 2018.

**THE INFLUENCE OF ACIZOLUM TO BIOELEMENTS CONTENT
IN RAT'S BLOOD PLASMA, PARENCHIMAL ORGANS AND BRAIN**

A.F. Yakimovskii^{1,3}, I.I. Shantyr², M.A. Vlasenko², M.V. Yakovleva², S.Yu. Kryzanovskaia¹

¹Pavlov First St.-Petersburg State Medical University,

6/8 L. Tolstoy str., St.-Petersburg, 197022 Russia; e-mail: jakim2010@gmail.com

²Nikiforov Research Center of Emergency and Radiation medicine, St.-Petersburg, Russia

³Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Science, St.-Petersburg, Russia

Zinc content in blood plasma and brain tissue of rats was studied by analytic mass-spectrometry with inductively coupled plasma. In control (saline-treated animal) zinc content in plasma was 3.6 ± 1.4 $\mu\text{g/ml}$, in the liver – 12.5 ± 2.5 $\mu\text{g/mg}$, in the spleen – 10.9 ± 4.1 $\mu\text{g/mg}$, in the brain – 8.7 ± 3.0 $\mu\text{g/mg}$. After a single intraperitoneal injection of zinc donator acizolum (24 mg/kg) zinc content decreased in all examined tissues, especially in brain. After a course of sequential acizolum injections (seven administrations during two weeks) essential elevation of zinc content in blood plasma and tissues investigated was detected. The maximal increase zinc concentration in blood plasma and liver was detected in 15 h after the last acizolum injections. Selen, calcium, copper and iron contents demonstrated a more complex behaviour. The obtained data suggest that prolonged acizolum administration has a significant impact on the bioelements content, and this should be taken into consideration when this zinc donator is used as a drug.

Key words: acizolum, bioelements, blood plasma, liver, spleen, brain