

## ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У КРЫС ПРИ ГИПЕРМИКРОЭЛЕМЕНТОЗЕ МЕДИ

Харьковский национальный медицинский университет

Изучено содержание меди в гомогенатах почек, а также в субклеточных фракциях клеток почек 1-месячных крыс линии Вистар, которым ежедневно в течение месяца внутрижелудочно через зонд вводился раствор меди в питьевой воде в дозе, значительно превышающей физиологическую потребность. Показано, что происходит накопление меди в почках, отмечается существенное накопление меди в митохондриях и цитозоле клеток почек, что может стать причиной энергодифицита. Установлено, что увеличение содержания меди в митохондриях приводит к снижению активности митохондриальных ферментов, таких как пируватдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа и сукцинатдегидрогеназа. В ходе эксперимента выявлено снижение продукции АТФ, уменьшение экскреции мочевой кислоты у экспериментальных крыс, что может стать причиной развития дисметаболической нефропатии. Полученные результаты позволяют сделать вывод о нефротоксичности меди при введении ее в концентрациях, несколько превышающих суточную потребность.

**Ключевые слова:** крысы, медь, гипермикрозелементозы, ферменты митохондрий, АТФ.

Результаты были получены в ходе исследований, проведенных по научно-технической теме МЗ Украины «Біохімічні механізми розвитку дисметаболических процесів за умов впливу хімічних чинників навколишнього середовища», № гос. регистрации 0115U000240, 2015 г.

**Введение.** За последнее время в нашей стране значительно увеличилось число заболеваний почек, возникающих в результате длительного поступления в организм экотоксикантов (экодетерминированная нефропатия) [6].

Многие ксенобиотики, поступающие в организм с воздухом, водой, пищей выводятся почками, при этом возможно их повреждающее действие. Токсикантами, поражающими почки, нередко оказываются различные металлы. Одновалентные металлы почти полностью фильтруются в клубочках и активно реабсорбируются в канальцах, конкурируя с ионами  $K^+$  и  $Na^+$ . Двухвалентные металлы (медь, цинк, свинец и др.) связываются с сульфгидрильными группами специфических и неспецифических белков, выполняющих транспортную функцию.

Транспортные белки могут обусловить нефротоксичность металлов при их избыточном поступлении в организм, так как при этом образуется комплекс металл-протеин, который, являясь транспортной формой металла, способствует его фильтрации и повышенной абсорбции в почечной ткани [10]. В экспериментальных исследованиях установлено, что медь может депонироваться в матриксе лизосом в результате комплексообразования с анионными группами и конкурировать с ионами кальция и магния за связывание с активными центрами протонной помпы [9]. Ионы меди, попадая в клетку в избыточном количестве, приводят к различным структурно-функциональным нарушениям [5]. Главные причины этих изменений – инактивация ферментов вследствие комплексообразования ионов меди с группами белков, индукции гидроксильных радикалов и супероксидного аниона, активации перекисного окисления липидов [12]. Высокая токсичность ионов меди, с одной стороны, и их роль в ряде метаболических процессов – с другой придают важное теоретическое и практическое значение исследованию механизмов их действия на биологические системы [2]. Актуальность этот вопрос приобретает также в связи с установленным экологической инспекцией фактом наличия повышенной концентрации меди в поверхностных водах и в питьевой воде многих регионов Украины. Кроме того, ятрогенные формы гиперэлементоза меди могут возникать в результате присутствия этого элемента в различных протезах, при применении противозачаточных средств, а также при гемодиализе в результате контаминации соединениями меди [5].

**Целью** данной работы явилось изучение распределения меди и ее влияния на энергетические процессы в клетках почек крыс при избыточном поступлении меди в организм.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 40 крысах-самцах линии Вистар 1-месячного возраста. Содержание животных и эксперименты проводились согласно положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страссбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», утвержденных Пятым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013).

Животные были разделены на следующие группы:

1) интактные животные, которым ежедневно в течение 1 месяца внутривенно через зонд вводили 1 мл дистиллированной воды (контрольная группа, 20 крыс);

2) животные, которым ежедневно внутривенно через зонд вводили водный раствор хлорида меди (II) (с содержанием меди 1,75 мг/л из расчета 1 мл на 100 г веса животного, 20 крыс).

Через 1 месяц животных вывели из эксперимента путем декапитации под легким тиопенталовым наркозом. Почки выделяли, отмывали от крови и хранили в морозильной камере (-80°C). В исследованиях использовали 10% гомогенат почечной ткани в трис-HCl. Концентрацию меди в сыворотке крови и в гомогенатах тканей определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Сатурн-3М» [3]. Субклеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования. Активность пируватдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы в митохондриях и содержание АТФ в гомогенатах тканей определяли по методам, описанным Ещенко Н. Д. [7, 8]. Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программ «Statistica v. 6.1.478» и «Origin 6.0», используя критерий Стьюдента-Фишера и Манна-Уитни [1]. Достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.**

Повышение содержания меди может привести к амплификации тионеиновых генов и резкому повышению синтеза данного белка [4]. Медь, первоначально связанная металлотioneином, в дальнейшем включается в церулоплазмин, другие медьсодержащие ферменты и компоненты желчи. Механизмы транспорта меди дают основание предполагать возможность ее накопления в организме. Учитывая, что 80% меди выводится желчью, 16% – стенками ЖКТ, около 4% – почками, можно предположить, что избыточное количество меди приводит к нарушению метаболизма в печени и почках. По данным Скального А. В. и соавторов, избыточное поступление меди в организм приводит к нарушению метаболических процессов в печени и почках [11]. Для выяснения механизмов повреждения почек необходимо изучить распределение меди в субклеточных фракциях клеток почек крыс.

Проведенные эксперименты показали, что у животных контрольной группы, получавших в суточном рационе медь в дозе, соответствующей физиологической потребности, медь распределяется в субклеточных фракциях клеток почек практически равномерно. У животных, получавших избыточное количество меди в суточном рационе, содержание меди в гомогенатах

Таблица 1

**Содержание меди в субклеточных фракциях клеток почек крыс**

Группы крыс	Субклеточные фракции	Содержание меди (мг/г белка)
Контроль n = 20	ядра	0,038 ± 0,012
	цитозоль	0,153 ± 0,007
	микросомы	0,091 ± 0,005
	митохондрии	0,201 ± 0,013
опыт	ядра	0,044 ± 0,002
	цитозоль	0,377 ± 0,015*
	микросомы	0,098 ± 0,005*
	митохондрии	0,368 ± 0,011*

почек существенно выше, чем у крыс контрольной группы (табл. 1). В почках наибольшее количество меди связывается в цитозоле. Отмечается значительный рост концентрации меди и в митохондриях, менее выраженные изменения — в микросомах. По всей видимости, введение избыточного количества меди сопровождается увеличением содержания медьсвязывающих белков в цитозоле клеток почек, что увеличивает депонирование ионов меди. Вероятно, в цитозоле клеток почек количество медьсвязывающего белка все же недостаточно, поэтому активируется также и транспорт меди в клеточные органеллы — митохондрии и микросомы. Высокие концентрации меди могут ингибировать митохондриальные ферментные комплексы, в частности, путем неспецифического связывания с белками. Это, в свою очередь, приводит к нарушениям важнейших процессов клеточного метаболизма. В литературе имеются сведения о том, что накопление меди в тканях приводит к фрагментации митохондрий, развитию энергодифицитного состояния [4]. Эти результаты получены при введении больших концентраций меди. В наших исследованиях применялись небольшие дозы металла, однако, накопление меди в митохондриях значительно. Можно ожидать, что присутствие меди вызовет активацию перекисного окисления липидов, дестабилизацию мембран, и, как следствие, снижение дыхательного контроля, развития энергодифицита.

Изучение активности митохондриальных ферментов показало, что при длительной интоксикации хлоридом меди активность пируватдегидрогеназы,

Таблица 2

**Активность митохондриальных ферментов и содержание АТФ в гомогенатах почечной ткани у экспериментальных животных**

Группы животных	Пируватдегидрогеназа миллимоль НАДН2 мин × г белка	Изоцитратдегидрогеназа мкмоль НАДН2 мин × г белка	Сукцинатдегидрогеназа, мкмоль/ мин × г бел.	АТФ, мкмоль/г ткани
Контрольная группа	20,74 ± 2,02	13,83 ± 1,22	5,48 ± 0,23	2,38 ± 0,17
Введение раствора хлорида меди	10,00 ± 0,93 p < 0,001	9,08 ± 0,53 p < 0,001	4,11 ± 0,22 p < 0,01	1,90 ± 0,12 p < 0,02

изоцитратдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы снижается (**табл. 2**).

Установленные нами нарушения активности митохондриальных ферментов могут стать причиной низкоэнергетического сдвига в почечной ткани. В ходе эксперимента выявлено снижение продукции АТФ в почечной ткани (**табл. 2**). Учитывая, что процессы транспорта веществ, секреции и реабсорбции в почечной ткани энергозависимы, можно предположить, что дефицит АТФ приведет к нарушению протекания метаболических процессов в почках. В частности, обнаружено снижение экскреции мочевой кислоты ( $1,54 \pm 0,10$  ммоль/сутки против контроля  $2,26 \pm 0,11$  ммоль/сутки) у экспериментальных животных, что связано со снижением ее секреции и является фактором развития дисметаболической нефропатии.

Полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Длительное введение меди в дозах, несколько превышающих суточную потребность, приводит к накоплению ионов металла в почках, значительное

накопление отмечается в митохондриях и цитозоле клеток почек.

2. Увеличение содержания меди в митохондриях приводит к снижению активности митохондриальных ферментов и, вследствие этого, к снижению продукции АТФ, что свидетельствует о нефротоксичности металла.

3. Наиболее чувствительным ферментом к действию повышенных концентраций меди является пируватдегидрогеназа.

#### **Перспективы дальнейших исследований.**

Проведенные исследования показали, что при гипермикрэлементозе меди у 1-месячных крыс происходит накопление этого металла в субклеточных фракциях клеток почек, что приводит к развитию нефропатии. На наш взгляд интересным представлялось изучение особенностей функционального состояния почек при гипермикрэлементозе меди в возрастном аспекте. В дальнейшем мы планируем провести эти исследования и исследование морфофункционального состояния печени.

### **Список литературы**

1. Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології: підручник для студ. вищ. навч. закл. / Л. О. Атраментова, О. М. Утевська. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. – 288 с.
2. Башкірова Л. Біологічна роль деяких есенційних макро- та мікроелементів / Л. Башкірова, А. Руденко // Буковинський медичний вісник. – 2004. – № 10. – С. 59-65.
3. Брицке М. Э. Атомно-абсорбционный спектрохимический анализ / М. Э. Брицке. – Москва, 1982. – 280 с.
4. Бурдин К. С. Металлотионеины, их строение и функции / К. С. Бурдин, Е. Е. Полякова // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 103, № 3. – С. 390 – 400.
5. Гнатейко О. З. Екогенетичні аспекти патології людини, спричиненої впливом шкідливих факторів зовнішнього середовища / О. З. Гнатейко, Н. С. Лук'яненко // Здоров'я ребенка. – 2007. – № 6 (9). – С. 82 – 87.
6. Головачева В. А. Экзогенные факторы развития нефропатий у детей В. А. Головачева, Ю. В. Одинец // Одеський медичний журнал. – 2009. – № 4 (114). – С. 29 – 33.
7. Ещенко Н. Д. Определение содержания АТФ в тканях // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – С. 210-212.
8. Ещенко Н. Д. Определение активности сукцинатдегидрогеназы // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – С. 256-258.
9. Кудрин А. В. Иммунофармакология микроэлементов / А. В. Кудрин. – М. : Изд-во КМК, 2000. – С. 455-460.
10. Одинец Ю. В. Фактори зовнішнього середовища та нирки у дітей / Ю. В. Одинец, В. О. Головачева, Т. В. Горбач // Український журнал нефрології та діалізу (додаток 1). – 2012. – № 3 (35). – С. 67-70.
11. Скальный А. В. Микроэлементозы человека (диагностика и лечение): Практическое руководство для врачей / А. В. Скальный. – М., 1997. – С. 8-38.
12. Ткаченко Г. М. Стан прооксидантної та антиоксидантної системи крові дітей, що проживають в екологічно несприятливому регіоні / Г. М. Ткаченко, Н. М. Скалецька // Довкілля та здоров'я. – 2009. – № 3. – С. 23 – 26.

УДК 577. 121. 7:54. 084:577. 118:546. 56

#### **ОСОБЛИВОСТІ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ У ЩУРІВ ПРИ ГІПЕРМІКРОЕЛЕМЕНТОЗІ МІДІ**

**Горбач Т. В., Мартинова С. М., Ткаченко А. С., Резуненко Ю. К., Ткаченко М. О.**

**Резюме.** Вивчено вміст міді в нирках, а також в субклітинних фракціях клітин нирок 1-місячних щурів лінії Вістар, яким щодня протягом місяця внутрішньошлунково через зонд вводили розчин міді в питній воді в дозі, яка незначно перевищує фізіологічну потребу. Показано, що відбувається накопичення міді в нирках, відзначається істотне накопичення міді в митохондріях і цитозолі клітин нирок, що може стати причиною енергодефіциту. Збільшення вмісту міді в митохондріях призводить до зниження активності митохондриальних ферментів, таких як піруватдегідрогеназа, ізоцитратдегідрогенази і сукцинатдегідрогеназа. У ході експерименту виявлено зниження продукції АТФ, а також екскреції сечової кислоти в експериментальних тварин, що пов'язано зі зниженням її секреції і може стати чинником розвитку дисметаболическої нефропатії. Отримані результати дозволяють зробити підсумки про нефротоксичність міді при введенні її у концентрації, яка незначно перевищує добову потребу.

**Ключові слова:** щури, мідь, гіпермікроелементози, ферменти митохондрий, АТФ.

UDC 577. 121. 7:54. 084:577. 118:546. 56

### **The State of Energy Metabolism in Rats with Copper Hyperementosis**

**Gorbach T. V., Martynova S. M., Tkachenko A. S., Rezenenko Yu. C., Tkachenko M. O.**

**Abstract.** The number of kidney disease resulting from prolonged intake of toxic compounds has increased significantly in recent years in our country (ecodetermined nephropathy). The problem of water pollution with ecotoxins, which are essential elements, is not fully considered. The long-term toxicity of metals, are not considered properly. One such metal is copper, which is available in high amounts in surface waters in many regions of Ukraine. The experimental studies have shown that copper can be deposited in the matrix of lysosomes forming complexes with anionic groups and competing with the calcium and magnesium ions for binding to the active sites of proton pump. Copper ions, entering the cell in an excess amounts, lead to various structural and functional impairments. The high toxicity of copper ions on the one hand, and their role in several metabolic processes on the other hand provide significal theoretical and practical importance study the mechanisms of their action on the biological systems. In this regard, the aim of our study was to investigate the distribution of copper and its effect on energetic processes in the cells of the kidneys of rats in case of high copper intake. Experiments were carried out on 40 male Wistar rats. Animals were divided into the following groups:

- 1) Intact animals who daily received intragastrically 1 ml of distilled water (control group, 20 rats);
- 2) animals that daily received intragastrically an aqueous solution of copper chloride (II) (a copper content as 1.75 mg / L; 1 ml per 100 g of body weight, 20 rats).

After 1 month of the experiment the animals were decapitated.

Kidneys were isolated, washed from blood and stored in a freezer (-80°C). The 10% renal tissue homogenate in Tris-HCl was used. The concentration of copper in serum and tissue homogenates was determined by atomic absorption spectrophotometer "Saturn-3M" (3). Subcellular fractions were isolated by differential centrifugation. The activity of pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase in mitochondria, and ATP content in tissue homogenates were determined by the methods described by Eshchenko ND (7.8). The results obtained were statistically processed using the software package «Statistica v. 6.1.478 »and« Origin 6.0 », using Student's t test, Fisher and Mann-Whitney tests (1). Results were considered accurate at  $p < 0.05$ . The content of copper in kidney homogenates and in subcellular fractions of kidney cells of rats from the second group was slightly higher than the physiological need. It was shown that the copper is accumulated in the kidney. There is a significant accumulation of copper in mitochondria and cytosol of renal cells, which can lead to energy deficiency. It was found that the elevated copper content in mitochondria lead to reduced activity of mitochondrial enzymes such as pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. During the experiment, shown it was that ATP production, was reduced the excretion of uric acid in experimental rats decreased could, which cause the development of dismetabolic nephropathy. The results allow concluding that the copper intake has nephrotoxic effects.

**Keywords:** rats, copper, hypermicroelementosis, mitochondrial enzymes, ATP.

Стаття надійшла 25.11.2015 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування