

Для корреспонденции

Шумакова Антонина Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»
Адрес: 109240, Российская Федерация, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14
Телефон: (495) 698-53-68
E-mail: antonina_sh@list.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1373-4436>

Шумакова А.А.¹, Апрытин С.А.¹, Шипелин В.А.¹, Ефимова Е.В.², Фесенко З.С.²,
Гмошинский И.В.¹

Влияние нокаута гена *DAT* на обмен эссенциальных и токсичных микроэлементов у крыс

Influence of the *DAT* gene knockout on exchange of essential and toxic trace elements in rats

Shumakova A.A.¹, Apryatin S.A.¹, Shipelin V.A.¹, Efimova E.V.², Fesenko Z.S.², Gmshinski I.V.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, 109240, г. Москва, Российская Федерация

² Институт трансляционной биомедицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

¹ Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 109240, Moscow, Russian Federation

² Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, 199034, St. Petersburg, Russian Federation

*Поддержание энергетического гомеостаза организма, по современным данным, осуществляется при активном участии дофаминергических нейронов центральной нервной системы (ЦНС). Синтез и обмен дофамина (ДА) происходит как в головном мозге, так и в периферических тканях. Нарушение синтеза и метаболизма ДА рассматривается в качестве звена порочного круга, формирующегося при развитии индуцированного диетой ожирения. По современным данным, ряд эссенциальных и токсичных микроэлементов, таких как Cd, Al, As, Mn, Fe, Cu, Zn, активно участвует в обмене ДА в мозге, периферических органах и тканях. Одним из способов оценить эту взаимосвязь является сравнение изменений в микроэлементном статусе организма при потреблении гиперкалорийных рационов животными с нормальным и нарушенным транспортом ДА. В роли последних могут выступать животные с нокаутом гена транспортера ДА (*DAT*), осуществляющего реабсорбцию ДА с последующим запасанием в составе секреторных гранул.*

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-16-01043).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов.

Для цитирования: Шумакова А.А., Апрытин С.А., Шипелин В.А., Ефимова Е.В., Фесенко З.С., Гмошинский И.В. Влияние нокаута гена *DAT* на обмен эссенциальных и токсичных микроэлементов у крыс // Вопросы питания. 2020. Т. 89, № 5. С. 17–27. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10062

Статья поступила в редакцию 30.04.2020. **Принята в печать** 20.09.2020.

Funding. The work was supported by the Russian Scientific Foundation (grant No. 17-16-01043).

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest.

For citation: Shumakova A.A., Apryatin S.A., Shipelin V.A., Efimova E.V., Fesenko Z.S., Gmshinski I.V. Influence of the *DAT* gene knockout on exchange of essential and toxic trace elements in rats. Voprosy pitaniia [Problems of Nutrition]. 2020; 89 (5): 17–27. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10062 (in Russian)

Received 30.04.2020. **Accepted** 20.09.2020.

Цель работы – исследование в сравнительном аспекте содержания ряда эссенциальных и токсичных элементов в головном мозге, печени и почках крыс, различающихся по аллельным вариантам гена *DAT*, в условиях потребления сбалансированного и имеющего избыточную удельную энергетическую ценность рациона.

Материал и методы. Исследования проводили на 30 самцах крыс нокаутной линии *DAT-KO* (гомозиготы *DAT*^{-/-} и гетерозиготы *DAT*^{+/-}) возрастом 8–10 нед и 13 самцах крыс аутбредной линии Вистар (*DAT*^{+/+}) того же возраста. Животные были разделены на 6 групп и получали на протяжении 62 дней полусинтетический рацион, содержащий эссенциальные элементы в составе солевой смеси, или высокожировой высокоуглеводный рацион (ВУВЖР) с 30% содержанием жира и 20% раствором фруктозы вместо питьевой воды. Содержание 16 микроэлементов (Fe, Mg, Cu, Mn, Co, Se, Zn, Cr, V, Cs, Ag, Al, Cd, As, Pb, Ni) в печени, почках и головном мозге крыс с нокаутом гена транспортера дофамина *DAT*: гомозигот (*DAT*^{-/-}) и гетерозигот (*DAT*^{+/-}), а также крыс «дикого типа» (*DAT*^{+/+}) линии Вистар определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

Результаты и обсуждение. В печени нокаут *DAT* приводил к возрастанию содержания As, Cd, Co и Cs и снижению Fe; в почках – к повышению уровней Pb, As, Cd и Se, в головном мозге – к возрастанию содержания большинства изученных микроэлементов, включая Pb, As, Cs, Al и Cu.

Заключение. На фоне потребления ВУВЖР влияние нокаута *DAT* на содержание ряда элементов было более выражено по сравнению с потреблением контрольного рациона. Выявленные изменения содержания микроэлементов у нокаутных по *DAT* крыс рассматриваются в аспекте влияния обмена ДА в ЦНС и в периферических тканях на статус микроэлементов.

Ключевые слова: транспортер дофамина, нокаут, крысы, микроэлементы, печень, почки, головной мозг, ИСП-МС

The maintenance of energy homeostasis of the body according to modern data is carried out with the active participation of dopaminergic neurons of the central nervous system. The synthesis and metabolism of dopamine (DA) occurs both in the brain and in peripheral tissues. Violation of the synthesis and metabolism of DA is considered as a link in the vicious cycle which it formed during the development of diet-induced obesity. According to modern data, a number of essential and toxic trace elements, such as Cd, Al, As, Mn, Fe, Cu, Zn, are actively involved in the exchange of DA in the brain and peripheral organs and tissues. One way to assess this relationship is to compare changes in the microelement status of the organism when consuming hypercaloric diets in animals with normal and impaired DA transport. The latter can be animals with a knockout of the DAT transporter gene, which performs DA reabsorption with subsequent storage in the composition of secretory granules.

The aim is a comparative study of the content of a number of essential and toxic elements in the brain, liver, and kidneys of rats that differ in the allelic variants of the *DAT* gene fed balanced diet and the diet with an excess of energy value.

Material and methods. The study was carried out on 30 male rats of the *DAT-KO* knockout line (homozygotes *DAT*^{-/-} and heterozygotes *DAT*^{+/-}), 8–10 weeks old, and 13 males rats of the outbred Wistar line (*DAT*^{+/+}) of the same age. For 62 days the animals (6 groups) received a semi-synthetic diet containing essential elements in the salt mixture or a similar high-fat-high-carbohydrate diet (HFCD) with 30% fat and 20% fructose solution instead of drinking water. The content of 16 trace elements (Fe, Mg, Cu, Mn, Co, Se, Zn, Cr, V, Cs, Ag, Al, Cd, As, Pb, Ni) were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry in the liver, kidneys, and brain of rats with a knockout of the dopamine *DAT* transporter gene: homozygotes (*DAT*^{-/-}) and heterozygotes (*DAT*^{+/-}), as well as wild-type rats (*DAT*^{+/+}) of the Wistar strain.

Results and discussion. In the liver, *DAT* knockout led to an increase in the content of As, Cd, Co, and Cs and a decrease in Fe; in the kidneys – to an increase in the levels of Pb, As, Cd and Se, in the brain – an increase in the content of most of the studied trace elements, including Pb, As, Cs, Al and Cu.

Conclusion. Against the background of consumption of HFCD, the effect of *DAT* knockout on the content of a number of elements was more pronounced compared with the consumption of the control diet. The revealed changes in the trace element content in *DAT* knockout rats are considered in terms of the effect of DA metabolism in the central nervous system and in peripheral tissues on the status of trace elements.

Keywords: dopamine transporter, knockout, rats, trace elements, liver, kidney, brain, ICP-MS

Поддержание энергетического гомеостаза организма, по современным данным, осуществляется при активном участии дофаминергических нейронов центральной нервной системы (ЦНС) [1, 2]. Синтез и обмен дофамина (ДА) происходит как в головном мозге, так и в периферических тканях, однако для процессов нейрорендокринной регуляции энергетического обмена, чувства голода и насыщения, пищевого поведения значимо только образование и метаболизм ДА в головном мозге, поскольку этот биогенный амин сам по себе практически не проходит через гематоэнцефалический барьер. Нарушение синтеза и метаболизма ДА рассматривается в качестве звена порочного круга, формирующегося при развитии индуцированного диетой ожирения [3].

По современным данным, ряд эссенциальных и токсичных микроэлементов, таких как Cd [4], As [5], Cu, Zn

[6], Fe [6, 7], Al [8, 9], активно участвует в обмене ДА в мозге, в периферических органах и тканях. В связи с этим возникает вопрос о связи известных изменений в микроэлементном гомеостазе при ожирении [10] с функционированием дофаминергической системы ЦНС.

Одним из способов, позволяющих оценить эту взаимосвязь, является сравнение изменений в микроэлементном статусе организма при потреблении гиперкалорийных рационов животными с нормальным и нарушенным транспортом ДА. В роли последних могут выступать животные с нокаутом гена транспортера ДА (*DAT*), осуществляющего реабсорбцию ДА с последующим запасанием в составе секреторных гранул. У крыс и мышей с нокаутом гена *DAT* обратный захват ДА блокируется, следствием чего является возрастание его локальной концентрации в синаптической щели, что при-

водит к резкому повышению локомоторной активности [11] и к другим поведенческим особенностям [12]. Общее содержание ДА в головном мозге таких животных, напротив, снижено, а содержание его метаболитов: диоксифенилуксусной кислоты (DOPAC) и гомованилиновой кислоты (HVA) – увеличено [11] вследствие повышения их потребления клетками микроглии.

Цель работы – исследование в сравнительном аспекте содержания ряда эссенциальных и токсичных элементов в головном мозге, печени и почках крыс, различающихся по аллельным вариантам гена *DAT*, в условиях потребления сбалансированного и имеющего избыточную удельную энергетическую ценность рациона.

Материал и методы

Дизайн эксперимента. Исследования проводили на 30 самцах крыс (возраст 10–12 нед) нокаутной линии *DAT-KO* (гомозиготы *DAT*^{-/-} и гетерозиготы *DAT*^{+/-}), полу-

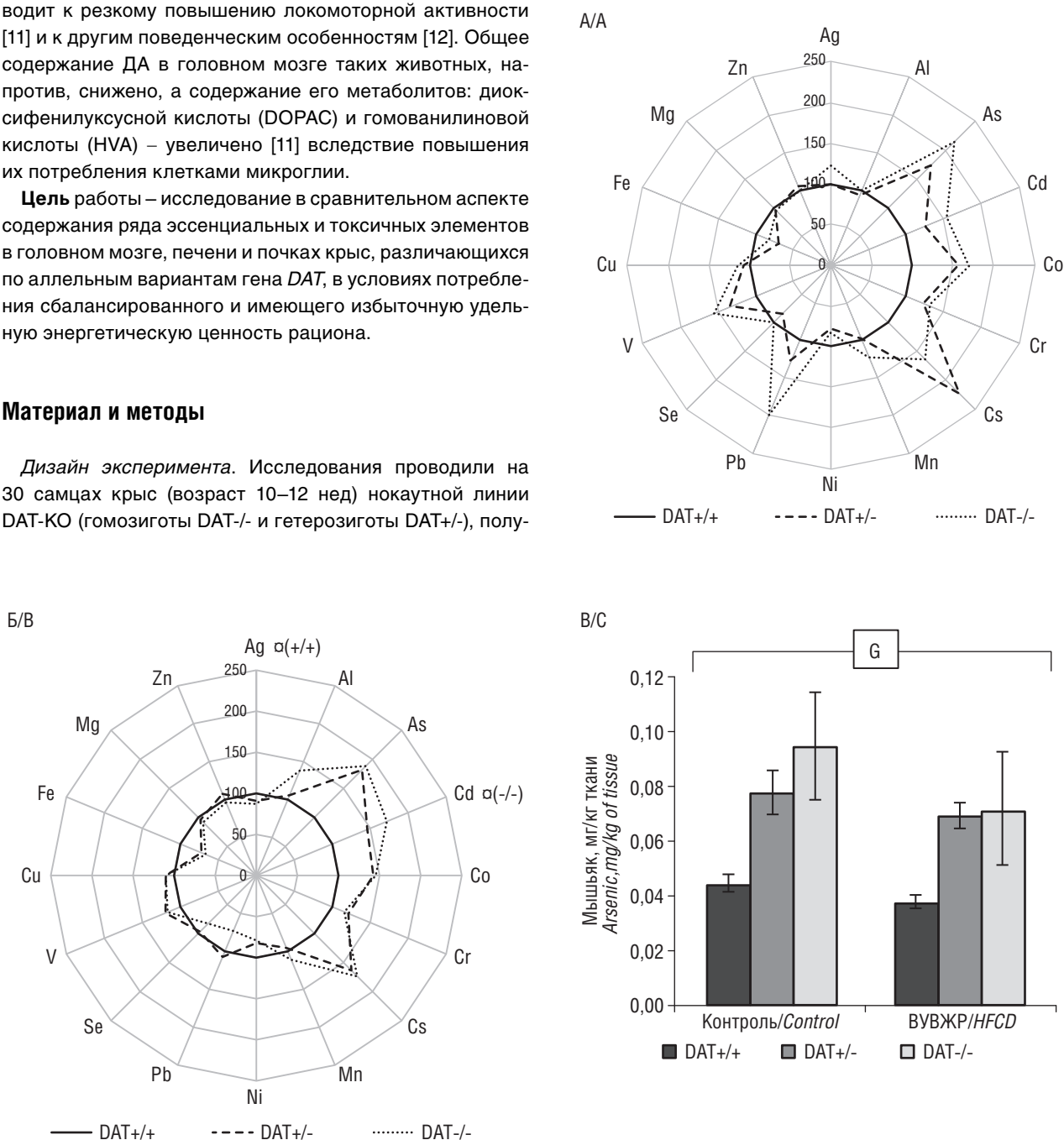


Рис. 1. (Начало) Содержание микроэлементов в печени крыс. Сравнение «микроэлементных портретов» ткани печени (лепестковые диаграммы) для животных с различными аллельными вариантами гена *DAT* (*DAT*^{+/+}, *DAT*^{+/-}, *DAT*^{-/-}), получавших сбалансированный рацион (А) и высокожировой высокоуглеводный рацион (ВУВЖР) (Б), % от величины для группы *DAT*^{+/+}. Среднее ($M \pm m$) содержание мышьяка в ткани печени крыс опытных групп (В)

* – статистически значимое различие с соответствующей по рациону группой *DAT*^{+/+} ($p < 0.05$, U-тест Манна–Уитни). Горизонтальные скобки – распределение показателя в группах неоднородно по факторам генотип (G) и рацион (D) и их комбинации для охватываемого диапазона ($p < 0.05$, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA); □ – изъято 1 значение в группе для указанного (в скобках) генотипа.

Fig. 1. (Part 1) The content of trace elements in rat liver. Comparison of «microelement portraits» of liver tissue (petal diagrams) for animals with different allelic variants of the *DAT* gene (*DAT*^{+/+}, *DAT*^{+/-}, *DAT*^{-/-}), receiving a balanced diet (A) and high-fat-high-carbohydrate diet (HFCD) (B), per cent value of *DAT*^{+/+} group. The average ($M \pm m$) content in the rat liver tissue of arsenic (C)

* – the difference with the corresponding diet group *DAT*^{+/+} is significant ($p < 0.05$, Mann–Whitney U-test). Horizontal brackets – the distribution of the indicator in groups is heterogeneous by genotype (G) and diet (D) factors and their combinations for the covered range ($p < 0.05$, ANOVA two-way analysis of variance); □ – 1 value in the group was removed for the indicated (in brackets) genotype.

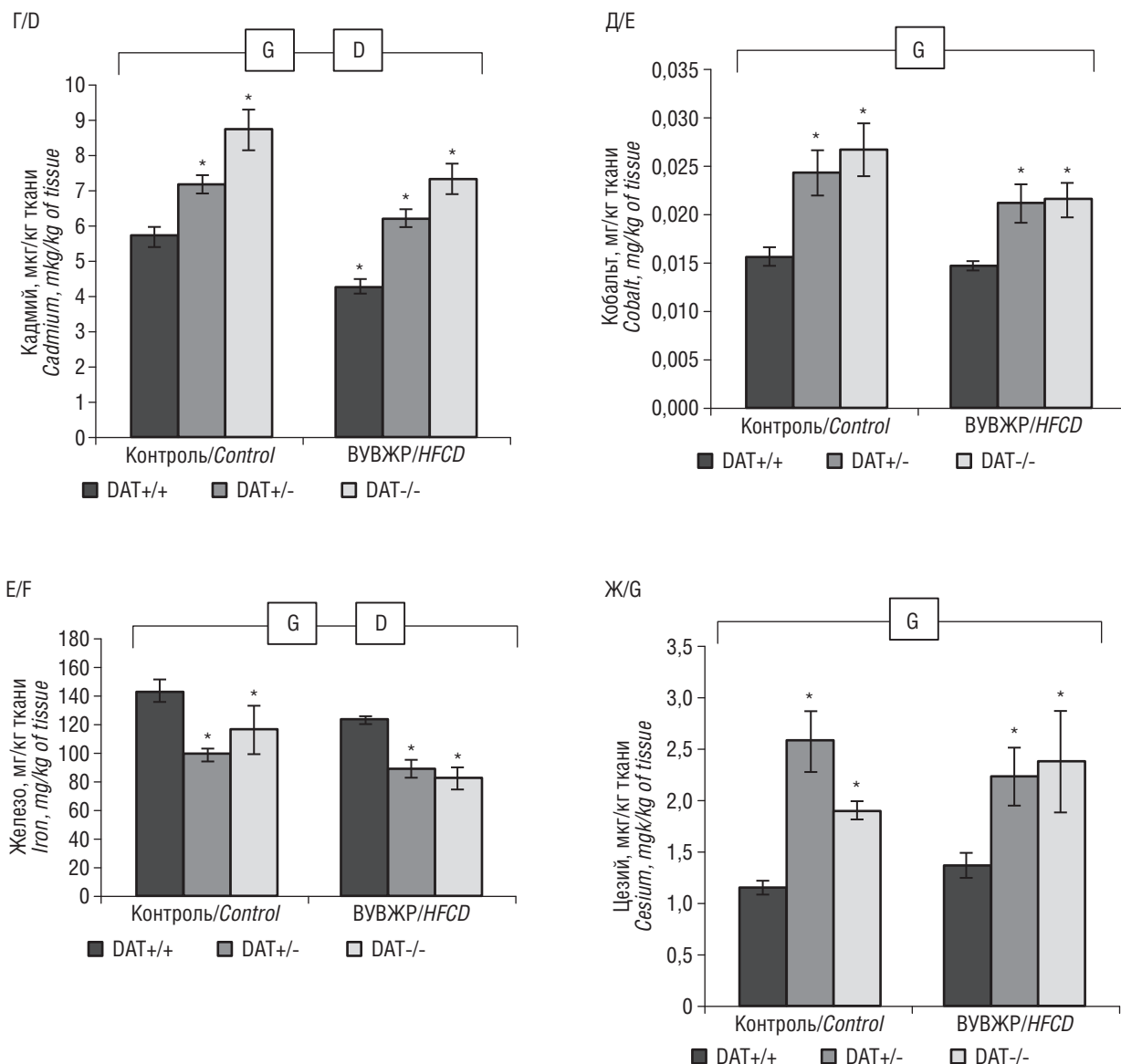


Рис. 1. (Окончание) Содержание микроэлементов в печени крыс. Среднее ($M \pm m$) содержание в ткани печени крыс опытных групп кадмия (Г), кобальта (Д), железа (Е) и цезия (Ж)

* – статистически значимое различие с соответствующей по рациону группой DAT+/+ ($p < 0.05$, U-тест Манна–Уитни). Горизонтальные скобки – распределение показателя в группах неоднородно по факторам генотип (G) и рацион (D) и их комбинации для охватываемого диапазона ($p < 0.05$, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA).

Fig. 1. (Part 2) The content of trace elements in rat liver. The average ($M \pm m$) content in the rat liver tissue of cadmium (D), cobalt (E), iron (F) and cesium (G)

* – the difference with the corresponding diet group DAT+/+ is significant ($p < 0.05$, Mann–Whitney U-test). Horizontal brackets – the distribution of the indicator in groups is heterogeneous by genotype (G) and diet (D) factors and their combinations for the covered range ($p < 0.05$, ANOVA two-way analysis of variance).

ченных из вивария Института трансляционной биомедицины СПбГУ (г. Санкт-Петербург), а также 13 самцах крыс аутбредной линии Вистар (DAT+/+) того же возраста, полученных из питомника Филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России». Животные были разделены в общей сложности на 6 групп: 1-я и 2-я – крысы с генотипом DAT+/+, 3-я и 4-я – DAT+/-, 5-я и 6-я – DAT-/-.

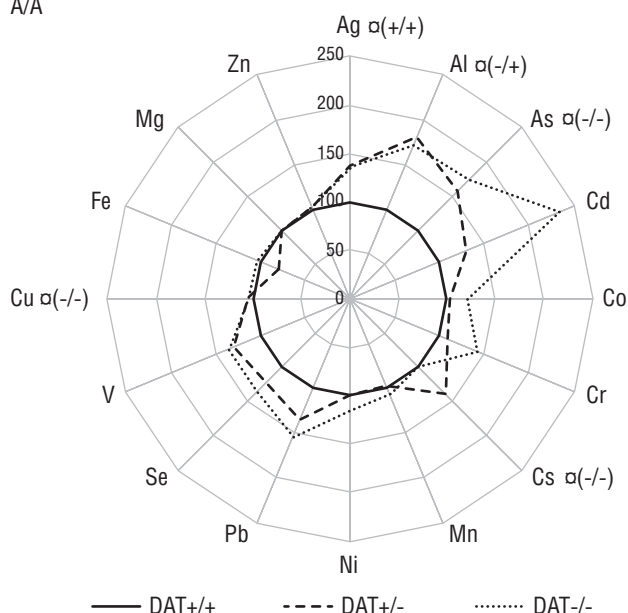
Численность указанных групп составила соответственно 7, 6, 11, 8, 5 и 6 особей. В течение 62 дней животные 1, 3 и 5-й групп (контроль) получали полусинтетический сбалансированный рацион по AIN93M [13], 2, 4 и 6-й групп – высокоуглеводный высокожировой рацион (ВУВЖР) с содержанием жиров 30% по массе сухих веществ и заменой питьевой воды на 20% раствор фруктозы. Данный рацион является моделью рациона питания с избытком

насыщенных жиров и сахаров, характерного для населения развитых стран [12]. Рацион, воду и раствор фруктозы представляли в режиме свободного доступа. Минеральные вещества в состав всех рационов вносили в виде унифицированной солевой смеси, состав которой представлен в таблице. При приготовлении солевой смеси применяли реактивы, указанные в таблице, соответствующие ГОСТ и имеющие квалификацию чистоты х.ч. или ос.ч. Воду для питья животных и приготовления рационов получали в установке обратного осмоса «Milli-RO» (Waters, США).

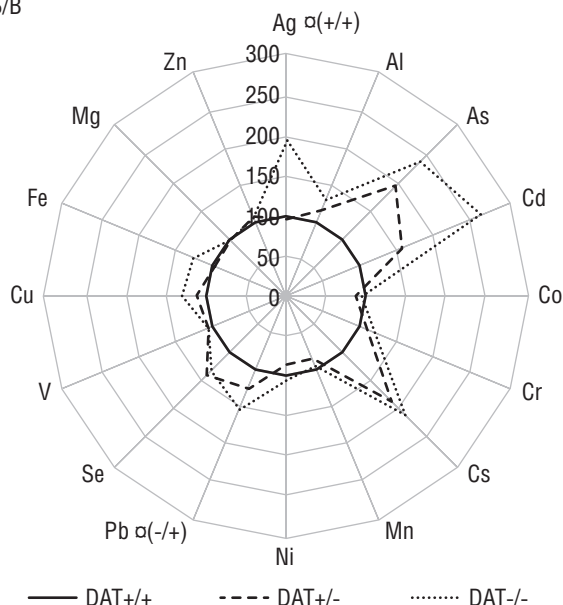
Крыс содержали по 1 (DAT^{-/-}) или 2 (остальные животные) особи в клетках из поликарбоната при 12/12-часовом режиме освещенности и температуре воздуха 22±1 °C. Массу тела определяли еженедельно на электронных весах с точностью ±1 г.

Предварительное классифицирование крыс DAT-KO по генотипу DAT выполняли согласно траектории их движения в установке «Открытое поле» (Panlab Harvard

A/A



B/B



B/C

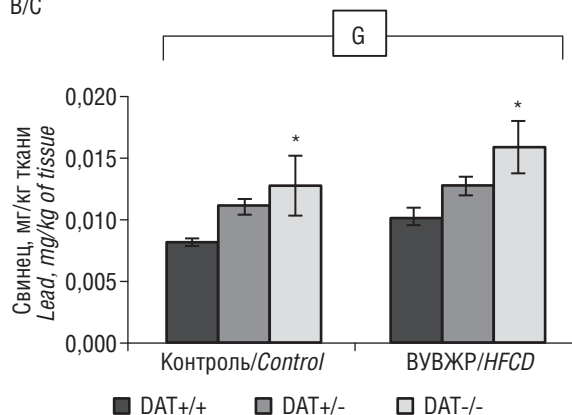


Рис. 2. (Начало) Содержание микроэлементов в почках крыс. Сравнение «микроэлементных портретов» ткани почек (лепестковые диаграммы) для животных с различными аллельными вариантами гена DAT (DAT^{+/+}, DAT^{+/-}, DAT^{-/-}), получавших сбалансированный рацион (А) и высокожировую высокоуглеводный рацион (ВУВЖР) (Б), % от величины для группы DAT^{+/+}. Среднее ($M \pm m$) содержание свинца в ткани почек крыс опытных групп (В)

* – статистически значимое различие с соответствующей по рациону группой DAT^{+/+} ($p < 0,05$, U-тест Манна–Уитни). Горизонтальные скобки – распределение показателя в группах неоднородно по факторам генотип (G) и рацион (D) и их комбинации для охватываемого диапазона ($p < 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA); □ – изъято 1 значение в группе для указанного (в скобках) генотипа.

Fig. 2. (Part 1) The content of trace elements in the kidneys of rats. Comparison of «microelement portraits» of kidney tissue (petal diagrams) for animals with different allelic variants of the DAT gene (DAT^{+/+}, DAT^{+/-}, DAT^{-/-}), receiving a balanced diet (A) and high-fat-high-carbohydrate diet (HFC) (B), per cent value of DAT^{+/+} group. The average ($M \pm m$) content in rat kidney tissue of lead (C)

* – the difference with the corresponding diet group DAT^{+/+} is significant, $p < 0.05$, Mann–Whitney U-test). Horizontal brackets – the distribution of the indicator in groups is heterogeneous by genotype (G) and diet (D) factors and their combinations for the covered range, $p < 0.05$, ANOVA two-way analysis of variance; □ – 1 value in the group was removed for the indicated (in brackets) genotype.

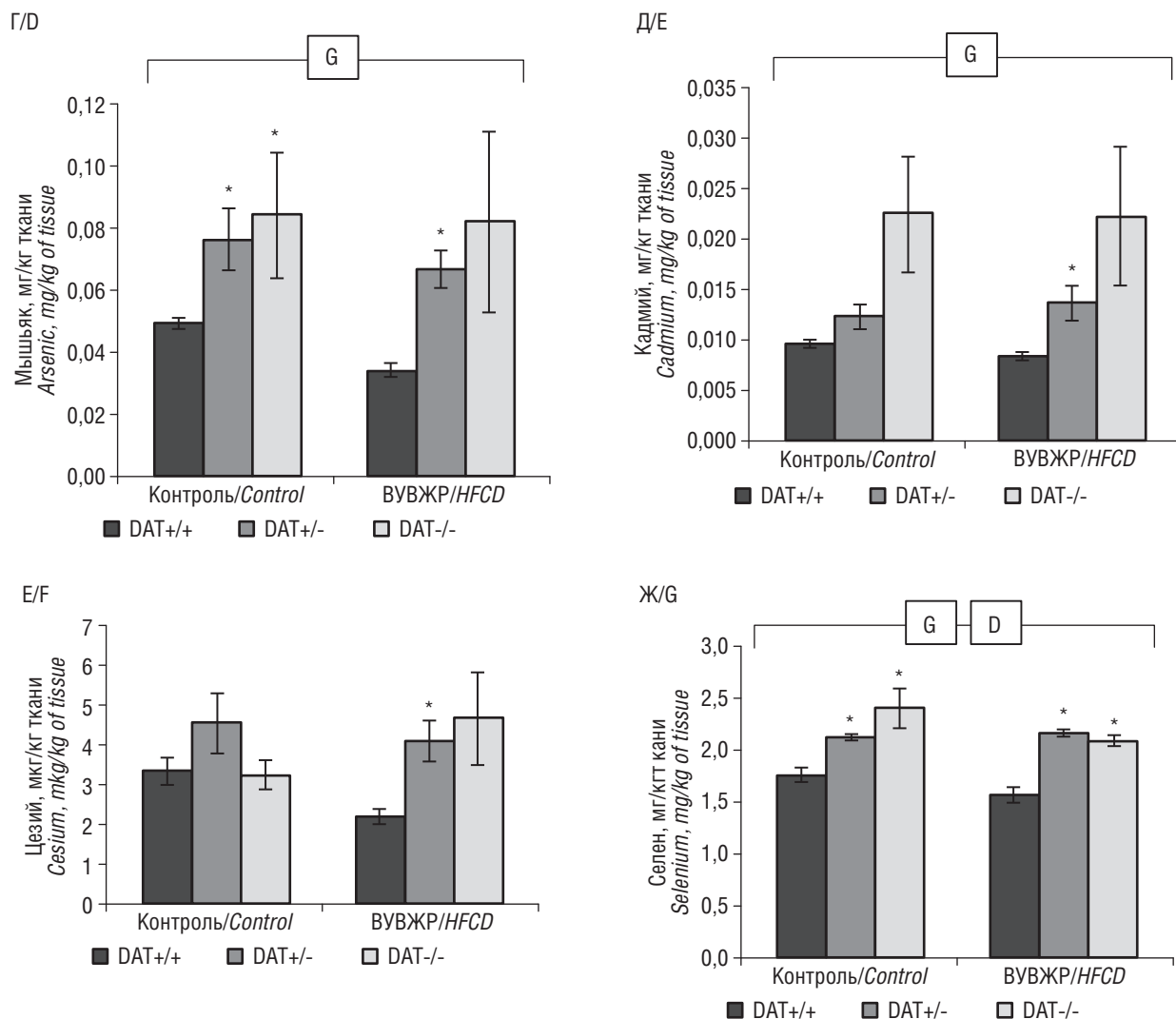


Рис. 2. (Окончание) Содержание микроэлементов в почках крыс. Среднее ($M \pm m$) содержание в ткани почек крыс опытных групп мышьяка (Г), кадмия (Д), цезия (Е) и селена (Ж)

* – статистически значимое различие с соответствующей по рациону группой DAT+/+ ($p < 0.05$, U-тест Манна–Уитни). Горизонтальные скобки – распределение показателя в группах неоднородно по факторам генотип (G) и рацион (D) и их комбинации для охватываемого диапазона ($p < 0.05$, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA).

Fig. 2. (Part 2) The content of trace elements in the kidneys of rats. The average ($M \pm m$) content in rat kidney tissue of, arsenic (D), cadmium (E), cesium (F) and selenium (G)

* – the difference with the corresponding diet group DAT+/+ is significant, $p < 0.05$, Mann–Whitney U-test). Horizontal brackets – the distribution of the indicator in groups is heterogeneous by genotype (G) and diet (D) factors and their combinations for the covered range, $p < 0.05$, ANOVA two-way analysis of variance.

Apparatus, Испания) [12]. Результаты этого классифицирования подтверждали по окончании эксперимента анализом аллельных вариантов гена *DAT* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с последующим рестрикционным анализом с использованием рестриктазы BtsI/MutI [11]. Данные о типировании животных опытных групп по генотипу гена *DAT* были представлены ранее [12].

Животных выводили из эксперимента на 63-и сутки путем декапитации под эфирной анестезией. Органы (печень, почки, головной мозг) извлекали стериль-

ными хирургическими инструментами, взвешивали с точностью ± 0.01 г и хранили до исследования при -20°C .

Анализ микроэлементного состава. Содержание 16 химических элементов, включая эссенциальные (Fe, Mg, Cu, Mn, Co, Se, Zn, Cr), токсичные (Al, Cd, As, Pb, Ni) и элементы с недостаточно установленной функцией (V, Cs, Ag) в органах (печень, почки, головной мозг) определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) на приборе серии 7700x (Agilent Technologies, Япония). Минерализацию биологических

Состав солевой смеси, применяемой при приготовлении экспериментальных рационов¹

The composition of the salt mixture used in experimental rations¹

Ингредиент <i>Ingredient</i>	Формула <i>Formula</i>	Количество, г на 1 кг смеси <i>Amount, g per kg of mixture</i>	Нормативный документ <i>Normative document</i>
Кальция карбонат <i>Calcium carbonate</i>	CaCO ₃	357	ГОСТ 4530
Калия фосфат, однозамещенный <i>Potassium phosphate, monosubstituted</i>	KH ₂ PO ₄	250	ГОСТ 4198
Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	NaCl	74	ГОСТ 4233
Калия сульфат <i>Potassium sulfate</i>	K ₂ SO ₄	46,6	ГОСТ 4145
Калия цитрат, 3-замещенный, моногидрат <i>Potassium citrate, 3-substituted, monohydrate</i>	K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·H ₂ O	28	ГОСТ 5538
Магния оксид <i>Magnesium oxide</i>	MgO	24	ГОСТ 4526
Железа цитрат моногидрат <i>Iron Citrate Monohydrate</i>	C ₆ H ₅ FeO ₇ ·H ₂ O	6,06	–
Цинка карбонат <i>Zinc carbonate</i>	ZnCO ₃	1,65	–
Марганец углекислый <i>Manganese carbonate</i>	MnCO ₃	0,63	–
Меди карбонат основной <i>Copper carbonate core</i>	CuCO ₃ ·Cu(OH) ₂	0,3	ГОСТ 8927
Калия йодат <i>Potassium iodate</i>	KIO ₃	0,01	ГОСТ 4202
Натрия селенат <i>Sodium Selenate</i>	Na ₂ SeO ₄	0,01025	–
Аммония молибдат, 4-водный <i>Ammonium Molybdate, 4-water</i>	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,00795	ГОСТ 3765
Натрия метасиликат <i>Sodium Metasilicate</i>	Na ₂ SiO ₃	0,63	–
Хромокалиевые квасцы, 12-водные <i>Potassium Alum, 12-water</i>	CrK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,275	ГОСТ 4162
Борная кислота <i>Boric acid</i>	H ₃ BO ₃	0,0815	ГОСТ 9656
Натрий фторид <i>Sodium Fluoride</i>	NaF	0,0635	ГОСТ 4463
Никеля карбонат основной водный <i>Nickel carbonate basic water</i>	NiCO ₃ ·2Ni(OH) ₂ ·H ₂ O	0,0318	ГОСТ 4466
Литий хлористый <i>Lithium chloride</i>	LiCl	0,0174	–
Аммония метаванадат <i>Ammonium Metavanadate</i>	NH ₄ VO ₃	0,0066	ГОСТ 9336
Сахароза <i>Sucrose</i>	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	210,626	ГОСТ 5833

Пр и м е ч а н и е. ¹ – содержание солевой смеси – 3,5 г/100 г массы сухого корма.

No t e. ¹ – the content of the salt mixture is 3.5 g/100 g of dry feed mass.

образцов выполняли под действием концентрированной азотной кислоты и концентрированной перекиси водорода в соотношении 5:1 в автоматизированной микроволновой системе пробоподготовки «TOPWAVE» (Analytik Jena, Германия). Содержание минеральных веществ выражали в мг или мкг на 1 кг ткани (влажной массы).

Статистическая обработка результатов. В целях повышения стабильности и сходимости результата предварительно проводили исключение грубых погрешностей (выпадающих результатов измерений) согласно ГОСТ Р 8.736-2011. Число исключаемых значений не превы-

шало 1 в каждой группе образцов; после исключения количество значений для любого из показателей было не менее 4. После этого проводили расчет выборочного среднего, среднеквадратичного отклонения и стандартной ошибки. Проверку гипотезы об однородности распределения показателей сравниваемых групп осуществляли с помощью 2-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) по факторам линии животных, рациона и их комбинаций. Гипотезу о несовпадении функций распределения данных в группах проверяли с использованием критерия Манна–Уитни. Расчеты выполняли в программе SPSS 20.0.

Результаты

Как следует из полученных данных, крысы DAT^{-/-}, получавшие контрольный рацион, отличались значительно большим (на 20–40%) средним удельным потреблением корма (рациона) на протяжении большей части эксперимента в сравнении как с DAT^{+/-}, так и с DAT^{+/+} (Вистар) крысами, которые, в свою очередь, практически не различались по этому показателю между собой. У крыс, получавших ВУВЖР, удельное потребление плотной части корма, начиная с 20-го дня опыта, не различалось для трех аллельных вариантов гена *DAT*, но было резко снижено в сравнении с соответствующими группами животных, не получавших раствор фруктозы [12].

Микроэлементные профили ткани печени, представленные на рис. 1, существенно различаются у крыс разного генотипа по *DAT* в условиях потребления как контрольного рациона (рис. 1А), так и ВУВЖР (рис. 1Б). Так, у DAT^{-/-} и DAT^{+/-} отмечается по сравнению с DAT^{+/+} статистически значимое возрастание содержания As (рис. 1В), Cd (рис. 1Г), Co (рис. 1Д) и Cs (рис. 1Ж) (ANOVA $p < 0,05$ по фактору «генотип»), независимо от состава рациона (ANOVA $p > 0,1$ по фактору «рацион»). Существенно, что эти изменения были характерны не только для DAT^{-/-} на контрольном рационе, характеризовавшихся гиперфагией, но и для DAT^{+/-}, а также для нокаутных животных, получавших ВУВЖР, которые по количеству потребляемого корма не отличались от DAT^{+/+}. Повышенное накопление Pb в печени наблюдалось только у DAT^{-/-} на контрольном рационе, что может быть следствием больших потребляемых количеств этого элемента, присутствующего в рационе на фоновом уровне. В отличие от вышеуказанных элементов, содержание Fe (рис. 1Е) в печени крыс DAT^{-/-} и DAT^{+/-} было снижено по сравнению с DAT^{+/+}, причем данный эффект был более заметен при потреблении ВУВЖР (ANOVA $p < 0,05$ по факторам «генотип» и «рацион»). Менее выраженное снижение запасов Fe в печени у DAT^{-/-} на контрольном рационе, по-видимому, может быть связано с маскировкой эффекта за счет больших количеств этого элемента, потребляемого данными крысами вследствие гиперфагии. Статистически значимое снижение накопления в печени нокаутных по *DAT* крыс установлено также для Mg (ANOVA $p < 0,05$ по фактору «генотип»), однако амплитуда этих изменений была $< 20\%$, что не превышает погрешности метода ICP-MS.

В почках крыс (рис. 2), как и в печени, было выявлено статистически значимое увеличение у DAT^{-/-} и DAT^{+/-} по сравнению с животными «дикого типа» накопления Pb (рис. 2В), As (рис. 2Г) и Cd (рис. 2Д) (ANOVA $p < 0,05$ по фактору «генотип»), независимо от применяемого рациона (рис. 2А, 2Б) (ANOVA $p > 0,1$ по фактору «рацион»). Содержание Se (рис. 2Ж) в почках было также достоверно повышено у DAT^{-/-} и DAT^{+/-} по сравнению с DAT^{+/+}, однако влияние рациона на этот показатель (ANOVA $p < 0,05$ по фактору «рацион») позволяет предположить, что, во вся-

ком случае, у DAT^{-/-} этот эффект частично объясняется наличием гиперфагии. Статистически значимое увеличение накопления Cs (рис. 2Е) в почках было выявлено только у DAT^{+/-} крыс, получавших ВУВЖР.

Микроэлементный «портрет» головного мозга, как следует из данных рис. 3, характеризовался избыточным количеством большинства изученных элементов у DAT^{-/-} и DAT^{+/-} по сравнению с крысами «дикого типа» (рис. 3А, 3Б). В частности, было выявлено статистически значимое увеличение накопления Pb (рис. 3В), As (рис. 3Г) и Cs (рис. 3Ж) у нокаутных животных обоих аллельных вариантов, независимо от потребляемого рациона (ANOVA $p < 0,05$ по фактору «генотип» и $p > 0,1$ по фактору «рацион»). Содержание Al (рис. 3Д) в мозге было статистически значимо повышено только у гетерозигот DAT^{+/-}, получавших контрольный рацион. Закономерности для накопления Cu (рис. 3Е) имели сложный характер: уровень этого элемента, согласно факторному анализу, находился под влиянием генотипа, рациона и их сочетания. Таким образом, во всяком случае, у DAT^{-/-}, увеличенное накопление Cu в мозге может быть объяснено избыточным потреблением этого элемента в составе контрольного рациона.

Обсуждение

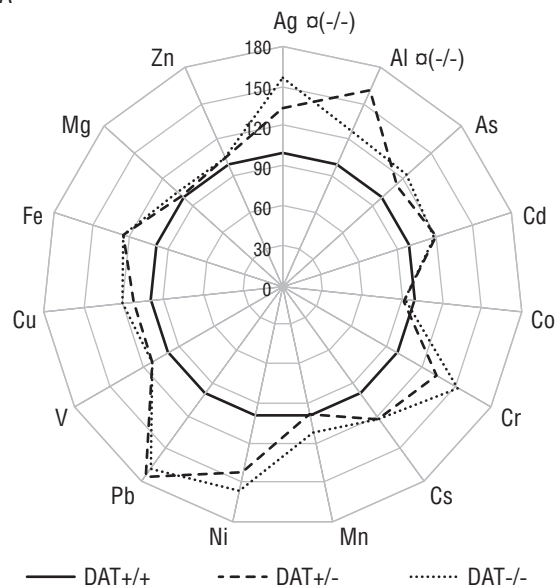
Полученные данные свидетельствуют, что у крыс с нокаутом гена *DAT* (как гомозигот, так и у гетерозигот) наблюдаются множественные отличия в межорганном распределении и накоплении микроэлементов от животных «дикого типа». При этом по условиям эксперимента крысы получали эссенциальные элементы Fe, Cu, Se, Cr и другие в составе солевой смеси рациона в количествах, близких к уровню физиологической потребности [13], тогда как соединения Pb, Cd, As, Al, Cs в состав рациона животных специально не вводили, и эти элементы присутствовали в его компонентах в фоновых количествах. Повышенное содержание Pb, As, Al, а также, по-видимому, Cu в головном мозге крыс DAT^{-/-} и DAT^{+/-} может свидетельствовать об усилении накопления этих потенциально нейротоксичных элементов под влиянием сниженных уровней ДА в ЦНС, что может внести вклад в запуск нейродегенеративных процессов [4, 6, 9].

Влияние нокаута гена *DAT* на содержание Pb, Cd, As, Co и Fe в печени и почках не имеет однозначного объяснения. Одной из причин наблюдаемых эффектов может быть влияние на эти показатели повышенной скорости катаболических реакций, что наблюдается у нокаутных по *DAT* животных [12]. Заслуживают также внимания выявленные у крыс DAT^{-/-} и DAT^{+/-} особенности в накоплении в органах ультрамикроэлемента Cs, который, по некоторым данным, может рассматриваться в качестве чувствительного биомаркера нарушения водно-солевого обмена [14]. Характерно, что повышенный уровень Cs выявляется преимущественно в наиболее метаболически активных органах (печень, головной мозг) у крыс

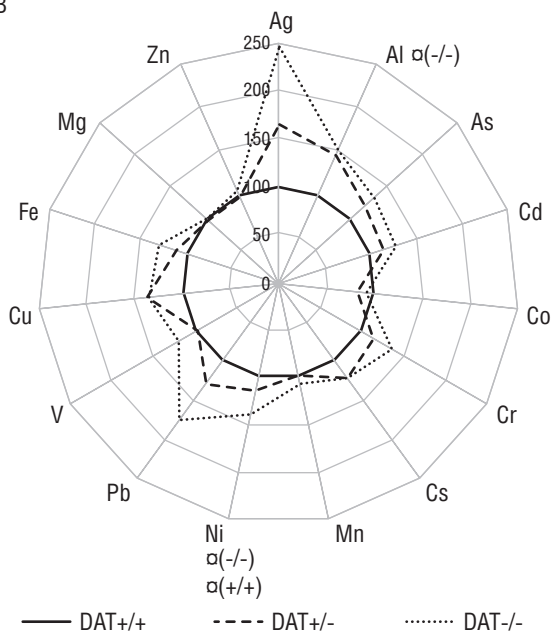
DAT^{-/-} и DAT^{+/-}, характеризующихся повышенной интенсивностью катаболизма. В нашей предыдущей работе увеличенные уровни Cs также отмечались в органах крыс, находящихся в состоянии гиперкатаболизма вследствие В-витаминного дефицита [15].

Полученные в настоящей работе результаты подтверждают наличие взаимосвязи нарушенного обмена ДА в ЦНС со статусом целого ряда микроэлементов, причем данные эффекты проявляются не только в головном мозге, но и в периферических тканях. В условиях потребления ВУВЖР, характеризующегося избыточностью в сравнении со стандартным рационом удельной калорийностью, характер этих изменений в микроэлементном профиле органов имеет свои особенности, и некоторые из них (влияние на уровни Fe, Cs) не имеют тривиального объяснения, связанного с различиями в количествах потребляемой плотной части рациона. В совокупности это указывает на тесную связь между нарушениями в микроэлементном гомеостазе и в обмене ДА, что может

А/А



Б/В



В/С

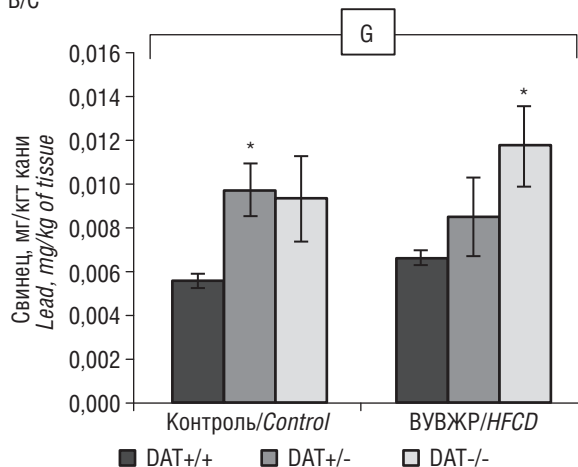


Рис. 3. (Начало) Содержание микроэлементов в головном мозге крыс. Сравнение «микроэлементных портретов» ткани головного мозга (лепестковые диаграммы) для животных с различными аллельными вариантами гена *DAT* (DAT^{+/+}, DAT^{+/-}, DAT^{-/-}), получавших сбалансированный рацион (А) и высокожировую высокоуглеводный рацион (ВУВЖР) (Б), % от величины для группы DAT^{+/+}. Среднее ($M \pm m$) содержание в ткани головного мозга крыс опытных групп свинца (В)

* – статистически значимое различие с соответствующей по рациону группой DAT^{+/+} ($p < 0,05$, U-тест Манна–Уитни). Горизонтальные скобки – распределение показателя в группах неоднородно по факторам генотип (G) и рацион (D) и их комбинации для охватываемого диапазона ($p < 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA); □ – изъято 1 значение в группе для указанного (в скобках) генотипа.

Fig. 3. (Part 1) The content of trace elements in the brain of rats. Comparison of “microelement portraits” of brain tissue (petal diagrams) for animals with different allelic variants of the *DAT* gene (DAT^{+/+}, DAT^{+/-}, DAT^{-/-}), who received a balanced diet (A) and high-fat-high-carbohydrate diet (HFCD) (B), per cent value of DAT^{+/+} group. The average ($M \pm m$) content in rat brain tissue of lead (C)

* – the difference with the corresponding diet group DAT^{+/+} is significant, $p < 0.05$, Mann–Whitney U-test). Horizontal brackets – the distribution of the indicator in groups is heterogeneous by genotype (G) and diet (D) factors and their combinations for the covered range, $p < 0.05$, ANOVA two-way analysis of variance; □ – 1 value in the group was removed for the indicated (in brackets) genotype.

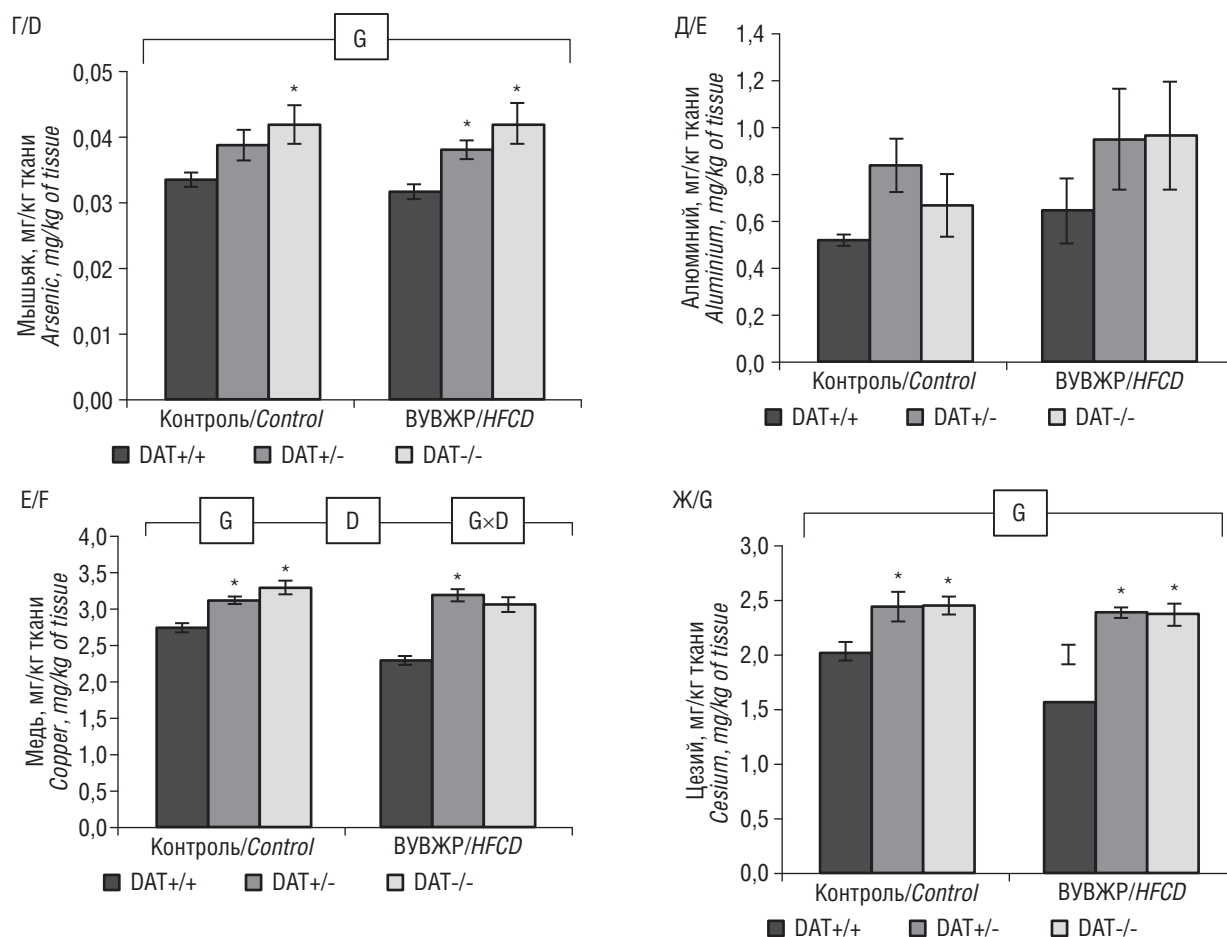


Рис. 3. (Окончание) Содержание микроэлементов в головном мозге крыс. Среднее ($M \pm m$) содержание в ткани головного мозга крыс опытных групп мышьяка (Г), алюминия (Д), меди (Е) и цезия (Ж)

* – статистически значимое различие с соответствующей по рациону группой DAT+/+ ($p < 0.05$, U-тест Манна–Уитни). Горизонтальные скобки – распределение показателя в группах неоднородно по факторам генотип (G) и рацион (D) и их комбинации для охватываемого диапазона ($p < 0.05$, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA).

Fig. 3. (Part 2) The content of trace elements in the brain of rats. The average ($M \pm m$) content in rat brain tissue of arsenic (D), aluminium (E), copper (F) and cesium (G)

* – the difference with the corresponding diet group DAT+/+ is significant, $p < 0.05$, Mann–Whitney U-test). Horizontal brackets – the distribution of the indicator in groups is heterogeneous by genotype (G) and diet (D) factors and their combinations for the covered range, $p < 0.05$, ANOVA two-way analysis of variance.

вносить существенный вклад в механизмы развития ожирения, а показатели микроэлементного гомеостаза могут быть информативными биоиндикаторами

эффективности его диетической коррекции с помощью перспективных специализированных пищевых продуктов.

Сведения об авторах

Шумакова Антонина Александровна (Antonina A. Shumakova) – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (Москва, Российская Федерация)

E-mail: antonina_sh@list.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1373-4436>

Апратин Сергей Алексеевич (Sergey A. Apryatin) – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории метаболического и протеомного анализа ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (Москва, Российская Федерация)

E-mail: apryatin@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6543-7495>

Шипелин Владимир Александрович (Vladimir A. Shipelin) – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (Москва, Российская Федерация)

E-mail: v.shipelin@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0015-8735>

Ефимова Евгения Викторовна (Evgeniya V. Efimova) – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины СПбГУ (Санкт-Петербург, Российская Федерация)

E-mail: e.v.efimova@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9641-515X>

Фесенко Зоя Сергеевна (Zoya S. Fesenko) – лаборант-исследователь лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины СПбГУ (Санкт-Петербург, Российская Федерация)

E-mail: zozoya07@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2074-9081>

Гмошинский Иван Всеволодович (Ivan V. Gmoshinski) – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (Москва, Российская Федерация)

E-mail: gmosh@ion.ru

<https://orcid.org/0000-0002-3671-6508>

Литература/References

- Volkow N.D., Wang G.J., Baler R.D. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci.* 2011; 15 (1): 37–46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.11.001>
- Rada P., Bocarsly M.E., Barson J.R., Hoebel B.G., Leibowitz S.F. Reduced accumbens dopamine in Sprague-Dawley rats prone to overeating a fat-rich diet. *Physiol Behav.* 2010; 101 (3): 394–400. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.07.005>
- Alsiö J., Olszewski P.K., Norbäck A.H., Gunnarsson Z.E.A., Levine A.S., Pickering C., et al. Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience.* 2010; 171 (3): 779–87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.046>
- Gupta R., Shukla R.K., Pandey A., Sharma T., Dhuriya Y.K., Srivastava P., et al. Involvement of PKA/DARPP-32/PP1 α and β -arrestin/Akt/GSK-3 β signaling in cadmium-induced DA-D2 receptor-mediated motor dysfunctions: protective role of quercetin. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 2528. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20342-z>
- Srivastava P., Dhuriya Y.K., Gupta R., Shukla R.K., Yadav R.S., Dwivedi H.N., et al. Protective effect of curcumin by modulating BDNF/DARPP32/CREB in arsenic-induced alterations in dopaminergic signaling in rat corpus striatum. *Mol Neurobiol.* 2018; 55 (1): 445–61. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0288-2>
- Ziomer A., Surowka A.D., Antkiewicz-Michaluk L., Romanska I., Wrobel P., Szczerbowska-Boruchowska M. Combined brain Fe, Cu, Zn and neurometabolite analysis - a new methodology for unraveling the efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) in appetite control. *Metallomics.* 2018; 10 (3): 397–405. DOI: <https://doi.org/10.1039/c7mt00329c>
- Hare D.J., Double K.L. Iron and dopamine: a toxic couple. *Brain.* 2016; 139 (pt 4): 1026–35. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/aww022>
- Dalla Torre G., Mujika J.I., Lachowicz J.I., Ramos M.J., Lopez X. The interaction of aluminum with catecholamine-based neurotransmitters: can the formation of these species be considered a potential risk factor for neurodegenerative diseases? *Dalton Trans.* 2019; 48 (18): 6003–18. DOI: <https://doi.org/10.1039/c8dt04216k>
- Van Duyn N., Settivari R., LeVora J., Zhou S., Unrine J., Nass R. The metal transporter SMF-3/DMT-1 mediates aluminum-induced dopamine neuron degeneration. *J Neurochem.* 2013; 124 (1): 147–57. DOI: <https://doi.org/10.1111/jnc.12072>
- Skalnaya M.G., Skalny A.V., Grabeklis A.R., Serebryansky E.P., Demidov V.A., Tinkov A.A. Hair trace elements in overweight and obese adults in association with metabolic parameters. *Biol Trace Elem Res.* 2018; 186 (1): 12–20. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1282-5>
- Leo D., Sukhanov I., Zoratto F., Illiano P., Caffino L., Sanna F., et al. Pronounced hyperactivity, cognitive dysfunctions, and BDNF dysregulation in dopamine transporter knock-out rats. *J Neurosci.* 2018; 38: 1959–72. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1931-17.2018>
- Apryatin S.A., Shipelin V.A., Trusov N.V., Mzhelskaya K.V., Evstratova V.S., Kirbaeva N.V., et al. Comparative analysis of the influence of a high-fat/high-carbohydrate diet on the level of anxiety and neuromotor and cognitive functions in Wistar and DAT-KO rats. *Physiol Rep.* 2019; 7 (4): e13987. DOI: <https://doi.org/10.14814/phy2.13987>
- Reeves P.C. AIN-93 purified diets for the study of trace elements metabolism in rodents. In: R.R. Watson (ed.). *Trace Elements in Laboratory Rodents.* New York, etc: CRC Press, 2000.
- Leggett R.W., Williams L.R., Melo D.R., Lipsztein J.L. A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body. *Sci Total Environ.* 2003; 317 (1–3): 235–55.
- Apryatin S.A., Shumakova A.A., Vrzhesinskaya O.A., Leonenko S.N., Kodentsova V.M., Gmoshinsky I.V. Alteration of mineral element status of rodents under combined group B vitamin deficiency. *Trace Elem Electrolytes.* 2018; 35 (10): 193–5.