

ИЗУЧЕНИЕ ИНДУКЦИИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИИ СОЛЕЙ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ

Е.Г.Пыхтеева

Украинский НИИ медицины транспорта, г. Одесса

РЕЗЮМЕ. Вивчено індукцію металотіонеїнів у печінці мишей після одноразового внутрішньоочеревинного введення солей двовалентних важких металів ($ZnCl_2$, $Cd(CH_3COO)_2$, $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$, $Hg(CH_3COO)_2$, $CuCl_2$). Найбільш сильним індуктором виявився хлорид кадмію. Вміст металотіонеїну в печінці збільшився в середньому в 33 рази у порівнянні з контролем.

Ключові слова: металотіонеїн, печінка, важкі метали, внутрішньоочеревинне введення.

РЕЗЮМЕ. Изучена индукция металло thiонейнов в печени мышей после однократного внутрибрюшинного введения солей двухвалентных тяжелых металлов ($ZnCl_2$, $Cd(CH_3COO)_2$, $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$, $Hg(CH_3COO)_2$, $CuCl_2$). Наиболее сильным индуктором оказался хлорид кадмия. Содержание металло thiонейна в печени выросло в среднем в 33 раза по сравнению с контролем.

Ключевые слова: металло thiонейн, печень, тяжелые металлы, внутрибрюшинное введение.

SUMMARY. The induction of metallothioneins in the liver of mice after a single intraperitoneal introduction of divalent heavy metals salts was studied ($ZnCl_2$, $Cd(CH_3COO)_2$, $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$, $Hg(CH_3COO)_2$, $CuCl_2$). The cadmium chloride is the most potent metallothionein inducer. The content of metallothionein in the liver increased by an average of 33 times compared with the control.

Key words: metallothionein, liver, heavy metals, intraperitoneal injection.

Металлотионеины (МТН) в настоящее время рассматриваются как суперсемейство низкомолекулярных белков. Они присутствуют практически во всех живых организмах [1] и ответственны за обеспечение биодоступности цинка и детоксикацию некоторых токсичных металлов. Типичной особенностью их строения является отсутствие ароматических аминокислот и высокое содержание остатков цистеина, что определяет способность МТН к связыванию ионов одно- и двухвалентных металлов, снижение содержания реактивных форм кислорода и оксидов азота [2].

Непосредственно вслед за открытием роли МТН в транспорте металлов началось интенсивное изучение возможности и эффективности использования показателя индукции этого белка в тканях и биосредах как высокочувствительного маркера профессиональных и экологически обусловленных интоксикаций тяжелыми металлами, вероятного активного участника в патогенезе отравлений, показателя соотношения повреждающих и защитных механизмов для прогноза вероятных исходов поражений, поиска средств и способов дезинтоксикационных мероприятий.

Известно, что синтез МТН *in vivo* и *in vitro* индуцируется различными факторами, например, тяжелыми металлами [3], четыреххлористым углеродом [4], оксидативным стрессом, химиотерапевтическими противораковыми средствами, курением и продолжительным голоданием [8]. М. Penkowa с соавт. [5] описали индукцию синтеза МТН в скелетных мышцах при повышенной физической нагрузке.

Наиболее мощными индукторами МТН являются катионы тяжелых металлов (ТМ). Например, кадмий и цинк способны повышать уровень МТН в печени до 100 раз. Другие ТМ, включая Au, Bi, Cu, Co, Hg, Fe, In, Mn, Ni, Pt, — также способны индуцировать рост МТН в различной степени в зависимости от концентрации и способа введения металла, режима питания и некоторых других факторов, а также вида ткани и ее физиологического статуса. Степень индукции также зависит от времени после введения, так как для транспорта металла к месту синтеза, экспрессии генов мРНК МТН и собственно синтеза белка требуется определенное время. Физические стрессоры также повышают уровень синтеза МТН в 5-10 раз, воспалительные агенты (например, ЛПС) или провоспалительные цитокины стимулируют экспрессию МТН в печени в 10-20 раз. Важно подчеркнуть, что, во-первых, этот эффект прослеживается в опытах *in vitro* и *in vivo*, во-вторых, индукция МТН ионами ТМ имеет выраженную тканевую и изоформную специфичность [6].

Цинк и медь являются физиологическими индукторами МТН. Другие индукторы активны в большей или меньшей степени как стресс-агенты. Именно наличие цинка в МТН позволяет этим белкам играть ключевую роль в клеточном окислительно-восстановительном метаболизме и взаимодействовать с физиологически релевантными молекулами за счет динамичных Zn-тиолатных связей [7]. Раскрытие данного взаимодействия обусловило прогресс в изучении механизмов выполнения МТН своих физиологических функций по клеточно-

му транспорту Zn, выработке энергии клетками, защите организма от оксидативного стресса и нейродегенеративных заболеваний.

Упрощенная схема поведения металла-индуктора МТН представлена на схеме (рис.1). При введении металла, независимо от способа введения, моментально происходит его комплексообразование с белками или другими комплексообразователями. Не случайно, в живом организме ТМ не существуют в виде свободных ионов. Затем происходит всасывание комплексов в кровь и неспецифическое связывание с белками крови, в основном, с альбумином. Металл-альбуминовый комплекс транспортируется в печень, где происходит перекомплексообразование с более сильным ак-цептором — МТН. В гепатоцитах, также как и в других клетках организма, часть МТН находится в неполностью металлизированном состоянии [7] и доступна для связывания. Поступление комплекса металла в клетку вызывает Zn-зависимую экспрессию гена мРНК МТН и индукцию синтеза МТН с протеканием целого каскада промежуточных реакций с участием множества сигнальных и управляющих молекул, в т.ч. факторов транскрипции и цинксодержащих пальцевидных белков.

Связанный с токсичными ТМ комплекс МТН распознается организмом как подлежа-

щий утилизации и выведению, транспортируется в лизосомы, где и происходит его биодegradация. Продукты биодegradации (низкомолекулярные водорастворимые комплексы ТМ) выводятся из клетки путем экзоцитоза. При превышении физиологической емкости лизосом из-за высокой концентрации ТМ происходит повреждение клеток.

Понимание механизмов индукции МТН соединениями тяжелых металлов при разных способах введения дало бы возможность использовать содержание МТН в органах и тканях в диагностических и прогностических целях.

В большинстве проведенных в мире работ по изучению индукции МТН исследователи используют внутрижелудочный способ введения соединений ТМ [8]. Практически не изучена индукция МТН при внутривенном и интраперитонеальном введении.

Материалы и методы

Исследование проведено на нелинейных белых лабораторных мышах-самцах (т.н. "мышьях дикого типа") массой 18-25 г. Животные были разделены на 6 групп по 5 мышей в каждой. I группа служила контролем. Животным II, III, IV, V, VI групп внутривенно вводили растворимые соли свинца, меди, цинка, ртути, кадмия соответственно (в дозе 1/20 от LD₅₀).



Рис 1. Транспорт и выведение металлов – индукторов МТН.

Значения LD₅₀ для мышей при внутрибрюшинном введении

Формула соли	LD ₅₀ , мг/кг	Молярная масса, г/моль	LD ₅₀ , ммоль/кг
ZnCl ₂	24	136,28	0,18
Cd(CH ₃ COO) ₂	14	230,4	0,06
Pb(CH ₃ COO) ₂ *3H ₂ O	174	379,33	0,46
Hg(CH ₃ COO) ₂	6,5	318,6	0,02
CuCl ₂	7,4	98,99	0,07

Таблица 2

Количество (мкг) соли и иона металлов, введенное в среднем на 1 животное массой 20 г

Название соли	Масса соли, мкг	Масса иона металла, мкг
ZnCl ₂	24	11,5
Cd(CH ₃ COO) ₂	14	6,8
Pb(CH ₃ COO) ₂ *3H ₂ O	174	95,0
Hg(CH ₃ COO) ₂	6,5	4,1
CuCl ₂	7,4	4,7

Каждому животному вводили (в зависимости от массы) 0,4-0,5 мл раствора соли соответствующего металла (вводимая доза составляла 1/20 LD₅₀). Через 3 суток животных выводили из эксперимента декапитированием под эфирным наркозом с соблюдением требований биоэтики. В печени определяли содержание металлов методом атомно-эмиссионной спектроскопии на атомно-эмиссионном спектрометре ЭМАС-200 CD с электродуговой атомизацией и МТН по методу, описанному в [9].

Результаты и их обсуждение

Внутрибрюшинный способ введения солей ТМ является традиционным при исследовании токсикометрических показателей, и изучение индукции МТН при этом способе введения представляет определенный интерес. Значения LD₅₀ исследуемых солей металлов (табл. 1) взяты из базы данных MSDS (<http://www.strem.com>). Измерения приведенных LD₅₀ проведены в ведущих лабораториях мира с выполнением всех правил GLP.

Как видно из анализа табл. 1, при внутрибрюшинном введении для мышей наименее токсичным является ацетат свинца, который менее токсичен, чем соли цинка и меди. Молярный ряд токсичности для изученных соединений имеет следующий вид: Hg²⁺>Cd²⁺>Cu²⁺>Zn²⁺>Pb²⁺. Поскольку для индукции МТН однократно вводили дозу 1/20 LD₅₀, на одну мышь было введено в среднем количество

соли (в пересчете на металл), приведенное в табл. 2.

Несмотря на столь небольшое количество введенных солей, в печени подопытных животных наблюдался достоверный рост концентрации соответствующих металлов, кроме меди, рост концентрации которой в печени недостоверен, что объясняется ее высоким базальным содержанием в печени, по сравнению с которым введенная доза незначительна (рис. 1).

При этом интересно отметить, что достоверный рост содержания цинка в печени по отношению к контролю (рис. 2) наблюдается не только у животных, которым вводили хлорид цинка, но и у мышей, которым вводили соли свинца, ртути и меди, что согласуется с мобилизацией цинка в печень в связи с его повышенной потребностью для индукции МТН именно в печени, где его синтез максимален.

Установлено, что экспрессия генов мРНК МТН, предшествующая собственно белковому синтезу, инициируется только биодоступными ионами цинка, которые вытесняются из МТН при наличии в печени повышенных концентраций токсичных двухвалентных ионов, связывание которых с сульфгидрильными группами МТН носит более прочный характер [8].

Содержание МТН в печени определяли методом насыщения кадмием с его детекцией методом АЭС-ДА. При этом возникли трудности с определением МТН в группе, экспонирован-

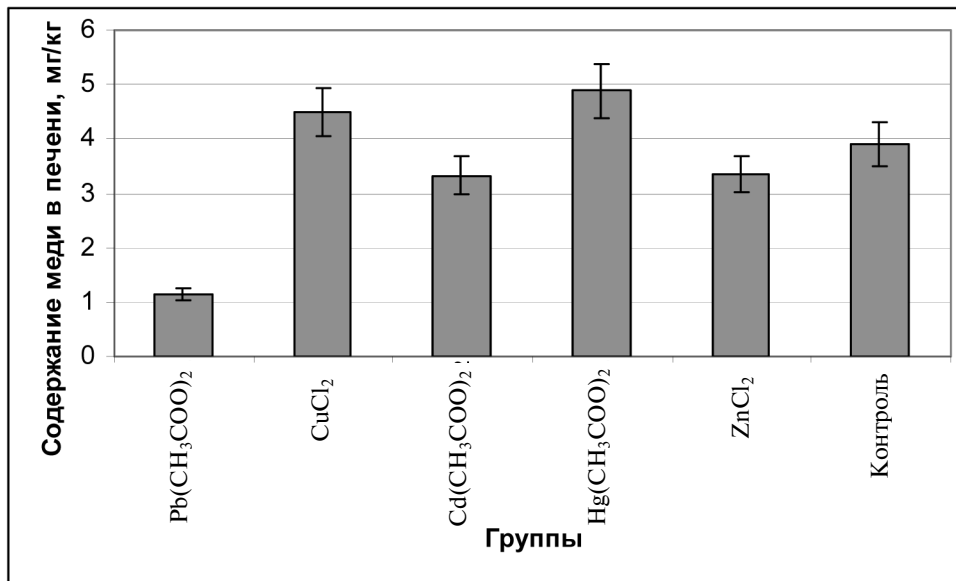


Рис. 1. Среднее содержание меди в печени мышей после однократной внутрибрюшинной экспозиции солями тяжелых металлов в дозе 1/20 LD₅₀

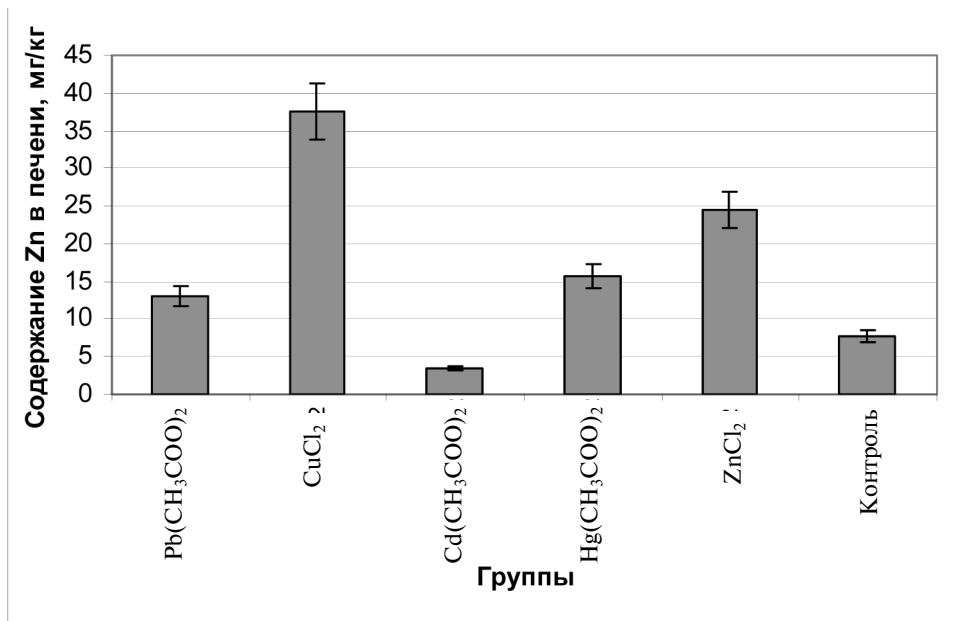


Рис. 2. Среднее содержание цинка в печени мышей после однократной внутрибрюшинной экспозиции солями тяжелых металлов в дозе 1/20 LD₅₀

ной солью ртути. После определения по стандартной методике были получены явно заниженные значения. Поскольку общеизвестно, что ртуть является мощным индуктором МТН [8], был проведен дополнительный анализ. Известно, что заместительный метод основан на вытеснении кадмием цинка и других металлов из МТН в условиях *in vitro* с последующим удалением избытка кадмия и аналитическим измерением содержания кадмия, стехиометрично связанного с МТН. Однако, в силу своих химических свойств ион кадмия не может вытеснить из МТН ионы ртути, так как связь последних с сульфидрильными группами МТН значительно прочнее. Поэтому после удаления избытка кадмия раствор, содержащий Cd, Hg-МТН был подвергнут "мокрому" озолению в среде азотной кислоты, после чего в нем было определено молярное содержание ртути, которая осталась связанной и не была

вытеснена из МТН. Таким образом, было показано, что при индукции соединениями ртути примерно треть мест связывания металлов в МТН занята ионами ртути, остальная — ионами цинка и меди. Средние концентрации МТН в печени мышей разных групп приведены на рис. 3.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в дозе 1/20 LD₅₀ наиболее сильную индукцию МТН вызывает ацетат кадмия. Достаточно высокая индукция МТН ацетатом свинца может быть объяснена его более высокой введенной дозой (см. табл. 2). По степени индукции ионы металлов расположились в следующей последовательности: Cd²⁺ > Pb²⁺ > Zn²⁺ > Hg²⁺ > Cu²⁺

Для более корректного построения ряда ионов металлов по их способности индуцировать МТН в печени запланирован эксперимент, в котором будет вводиться одинаковая молярная

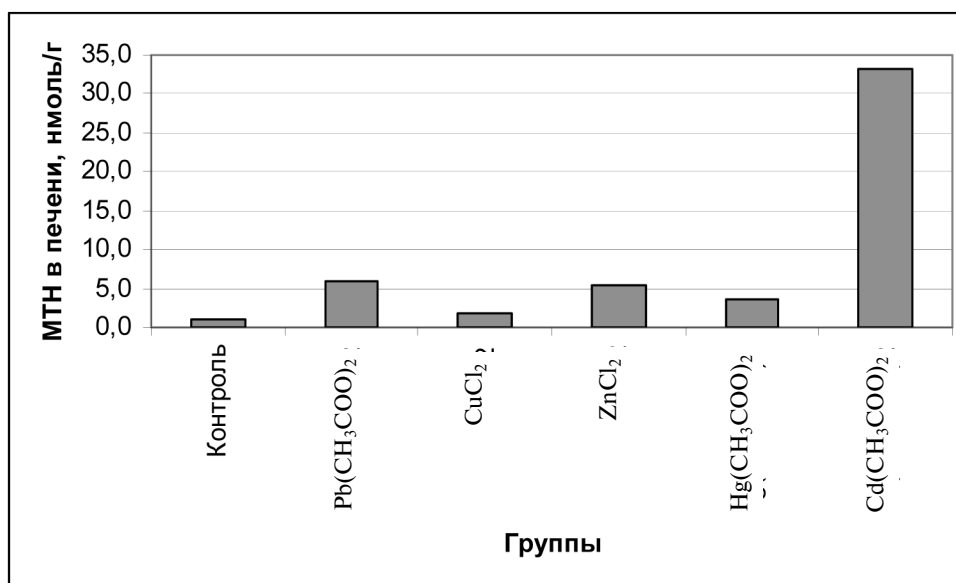


Рис. 3. Среднее содержание МТН (нмоль/г) в печени мышей разных групп после однократной внутрибрюшинной экспозиции солями тяжелых металлов в дозе 1/20 LD₅₀

доза металла, соответствующая 1/2 LD₅₀ наиболее токсичного соединения.

Выводы

1. Все изученные соединения ТМ являются индукторами МТН.
2. Даже низкие дозы Cd²⁺ (1/20 LD₅₀ или 6,8 мкг на мышь) при однократном внутрибрюшинном введении вызывают рост МТН в 33 раза, т.е. МТН является очень чувствительным биомаркером экспозиции кадмием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tang C.-M. trans Repression of the Human Metallothionein IIА Gene Promoter by PZ120, a Novel 120-Kilodalton Zinc Finger Protein / C. — M. Tang, J. Westling, E. Seto // *Molecular and Cellular Biology* — 1999. — Vol. 19, No. 1. — P. 680 — 689.
2. Karin M.. Characterization of the metallothioneins induced in HeLa cells by dexamethasone and zinc. / M. Karin, H. R. Herschman. // *Eur. J. Biochem.* — 1980. — Vol. 107 — P. 395 — 401.
3. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium. / S. S. Habeebu, J. Liu, Y. Liu [et al.] // *Toxicol. Sci.* — 2000. — Vol. 55 — P.223 — 232.
4. Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats — P. an immunohistochemical study / S.E.Theocharis, A.P.Margeli, S.D.Skaltsas [et al.] // *Toxicology*. — 2001. — Vol. 161, № 1—2 — P. 129 — 138.
5. Exercise-induced metallothionein expression in human skeletal muscle fibres / M. Penkowa, P. Keller, C. Keller [et al.] // *Exp. Physiol.* — 2005. — Vol.90(4) — P. 477 — 486.
6. Sasagawa S. Stress-related induction of hepatic metallothionein synthesis and increase in peripheral polymorphonuclear leukocytes in mice. / S. Sasagawa, J. Matsubara, Y. Satow // *Immunopharmacol Immunotoxicol.* — 1993 — Vol. 15 (2-3) — P. 217 — 226.
7. Bell S.G. The metallothionein/thionein system: an oxidative metabolic zinc link /S. G. Bell, B. L. Vallee // *Chembiochem.* — 2009. — Vol. 10, N 1. — P. 55 — 62.
8. Шафран Л. М. Металлотионеины / Л. М. Шафран, Е. Г. Пыхтеева, Д. В. Большой — Под редакцией проф. Л.М. Шафрана — Одесса: Издательство "Чорномор'я", 2011. — 428 с.
9. Пыхтеева Е. Г. Сравнение методов количественного определения металлотионеина с атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной детекцией. / Е. Г. Пыхтеева, Д.В. Большой // *Здоровье и окружающая среда. Сборник научных трудов.* — Минск — 2011 — Выпуск 17. — С. 191 — 194.

Надійшла до редакції 16.01.2011