

ПОРІВНЯННЯ ТОКСИКОКІНЕТИКИ ТА ТОКСИКОДИНАМІКИ $CdCl_2$ ТА ЕКЗОГЕННОГО КОМПЛЕКСУ КАДМІЮ З МЕТАЛОТІОНЕЇНОМ ПРИ ІНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОМУ ВВЕДЕННІ ЛАБОРАТОРНИМ МИШАМ

О. Г. Пихтєєва, к.хім.н.

Український НДІ медицини транспорту МОЗ України, м. Одеса, Україна

РЕЗЮМЕ. В експерименті на лабораторних мишах при одноразовому введенні досліджені токсикокінетика і токсикодинаміка хлориду кадмію та комплексу кадмію з металотіонеїном (Cd7-MT). Показано, що при введенні цих сполук індуція синтезу MT у печінці та нирках, а також токсикокінетика і токсикодинаміка кадмію значно різняться. Доведено, що немає достатніх підстав вважати комплекс кадмію з металотіонеїном відповідальним за нефротоксичну дію. Вказано на необхідність проведення додаткових досліджень для вивчення різних аспектів впливу зв'язування металів з MT на клітинні механізми токсичної дії важких металів.

Ключові слова: металотіонеїн, кадмій, токсикокінетика

РЕЗЮМЕ. В експерименте на лабораторных мышах при однократном внутрив брюшном введении исследованы токсикокинетика и токсикодинамика хлорида кадмия и комплекса кадмия с металлотиионеином (Cd7-MT). Показано, что при введении этих соединений индукция синтеза MT в печени и почках, а также токсикокинетика и токсикодинамика кадмия значительно различаются. Доказано, что нет достаточных оснований считать комплекс кадмия с металлотиионеином ответственным за нефротоксическое действие. Указано на необходимость проведения дополнительных исследований для изучения различных аспектов влияния связывания металлов с MT на клеточные механизмы токсического действия тяжелых металлов.

Ключевые слова: металлотиионин, кадмий, токсикокинетика.

SUMMARY. Toxicokinetics and toxicodynamics of cadmium chloride and cadmium and metallothionein complex (Cd7-MT) was investigated during the experiment on laboratory animals (mice) in case of single intraperitoneal administration. It was shown that in case of administration of these compounds induction of MT synthesis in liver and kidneys and toxicokinetics and toxicodynamics also interorgan distribution of cadmium considerably differ. It was shown that banding of cadmium with MT plays a remarkable hepatoprotective part. A conclusion was made that the damaging effect in kidneys is caused by compounds of cadmium, which form in lysosomes after degradation of metalprotein complexes. There are not enough basements to consider cadmium and metallothionein complex responsible for nephrotoxic effect. The necessity of carrying out additional investigation for studying of different aspects of influence of banding of metals with MT on cellular mechanisms of toxic effect of heavy metals was pointed out.

Key words: metallothionein, cadmium, toxicokinetics and toxicodynamics

Протягом останніх двох десятиріч особливу увагу в токсикології важких металів привертає транспорт важких металів у біосистемах, в першу чергу його клітинні ланки [1]. Серед ключових білків клітинного металотранспорту одне з провідних місць посідають металотіонеїни (MT) [2, 3]. Цей транспортний білок відноситься до категорії не тільки найпоширеніших у тваринному і рослинному світі, а й міститься у представників видів, що мають різний історичний вік і знаходяться на різних еволюційних щаблях. Для членів сімейства металотіонеїнів характерне поєднання високого динамізму (адаптивності) з підвищеною стійкістю до зовнішніх впливів (термостабільність, здатність до зворотного окислення) [4].

Основна фізіологічна функція MT полягає в транспорті цинку, забезпеченні його гомеостазу та біодоступності у місцях синтезу ключових ферментів. Завдяки наявності у складі MT семи координаційних центрів, які здатні високоселективно зв'язувати іони d^{10} металів (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{+} , Ag^{+}), MT проявляє детоксикаційні властивості. Саме ці важкі метали є

основними індукторами синтезу MT [5].

Попри численні дослідження з проблеми MT, залишаються не до кінця з'ясованими механізми його антитоксичної дії, недостатньо вивчені питання токсикокінетики та токсикодинаміки металокомплексів цього білка з кадмієм.

Мета роботи. Вивчення особливостей та порівняння токсикокінетики та токсикодинаміки $CdCl_2$ та екзогенного комплексу кадмію з металотіонеїном при інтраперитонеальному введенні лабораторним мишам

Матеріали та методи

Експеримент проведено в лабораторії промислової та екологічної токсикології ДП «Український НДІ медицини транспорту». Лабораторних тварин одержували з віварію Одеського національного медичного університету, який обладнаний відповідно до існуючих санітарно-гігієнічних норм. Усіх дослідних тварин утримували в стандартних санітарних умовах при $t = 20-24^{\circ}C$, вологості 50–55 %, природному світловому режимі «день-ніч», на збалансованому харчовому раціоні відповідно

до діючих норм. Усі дослідження відповідали правилам «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей».

Дослідження проведені на статевозрілих безпородних мишах з вихідною масою 20-22 г. Для виділення МТ на першій стадії дослідження у щура вагою 300 г внутрішньочеревним (в/о) введенням хлориду кадмію в дозі 0,5 мг/кг (по солі) був викликаний індуктивний синтез МТ. За добу після введення $CdCl_2$ тварину виводили з експерименту під хлороформним наркозом та виділяли печінку, яку гомогенізували в попередньо стерилізованій біди-стильованій воді. З отриманого гомогенату виділяли низькомолекулярну білкову фракцію, що містить МТ, яку обробляли надлишком кадмію і витримували 1 годину для утворення комплексу Cd_7 -МТ (тобто до повного насичення). Потім надлишок кадмію видаляли співосадженням з карбонатом кальцію. В результаті отримали розчин, що містить комплекс Cd_7 -МТ. У аліквоті цього розчину визначили вміст кадмію, який становив 51,6 мкг/мл. Тварин утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до їжі та води, що попередньо досліджувались на вміст ВМ. У жодному випадку вміст Zn, Cu, Hg, Cd не виходив за межі допустимих значень у харчових продуктах згідно з МБТ «Медико-біологіческие требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов» [6] та ДсанПіН 2.2.4-171-10 "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною" [7]).

Результати та їхнє обговорення

Для вивчення токсикокінетики і токсикодинаміки розподілу кадмію та синтезу МТ при одноразовому інтраперитонеальному введенні був проведений наступний експеримент. Білі миші масою 18-20 г були поділені на 2 групи по 18 тварин у кожній. Тваринам першої групи одноразово в/о вводили кадмій у вигляді $CdCl_2$, другої – комплекс Cd_7 -МТ в однаковій дозі 0,25 мг/кг по металу. Три інтактні миші служили контролем. Тварин виводили з експерименту через 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 годин з дотриманням правил біоетики. У тварин виділяли печінку і нирки. У зв'язку з малими масами органів пробу по 3 тваринах усереднювали. В отриманій пробі визначали вміст кадмію та МТ. Залежність накопичення кадмію та концентрація МТ в органах представлена на рис. 1.

З рис. 1 видно, що вид кінетичної кривої розподілу кадмію в органах залежить від введеної сполуки. Дійсно, максимум вмісту кадмію

в нирках при введенні Cd_7 -МТ спостерігається значно раніше, ніж при введенні $CdCl_2$. У печінці спостерігається протилежна картина. Але, вже через 72 години різниця в концентраціях зменшується і тенденція до згладжування відмінностей зберігається через 120 годин.

Якщо вміст металів у органах-мішенях при одноразовому введенні проходить через максимум і має тенденцію до досить швидкого зниження, то кінетика синтезу МТ має дещо іншу картину (рис. 2). Так, у нирках спостерігається досить швидко (вже через 6, а особливо 12 годин) зростання концентрації МТ при введенні Cd_7 -МТ.

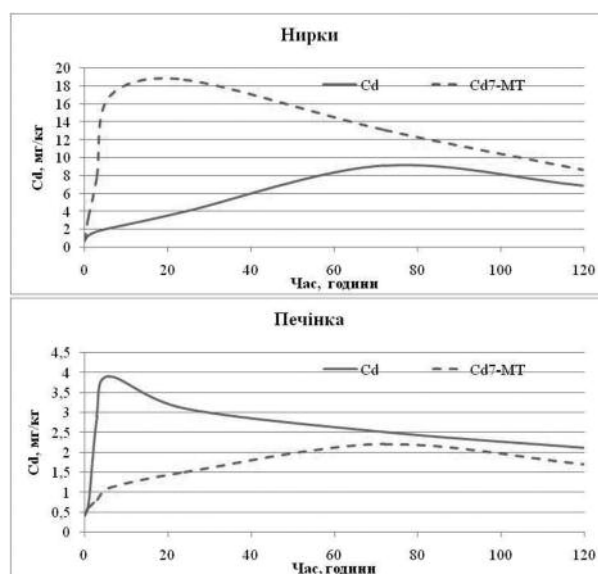


Рис. 1. Динаміка зміни концентрації кадмію в нирках та печінці при одноразовому в/о введенні кадмію білим мишам у вигляді $CdCl_2$ або Cd_7 -МТ у однаковій дозі 0,25 мг/кг по металу

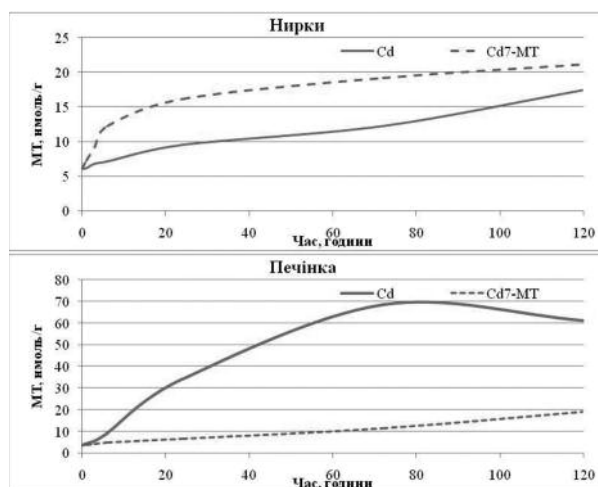


Рис. 2. Динаміка зміни концентрації МТ в нирках та печінці при одноразовому в/о введенні кадмію білим мишам у вигляді $CdCl_2$ або Cd_7 -МТ в однаковій дозі 0,25 мг/кг по металу

На жаль, наш метод визначення МТ не дозволяє розрізнити екзогенний і ендогенний МТ. Але розрахунок матеріального балансу з урахуванням припущення, що практично весь введений Cd_7 -МТ спрямовується для детоксикації в нирки, показує, що при цьому концентрація екзогенного МТ могла б досягати 32 нмоль/г. Однак навіть максимальна концентрація МТ у нирках незначно перевищує 20 нмоль/г, причому з цієї кількості слід відняти синтезований *de novo* у відповідь на надходження кадмію і присутній на базальному рівні МТ. Цей факт може свідчити про те, що поглинання комплексу Cd_7 -МТ з крові відбувається досить повільно. Можливо, це є однією з причин аномально довгого терміну напіввиведення кадмію з організму.

У той же час, як видно з рис. 2, в печінці активний синтез МТ при введенні $CdCl_2$ починається вже через 6 годин, досягаючи максимуму через 72 години.

У максимальній точці кінетичної кривої концентрація МТ перевищує первісну в 18,3 раза. Через 5 діб концентрація МТ у печінці незначно знижується, але зберігається на рівні 1640 % від вмісту МТ у печінці інтактних тварин. У той же час при введенні Cd_7 -МТ зростання концентрації МТ у печінці менш виражене, але тенденція до зростання зберігається і через 5 діб після введення. Ймовірно, при введенні комплексу Cd_7 -МТ, незважаючи на міцне зв'язування кадмію, частково відбувається перекомплексоутворення, а також розпад і деградація метало-білкового комплексу в лізосомах, що було показано нами в попередньому експерименті.

Оскільки раніше встановлено, що лізосомальний фермент КФ може бути маркером активації лізосом, вивчено кінетику зміни активності цього ферменту в нирках. Виявилось, що після одноразового в/о введення нефротоксичної дози кадмію 0,25 мг/кг, активність КФ у нирках проходить через максимум, причому положення цього максимуму залежить від сполуки кадмію. Так, вже через 6 годин після введення $CdCl_2$ спостерігається активація лізосомального апарату і до 24 годин відбувається достовірно (порівняно з контролем) зростання активності КФ у печінці. Проте вже через 72 години спостерігається зниження активності КФ, яке триває і через 120 годин, досягаючи 79 % базального рівня. При введенні Cd_7 -МТ у печінці зниження активності КФ з часом не спостерігається, а незначна (але достовірна порівняно з контролем) активація має місце через 72 години. У той же час у нирках через 24 години після вве-

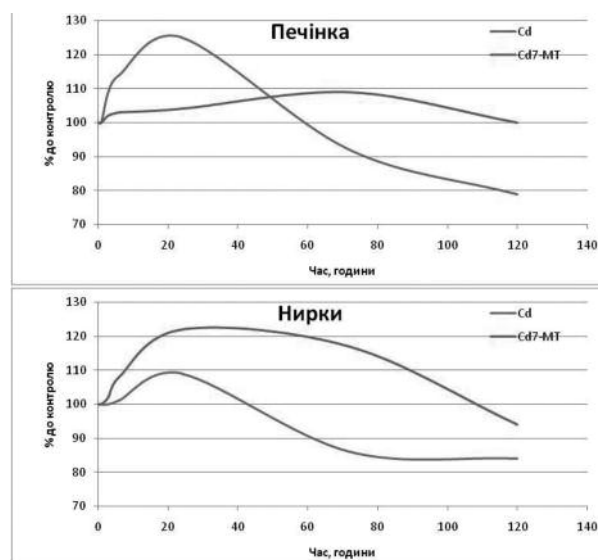


Рис. 3. Кінетика зміни активності кислій фосфатази в печінці та нирках після одноразового в/о введення кадмію білим мишам у вигляді $CdCl_2$ або Cd_7 -МТ в однаковій дозі 0,25 мг/кг по металу.

дення зростає активність КФ, ймовірно, викликане активацією первинних лізосом і збільшенням їх числа. Найбільше зростання відбувається при введенні Cd_7 -МТ (на 22% порівняно з контролем).

Через 72 години відбувається зниження активності КФ, більш виражене при введенні $CdCl_2$, ймовірно, за рахунок інгібування ферменту при утворенні металокомплексу з кадмієм в активному центрі та витіснення з нього цинку.

Таким чином, з проведених досліджень можна зробити наступні висновки:

1. Токсикокінетика та токсикодинаміка кадмію значно відрізняється при введенні неорганічної солі та екзогенного комплексу з металотіонеїном.

2. При введенні неорганічної солі максимальне зростання концентрації кадмію спостерігається в печінці, а при введенні комплексу Cd_7 -МТ – в нирках.

3. Утворення комплексу Cd_x -МТ носить помітну гепатопротекторну дію.

4. Поглинання комплексу Cd_7 -МТ з крові відбувається досить повільно. Можливо, це є однією з причин аномально тривалого періоду напіввиведення кадмію з організму.

5. З часом відбувається метаболізація сполук кадмію (зв'язування з транспортерами, розпад комплексів Cd_7 -МТ у лізосомах з утворенням відносно низькомолекулярних сполук тощо), що дозволяє спостерігати зниження різниці в накопиченні та токсичній дії кадмію через 5 діб після його введення у вигляді різних сполук.

ЛІТЕРАТУРА

1. Общая токсикология // Под ред. Б.А.Курляндского, В.А.Филова – М. Медицина, 2002 – 608 с.
2. *Foulkes E. C.* // Transport of Heavy Metals by the Kidney / E. C. Foulkes // *Toxicology Letters.* – 1990. – V. 53, № 1–2 – P. 29–31.
3. *Пыхтеева Е. Г.* Металлотионеин: биологические функции. Роль металлотионеина в транспорте металлов в организме / Е. Г. Пыхтеева // *Актуальные проблемы транспортной медицины.* – № 4 (18), 2009. – С. 44–58.
4. *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.
5. *Curtis D. Klaassen.* Induction of Metallothionein as an Adaptive Mechanism Affecting the Magnitude and Progression of Toxicological Injury / D. Curtis Klaassen and Jie Liu // *Environmental Health Perspectives* - 1998 - № 106, Suppl 1 – P. 297–300.
6. Збірник важливих офіційних матеріалів з санітарних і протиепідемічних питань. Видання офіційне: в 6 т. [Під загальною редакцією Головного державного санітарного лікаря України В.Ф.Марієвського]. Т. 1. Частина 2. Медико-біологічні вимоги до санітарних норм якості продовольства сировини та харчових продуктів. – Київ, 1995. – 246 с.
7. ДсанПіН 2.2.4-171-10 "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною".

Надійшла до редакції 1.07.2013 р.