

УДК 57.085.22

IN VITRO МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ КАДМИЯ НА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ПРИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА IN VIVO

Пыхтеева Е.Г., Потапов Е.А., Большой Д.В., Пыхтеева Е.Д.*

Украинский НИИ медицины транспорта, г.Одесса

*Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса

Ключевые слова: металлотионеин, эксперимент in vitro, эпителий тонкой кишки

Введение

Металлотионеин (МТН), более 50 лет тому назад обнаруженный и описанный В.L.Vallee с сотрудниками (1957) транспортер Cd и Zn [1], получил свое название в связи с высоким содержанием в нём металлов и серы [2]. Металлотионеины (МТН) относятся к многофункциональным низкомолекулярным белкам, индукция синтеза которых вызывается многими агентами химической (тяжелые металлы (ТМ), некоторые органические растворители) и физической (переохлаждение, перегревание) природы, а также голодом, психо-эмоциональным стрессом и др. Основная физиологическая роль МТН состоит в обеспечении гомеостаза цинка, транспорта его к местам синтеза цинксодержащих ферментов и регуляции практически всех цинк-зависимых процессов в организме, а также в участии в его антиоксидантной системе в роли регулятора активных форм кислорода и свободно-радикальных процессов за счет согласованного действия окисленных и восстановленных цистеиновых SH-групп (которых в МТН до 30). Подробно антиоксидантной роли МТН посвящен обзор [3].

Наиболее изучена индукция синтеза МТН при поступлении в организм d¹⁰-металлов (цинка, кадмия и ртути). Собственно говоря, МТН был открыт как металлотранспортный белок, и пристальное внимание к нему было связано прежде всего связано с его участием в обеспечении гомеостаза

цинка и детоксикации кадмия. Известно, что основным местом синтеза МТН в организме теплокровных является печень. По нашим и литературным (например, [4]) данным нарастание содержания МТН в печени увеличивается уже через несколько часов после внутрижелудочного введения соли кадмия и достигает максимума через 3 суток.

Поскольку всасывание введенных внутрижелудочно ТМ металлов происходит в кишечнике, предположение о повышении индукции синтеза МТН в эпителиальных клетках кишечника кажется нам достаточно обоснованным.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на белых нелинейных крысах массой 300-350 г, содержащихся на общевиварном рационе, которые были разделены на 3 группы по 3 животных. Животным первой группы ввели однократно внутрижелудочно ацетат цинка в дозе 50 мг/кг (по металлу), второй – хлорид кадмия в дозе 3,7 мг/кг (по металлу, 1/10 ЛД₅₀). Животным контрольной группы вводили воду, чтобы нивелировать влияние психо-эмоционального стресса на синтез МТН. Животных декапитировали под эфирным наркозом через 48 часов после введения, отбирали печень и тонкий кишечник, в которых определяли МТН по предложенной нами методике [4]. Кроме того у животных «цинковой» (I) и контрольной (III) групп отбирали тонкий кишечник для изучения *in vitro* влияния кадмия на эпителий тонкого кишечника после предвари-

тельной индукции МТН. Известно, что одним из основных органов-мишеней кадмия в организме выступат почки [5]. Учитывая тот факт, что прямое исследование влияния ксенобиотиков на эпителий почечных канальцев *in vivo* и *in vitro* технически очень сложно, мы заинтересовались возможностью экстраполирования результатов экспериментов на моделях с эпителием тонкого кишечника на процессы воздействия ксенобиотиков на эпителий почечных канальцев.

На методике последнего эксперимента остановимся подробнее. Общеизвестно [6], что однослойный призматический эпителий тонкого кишечника имеет значительное сходство с однослойным кубическим эпителием почечных канальцев. Для этого есть существенные основания. Выделительная система в процессе эмбриогенеза формируется из дивертикула первичной кишки и мезенхимальной бластемы. В связи с этим она отчасти сохраняет общий план строения, функционирования и регуляции, тесную взаимосвязь в норме и патологии, равно как и базовые положения развития патологического процесса. Сопоставив пищеварительную и мочевыделительную системы, можно отметить общую схему строения, наличие эпителия с щеточной каймой и со сходными транспортными системами, сходной регуляцией функции и пролиферации, общие физиологические и патологические процессы. Одной из оптимальных моделей, на наш взгляд, оказалась методика изолированных переживающих фрагментов тонкого кишечника. Важной составляющей успеха данного эксперимента является состояние лабораторных животных и условия их содержания.

Суть эксперимента заключается в том, что у лабораторной крысы после декапитирования быстро (в течение 1-2 мин.) извлекают тонкий отдел кишечника, делят его на фрагменты и перфузируют раствором Рингера-Локка (NaCl

9 г/л, KCl 4,2 г/л, CaCl₂ 2,4 г/л, NaHCO₃ 2 г/л, глюкоза 1 г/л). Он широко применяется в медицине, в физиологии для изучения деятельности тканей вне органов, для перфузии изолированных органов. Этот раствор изотоничен плазме крови животных. Т.к. pH содержимого тонкого кишечника в норме около 8, раствор был доведен до pH 8 частичной эквимольной заменой гидрокарбоната натрия карбонатом. Такой раствор обеспечивает функционирование эпителиальной ткани выделенного переживающего фрагмента выше указанного органа, так как имеет более "физиологический" состав, чем изотонический раствор натрия хлорида. Необходимо учитывать, что перфузия также влияет на эпителий тонкого кишечника и поэтому ее необходимо проводить очень осторожно, в щадящем режиме. На качество эксперимента большое влияние оказывает время, поэтому все предварительные манипуляции следует проводить максимально быстро, что обеспечивается слаженной командной работой исследователей, задействованных в эксперименте. Все фрагменты кишечника должны постоянно находиться в растворе Рингера-Локка с pH 8,0. На концы изолированных фрагментов накладываются лигатуры.

В полость изолированного фрагмента кишечника вводят 1 мл раствора Рингера-Локка с растворенным в нём тестируемым веществом, в нашем случае это хлорид кадмия с концентрацией 0,5 мг/л (по металлу). В полость контрольного фрагмента вводится чистый раствор Рингера-Локка. Заполненные фрагменты помещают в раствор Рингера-Локка и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 30 мин (рис. 1). Необходимо иметь в виду, что вводимое вещество и все растворы обязательно должны иметь температуру 37 °С, иначе условия содержания выделенных переживающих фрагментов тонкого кишечника будут нарушены.

После завершения экспозиции со-



Рис. 1. Эксперимент по *in vitro* экспозиции переживающих фрагментов тонкой кишки кадмием в концентрации 0,5 мг/л.

держимое фрагментов извлекают, 0,02 мл его помещают в пробирку с 0,05 мл изотонического раствора натрия хлорида, подкрашенного метиленовым синим. Растворы перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 10 мин, а затем подсчитывают клетки эпителия кишечника в камере Горяева. Кроме эпителиальных клеток, подсчитывают также количество лейкоцитов, мигрировавших в просвет тонкого кишечника.

Из фрагментов кишечника были выделены эпителиальные клетки и стенка, которые были проанализированы на содержание кадмия и цинка.

Результаты и их обсуждение

Измерение концентрации МТН

В фрагменте тонкой кишки, а также печени и почках интактных крыс и крыс «цинковой» и «кадмиевой» групп было определено интегральное содержание МТН методом замещения кадмием с АЭС-детектированием. Время экспозиции низкомолекулярной фракции гомогената тканей избытком кадмия – 1 час при комнатной температуре. Результаты эксперимента приведены в табл. 1.

При определении концентрации кадмия методом АЭС в спектрах образцов были обнаружены интенсивные пики цинка, что свидетельствует о неполном замещении его кадмием в МТН за 1 час. Были рассчитаны концентрации МТН по кадмию и цинку, исходя из литературных данных [7] о связывании 7 моль металлов на 1 моль МТН.

Из приведенных в таблице данных видно, что в печени, почках и эпителии тонкой кишки интактных животных содержится МТН, причем его концентрация в почках выше, чем в печени в 2 раза, хотя общее содержание в печени в 2,3 раза превышает таковое в почках из-за большей массы печени по сравнению с почками. Через 48 часов после введения цинка концентрация МТН в печени в 2,1, а общее содержание в 10 раз превышает таковые в почках, что свидетельствует о том, что именно пе-

Таблица 1

Среднее интегральное содержание МТН (мкмоль/кг) у крыс, n = 3

Образец	МТН, мкмоль/кг (нмоль/г)		
	По кадмию	По цинку	Всего
Контроль печень	1,7 ± 0,3	2,4 ± 0,4	4,1 ± 0,7
Контроль эпителий тонкой кишки	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,3	4,4 ± 0,8
Контроль почка	2,6 ± 0,5	5,9 ± 0,9	8,4 ± 1,1
Цинк печень	3,7 ± 0,6	25,4 ± 3,1	29,1 ± 3,2
Цинк эпителий тонкой кишки	2,0 ± 0,3	5,6 ± 1,3	7,6 ± 1,4
Цинк почка	5,6 ± 0,9	8,1 ± 1,1	13,7 ± 2,1
Кадмий печень	10,7 ± 2,4	8,1 ± 1,2	18,7 ± 2,8
Кадмий эпителий тонкой кишки	2,3 ± 0,4	1,7 ± 0,3	3,9 ± 0,6
Кадмий почки	2,7 ± 0,5	5,8 ± 1,0	8,5 ± 1,3

Таблица 2

Содержание цинка и кадмия в эпителии и стенке фрагментов тонкого кишечника после экспозиции *in vitro* CdCl₂ в концентрации 0,5 мг/л (контроль – раствор Рингера-Локка)

Образец	Суммарно, мг/кг		Эпителий, мг/кг		Стенка, мг/кг	
	Zn	Cd	Zn	Cd	Zn	Cd
«Контроль» Рингер	31,73 ± 6,1	0,037 ± 0,006	13,9 ± 2,9	0,019 ± 0,003	17,8 ± 3,3	0,018 ± 0,003
«Контроль» кадмий	61,42 ± 10,6	0,095 ± 0,013	29,0 ± 4,7	0,056 ± 0,011	32,5 ± 5,9	0,038 ± 0,004
«Цинк» Рингер	62,76 ± 10,6	0,054 ± 0,007	28,5 ± 4,9	0,037 ± 0,004	34,3 ± 5,7	0,017 ± 0,003
«Цинк» кадмий	94,53 ± 16,5	0,106 ± 0,018	66,8 ± 11,4	0,071 ± 0,013	27,7 ± 5,1	0,034 ± 0,005

жание в стенке кишечника и в эпителии, при этом в стенке содержание его было незначительно выше, чем в эпителии. Такая же тенденция имела место в кишке контрольной крысы без экспозиции и после экспозиции кадмием. Однако после экспозиции кишечника «цинковой» группы кадмием наблюдалось перераспределение цинка и кадмия в эпителиальные клетки из стенки кишечника. Это может

Таблица 3

Количество эпителиальных клеток и лейкоцитов в просвете тонкой кишки после экспозиции *in vitro* CdCl₂ в концентрации 0,5 мг/л (контроль – раствор Рингера-Локка)

	Количество эпителиальных клеток на 100 квадратов	Количество лейкоцитов на 100 квадратов
«Контроль» Рингер	78 ± 5	94 ± 5
«Контроль» кадмий	186 ± 21	153 ± 9
«Цинк» Рингер	104 ± 7	128 ± 9
«Цинк» кадмий	115 ± 6	134 ± 8

свидетельствовать о том, что общий для этих металлов транспортный белок МТН преимущественно находится в эпителиальных клетках, обеспечивая их защиту от повреждения, и препятствует проникновению токсичного металла в более глубокие ткани (рис. 2). Максимальная концентрация кадмия наблюдается в эпителии «цинковой» группы.

чень является местом наиболее быстрой индукции синтеза МТН. Интересно заметить, что предварительная экспозиция цинком вызывает рост концентрации МТН в эпителиальных клетках тонкой кишки в 1,72 раза, а достаточно высокая доза введенного кадмия (1/10 ЛД₅₀), напротив, частично ингибирует его синтез.

Защитное действие предварительной индукции МТН на тонкую кишку наглядно демонстрируют результаты цитологического исследования (табл. 3). Максимальное «сдувание» эпителиальных клеток наблюдалось при экспозиции кадмием интактного фрагмен-

Эксперимент с тонкой кишкой

Содержание металлов в эпителии и стенке кишечника значительно различалось (табл. 2)

Как видно из представленных в таблице данных, введение цинка *in vivo* примерно вдвое повышало его содер-

жания в стенке кишечника и в эпителии, при этом в стенке содержание его было незначительно выше, чем в эпителии. Такая же тенденция имела место в кишке контрольной крысы без экспозиции и после экспозиции кадмием. Однако после экспозиции кишечника «цинковой» группы кадмием наблюдалось перераспределение цинка и кадмия в эпителиальные клетки из стенки кишечника. Это может

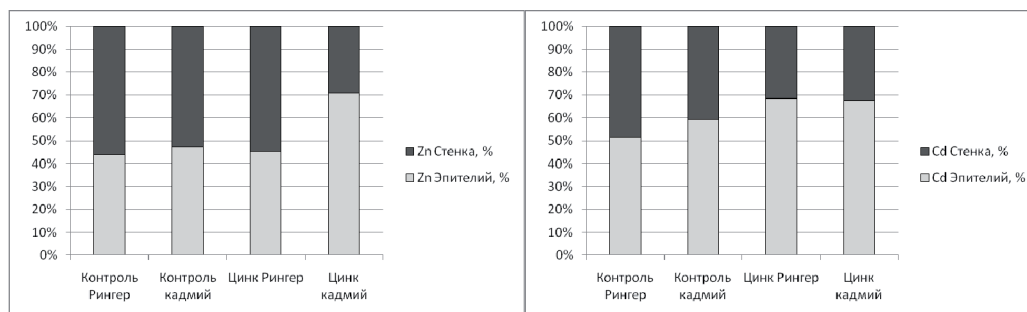


Рис. 2. Относительное содержание цинка и кадмия в эпителии и стенке фрагментов тонкого кишечника после экспозиции *in vitro* CdCl₂ в концентрации 0,5 мг/л (контроль – раствор Рингера-Локка)

та тонкой кишки. Предварительная индукция МТН *in vivo* понижала отслоение эпителиоцитов на 62 процента. Однако следует заметить, что само введение цинка в дозе 50 мг/кг влияет на состояние эпителиоцитов тонкой кишки, о чем свидетельствует большее, по сравнению с интактным кишечником, количество эпителиальных клеток и лейкоцитов в просвете фрагмента после выдерживания в течение 30 мин в растворе Рингера-Локка при 37°C, без экспозиции кадмием.

Выводы

1. В печени, почках и эпителии тонкой кишки интактных животных содержится МТН, причем его концентрация в почках выше, чем в печени.
2. Введение цинка в дозе 50 мг/кг (по металлу) вызывает индукцию синтеза МТН. Наиболее интенсивно этот процесс происходит в печени (рост в 7,1 раза). В почках рост концентрации МТН в 1,6 раза, в эпителии тонкой кишки – 1,73 раза.
3. Предварительная *in vivo* индукция МТН оказывает защитное действие на клетки эпителия тонкой кишки, что подтверждается результатами цитологических исследований.

Литература

1. Margoshes, M. and Vallee, B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex // J. Am. Chem. Soc., 1957. - Vol. 79. - P. 4813
2. Кдгі, J. H. R. and Vallee, B. L. Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex // J. Biol. Chem., 1961. - Vol. 236. - P. 2435–2442.
3. Пыхтеева Е.Г. Металлотионеин: биологические функции. 2. Роль металлотионеина в защите от оксидативного стресса / Е.Г. Пыхтеева / Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2010 - № 1 (19) - С. 114-120.

4. Пыхтеева Е. Г. Разработка нового метода определения валового содержания металлотионеина в печени крыс после предварительной индукции сульфатом цинка с использованием АЭС-ДА / Е. Г. Пыхтеева, Д.В. Большой, Е. С. Стужук / Бюллетень VIII чтений В.В. Подвысоцкого. - 2009 г. - С. 81-83.
5. Shafran L. M. Biomarkers of metalotoxicoses and metalosanogenesis / L. M. Shafran, D. — V. Bolshoy, E. G. Pichteeva [and all] // CEMEPE. Proceedings of SECOTOX Conference and the International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics. Skiathos, June 24-28 - 2007. - P. 273-274
6. Гистология [учебное пособие] / под ред. Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина – 5-е изд., перераб. и доп.. — М.: Медицина, 2002. — 744 с.
7. Metallothionein-determination in biological materials: interlaboratory comparison of 5 current methods. Dieter H.H., Myller L., Abel J., Summer K.H. - EXS - 1987 - V. 52 - P. 351-358

Резюме

IN VITRO МОДЕЛЮВАННЯ ДІЇ КАДМІЮ НА ЕПІТЕЛІАЛЬНІ КЛІТИНИ ПРИ ПОПЕРЕДНІЙ ІНДУКЦІЇ МЕТАЛЛОТІОНЕЇНУ *IN VIVO*

Пыхтеева О.Г., Потапов Є.А.,
Большой Д.В., Пыхтеева О.Д.

Показано, що попереднє введення *in vivo* цинку в дозі 50,0 міліграм/кг викликає індукцію металлотионеина в печінці, нирках і тонкому кишечнику щурів. Це надає захисну дію на клітки епітелію тонкого кишечника при дії на переживаючі фрагменти кадмієм *in vitro*, що підтверджується результатами цитологічних досліджень.

Ключові слова: металлотионеїн, дослід *in vitro*, епітелій тонкої кишки

Summary

IN VITRO MODELING OF CADMIUM ACTION IN EPITHELIAL CELLS AT PRE-INDUCTION OF METALLOTHIONEIN IN VIVO

Pykhtieieva E.G., Potapov E.A., Bolshoy D.V., Pykhtieieva E.D.

It is shown that in vivo pretreatment with zinc at a dose of 50.0 mg / kg causes an induction of metallothionein in liver, kidney and small intestine of rats. It renders the protective function to the

epithelium cells of small intestine survival fragments after the cadmium exposition *in vitro*, that is confirmed by the results of cytological researches.

Keywords: metallothionein, an experiment in vitro, the epithelium of the small intestine

Впервые поступила в редакцию 22.06.2011 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования

УДК 616.61-008.6

СОСТОЯНИЕ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ПОЧЕК ПРИ ВОДНО-СОЛЕВЫХ НАГРУЗКАХ

Лебедева Т.Л.

Украинский НИИ медицины транспорта, г. Одесса

Ключевые слова: белые крысы, водно-солевые нагрузки, почки, выведение воды и ионов

Введение

Регуляция водно-солевого гомеостаза относится к наиболее точным и быстро действующим механизмам поддержания постоянства внутренней среды организма. Основным эфферентным органом, обеспечивающим стабильность объема и состава внеклеточной жидкости за счет реализации осмо-, ионо-, волюмо- и кислоторегулирующих функций, являются почки [1, 2, 3]. Между тем, при водно-солевых нагрузках меняются как состав, так и объем жидкости, а взаимоотношения, которые возникают между основными гомеостатическими функциями исследованы недостаточно. В связи с этим, изучены особенности осмо-, волюмо- и кислоторегуляции при введении в организм крыс равных объемов различных по катионному составу солевых нагрузок.

Программа и методы исследования

Исследования проведены на 64 половозрелых самцах белых крыс, массой 180-250 г. Животные содержались в условиях вивария на стандартном пищевом

рационе при свободном доступе к воде. Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами Европейской конвенции о гуманном отношении к лабораторным животным [4]. Животным зондом в желудок вводили 1 М растворы хлоридов натрия, калия и аммония из расчета 20 мМ раствора на 1 кг массы тела. Через 1 час опытным и контрольным животным проводили водную нагрузку в количестве 5 % от массы тела. После проведения нагрузок животных помещали в индивидуальные «нагрузочные» клетки и собирали мочу в течение 2 часов. Диурез учитывали суммарно за 2 часа. В моче стандартными методами определяли концентрацию креатинина, натрия, калия и осмотически активных веществ (ОАВ), титруемых кислот и аммиака [5, 6]. По общепринятым формулам рассчитывали экскрецию этих веществ за 2 часа в пересчете на 1 кг массы тела, относительный диурез и относительное выведение катионов [7].

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования водо- и