

УДК 57.085.23

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ ПЕЧЕНИ КРЫС И ЕЕ РОЛИ В ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПОЗИЦИИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

**Пыхтеев Д.М. \*, Пыхтеева Е.Г. \*\*, Большой Д.В. \*\*, Самойленко Т. В. \*, Яременко Е.Н. \***

\* Биотехнологическая компания СМАРТСЕЛЛ, г. Одесса

\*\* Украинский НИИ медицины транспорта, г. Одесса

В эксперименте на культуре фибробластов фетальной печени крыс методом Real time PCR показано, что при введении в культуру хлорида цинка до конечных концентраций в культуральной среде 0,51; 1,53 и 5,09 мкмоль/л, уже через час регистрируется экспрессия генов металлотиионеина МТ-1а и МТ-2. Экспрессия максимальна при концентрации 1,53 мкмоль/л. Предварительная индукция синтеза металлотиионеина повышает выживаемость клеток при введении в культуральную среду солей тяжелых металлов ( $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ;  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ ;  $\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2$ ;  $\text{CdSO}_4$ ). Защита максимально эффективна при действии солей кадмия и ртути и зависит от количества предварительно введенного цинка. Наименее токсичным оказалась соль  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ , при действии которой протекторного действия металлотиионеина не наблюдали, вероятно, из-за различия в механизмах транспорта  $\text{Eu}^{3+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ .

*Ключевые слова:* металлотиионеин, экспрессия генов, культура фибробластов фетальной печени крыс.

В последние десятилетия в научном мире растет интерес к изучению биохимических механизмов действия экзогенных и эндогенных соединений в опытах *in vitro*. Кроме безусловно важных вопросов биоэтики [1], росту количества и качества таких исследований способствуют развитие молекулярной биологии и геномной инженерии, которые предоставляют принципиальную возможность получать культуры клеток с заданными свойствами. Кроме того, использование различных моделей в опытах *in vitro* позволяет раскрыть механизмы процессов, которые часто невозможно исследовать и выделить в условиях *in vivo* [2, 3].

Живые организмы представляют собой чрезвычайно сложные функциональные системы, состоящие из многих десятков тысяч генов, белковых молекул, молекул РНК, небольших органических

соединений, неорганических ионов и комплексов, которые в органах и системах многоклеточного организма пространственно компартментализованы с помощью мембран. Чрезвычайная сложность живых организмов часто является барьером для идентификации отдельных компонентов и исследования их основных биологических функций. Основное преимущество работы *in vitro* заключается в том, что она позволяет упростить изучаемую систему, давая возможность сосредоточить внимание на небольшом количестве компонентов [4, 5].

В то же время, такое упрощение системы приводит к тому, что опыты *in vitro* имеют ряд существенных ограничений. Основным недостатком таких опытов является сложность экстраполяции полученных *in vitro* результатов на организм в целом, что при интерпретации

результатов, иногда может привести к ошибочным выводам о действии исследуемого вещества на уровне организма [6]. Поскольку мы хорошо понимаем, что живой организм в целом не является механической суммой составляющих его частей, и подходим к интерпретации наших опытов *in vitro* с диалектических позиций, мы рассматриваем эти опыты как этап изучения отделенной части системы, который позволит упростить и конкретизировать объект исследования, а также существенно уменьшить влияние посторонних факторов на изменение показателей в результате действия исследуемого вещества. Мы считаем, что при таком подходе использование опытов *in vitro* для выяснения некоторых конкретных механизмов взаимодействия веществ на молекулярном и клеточном уровне является биологически и экономически обоснованным.

Известно [7], что для металлотионеина (МТ) основным местом синтеза является печень, объектом исследования стала культура фетальных фибробластов печеночной ткани крыс. **Целью** нашего исследования было сравнительное изучение дозозависимой экспрессии генов МТ-1а и МТ-2 через 1 час после введения хлорида цинка, а также влияния роста концентрации МТ на выживаемость клеток при действии солей токсичных тяжелых металлов.

#### Материалы и методы

Культуру первичную культуру фетальных фибробластов получали из печени шестнадцатидневного плода крысы по общепринятому протоколу [8-11].

Для работы были использованы следующие реактивы:

1. DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) фосфатный буферный солевой раствор Дульбекко.

2. Ростовая среда: питательная среда DMEM/F12 500 мл — заменитель сыворотки Panexin NTA PAN Biotech, 50 мл, раствор амфотерицина В, 1 мкг/мл аликвоты 0,5 мг/мл, основной фактор роста

фибробластов (bFGF), рекомбинантный, 2 нг/мл аликвоты 1 мкг/мл, раствор гентамицина сульфата, 60 мкг/мл, 1 ампула/2 мл 4 % раствора, 200 мМ раствор L-глутамина; аликвоты в 1 мл раствора Хэнкса.

Все манипуляции с биопсийным материалом, культуральными средами и растворами, а также культурами клеток проводили в стерильных условиях в ламинарном боксе. Клеточные культуры в культуральных флаконах инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 ± 0,5°C, содержании CO<sub>2</sub> 5 % и влажности 93-98 %.

Растворы тяжелых металлов приготовлены путем взвешивания соответствующих солей с растворением в бидистиллированной воде, подкисленной уксусной кислотой до pH 5,0 для снижения гидролиза. Перед введением в культуральную среду все растворы стерилизовали.

На первой стадии эксперимента была проведена индукция МТ введением в культуру хлорида цинка. Конечная концентрация хлорида цинка в культуральной среде была подобрана в серии предварительных экспериментов таким образом, чтобы она при максимально возможной концентрации вызывала гибель или изменения морфологии не более 15 % клеток. Конечные концентрации Zn<sup>2+</sup> в культуральной среде составили 0,51; 1,53 и 5,09 мкмоль/л.

На второй стадии в культуральную среду вводили разные дозы солей МТ через сутки после обработки культуры цинком и изучали влияние предварительной индукции МТ на состояние клеток после токсичного действия МТ.

Для оценки экспрессии гена МТ-1а и МТ-2 через 1 час после введения цинка в культуральную среду использовали метод количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР реального времени) на системе «Quantitect SYBR green» (Qiagen) по методике изложенной Brettingham-Moore et al. [12].

Для выделения РНК использовали ультрачистую дистиллированную воду («Gibco-Invitrogen»), реагент для выделения РНК («TRIzol Reagent», cat no: 15596-018. Invitrogen), дважды перегнанный хлороформ, 75 % этанол, 2-пропанол. Использовали реактивы квалификации «ос.ч.» и следующее оборудование и приборы: охлаждающая центрифуга, микропипетор, съемные наконечники на 10, 20, 200, 1000 мкл, микроцентрифуга «Вортекс», пробирки для центрифугирования свободные от ДНК, РНК, РНК-азы (стерилизуются в автоклаве при 120 °С, 20 мин), спектрофотометр NanoDrop.

Клетки, растущие в монослое, промывали один раз PBS. Снятие клеток с поверхности планшета проводили по методике, описанной выше. Перед добавлением реагента для выделения РНК (Тризол) осадок после центрифугирования тщательно пипетировали. Использовали 1 мл реагента для выделения РНК на  $(5-10) \times 10^6$  клеток. Инкубировали гомогенизированную пробу в течение 5-10 мин. при комнатной температуре для полной диссоциации нуклеопротеинового комплекса, затем добавляли 0,2 мл хлороформа на 1 мл тризоля, тщательно перемешивали на вортексе в течение 15 сек и инкубировали при комнатной температуре 2-3 мин. Центрифугировали пробу при 12000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С. При центрифугировании смесь разделяется на верхнюю водную фазу, интерфазу, и хлороформ-феноловый раствор (внизу). Водную фазу тщательно переносили в чистую стерильную пробирку.

Осаждение РНК из водной фазы проводили добавлением 0,5 мл изопропанола на 1 мл тризоля. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре, а затем центрифугировали при скорости не выше 12000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. После центрифугирования полностью удаляли супернатант, промывали осадок РНК 75 % этанолом, перемешивали на вортексе и центрифугировали в течение 5 минут при 4 °С (7500g), после чего

полностью удаляли этанол.

Осадок РНК в пробирке помещали в вакуумный эксикатор, подсушивали 5-10 мин., после чего растворяли осадок РНК в 10-20 мкл ультрачистой дистиллированной воды. Определяли концентрацию РНК в 1 мкл полученного раствора спектрофотометрическим методом на спектрофотометре NanoDrop и хранили до момента ПЦР-анализа в замороженном виде при -80 °С. Отсутствие примесей ДНК в выделенной РНК доказывали гель-электрофорезом в денатурирующих условиях. Перед проведением электрофореза пробирки с РНК размораживали в ледяной бане. Готовили раствор РНК разведением ультрачистой водой до конечной концентрации 1000 нг/мкл. В качестве контрольной РНК были использованы коммерческие препараты РНК «RNA Mouse Brain from "Zyagen"» (кат. номер MR-201-D1), и «RNA Mouse Heart from "Zyagen"» (кат. Номер: MR-801-H1) (<http://zyagen.com>).

Перед внесением в лунку электрофоретического геля, 1 мкл полученной и разведенной до 1000 нг/мкл РНК смешивали с 4 мкл ультрачистой воды и добавляли 5 мкл «2X RNA Load Buffer» Thermo Scientific™ производства компании Thermo Inc., прогревали при 70 °С в течение 10 мин, быстро охлаждали во льду и наносили в лунку агарозного геля для электрофореза по 10 мкл/лунку.

Электрофорез проводили при напряжении 45 В, в 1 % агарозе с добавлением бромистого этидия как подкрашивающего флуорофора в количестве 10 мкл/100 мл геля. Буфер 1xTAE, pH 8,0 был использован как для приготовления геля, так и как электродный. Время прохождения электрофореза 2 часа. После окончания электрофореза гель снимали и переносили в УФ-камеру для записи электрофореграммы.

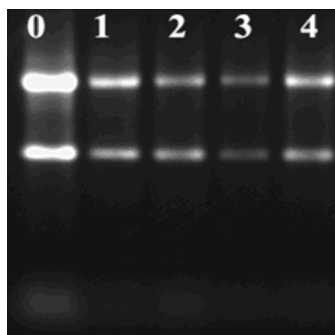
На рис 1 представлена фореграмма РНК, выделенной из клеточных культур после внесения солей ТМ в культуральную среду. Из фореграммы видно, что примесей ДНК в представленных об-

разцах не обнаружено.

Молекулярный дизайн олигонуклеотидных праймеров проведен с использованием материалов базы данных National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) в программе BLAST-PRIMER. Гены MT-1 и MT-2а крыс находятся в 19 хромосоме. С помощью программного обеспечения сайта предложено по 5 возможных олигонуклеотидных праймеров для MT-1а и MT-2а. Исходя из поставленных задач, нами были выбраны праймеры с минимальным размером. Олигонуклеотидные последовательности и данные праймеров представлены на рис. 2.

В качестве внутреннего контроля для стандартизации полученных данных был использован «домашний ген» мРНК в-актина, присутствующий в данном типе клеток, относительно которого проводили измерение генов MT-1 и MT-2 [13], поскольку мРНК в-актина не изменяется при введении цинка в культуральную среду. Синтез праймеров заказан и проведен в Научно-производственной компании СИНТОЛ (Москва, Россия). Стандартные кривые для MT-1 и MT-2 генов были получены с использованием известных конечных количеств каждого ПЦР продукта, которые затем были использованы для определения количества копий исходной коллинеарной ДНК на основании измерения пороговой величины флуоресценции ( $C_T$ ).

Поскольку кинетика накопления ампликонов в ходе Real time PCR напрямую зависит от числа копий исследуемой матрицы, это позволяет проводить коли-



№ трека	Название образца	
0	MR-201-D1	
1	Концентрация $Zn^{2+}$	0; контроль
2	в культуральной среде, мкмоль/л	0,51
3		1,53
4		5,09

Рис. 1. Электрофореграмма выделенной РНК после обработки культур хлоридом цинка в соответствующей концентрации

A	Primer pair 1								
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
	Forward primer	CGTGTGCCCCAGTTTCTTA	Plus	20	11277083	11277102	60.32	55.00	2.00
	Reverse primer	CCAACTCAGAGCTTGGCGT	Minus	20	11277221	11277202	59.97	55.00	7.00
	Product length	138							

B	Primer pair 1								
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
	Forward primer	CTGCCAGCCCCATTTTCCA	Plus	20	11283048	11283067	60.03	55.00	5.00
	Reverse primer	TCTCGCTCAGCCTCAACTT	Minus	20	11283349	11283330	59.97	50.00	3.00
	Product length	302							

B	Primer pair 3								
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
	Forward primer	GGATAGTGTCCACAAGGGCG	Plus	20	15745542	15745561	60.46	60.00	5.00
	Reverse primer	TGAAGAGTTTGGCGATGGGT	Minus	20	15745618	15745599	59.60	50.00	2.00
	Product length	77							

Рис. 2. Данные о выбранных олигонуклеотидных праймерах для определения MT-1а (А) и MT-2 (Б) и β-актина (В) методом Real time PCR.

чественные измерения мРНК MT [14]. Программа амплификации была следующей: денатурация (95°C — 10 мин.), затем амплификация и отжиг, со снятием количественных показателей (92°C — 15 с., 60°C — 1 мин., с записью интенсивности флуоресценции). Всего было проведено 35 таких циклов. Относительная флуоресцентная единица (RFU) измерения снималась на 3-7 циклах, и эта величина использовалась как значение в точке отсчета, которое вычиталось из полученных значений для всех остальных измерений. В данных измерениях мы выбрали величину  $C_T$  как 0,01 RFU.

### Результаты и их обсуждение

На рис. 3 представлены примеры стандартных кривых амплификации генов MT-1 и MT-2 по данным Real time PCR. Чем больше концентрация соответствующего мРНК в пробе, тем меньшее количество циклов требуется для появления соответствующей кривой.

Появление продукта PCR наблюдалось с 25 цикла амплификации при концентрации цинка в культуральной среде 1,53 мкмоль/л. Данные Real time PCR (табл. 1) показывают, что через 1 час

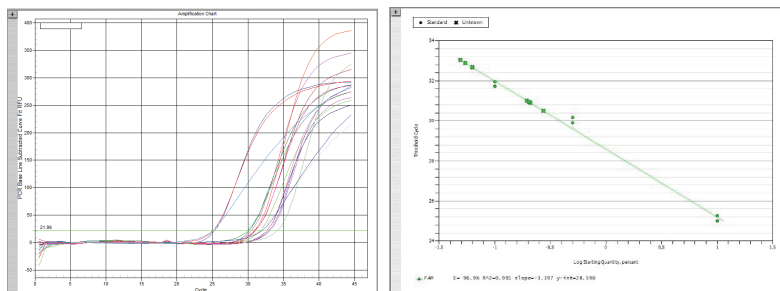


Рис. 3. Пример стандартных кривых амплификации генов MT-1 и MT-2 и полученный в процессе амплификации калибровочный график по данным Real time PCR в образцах клеточной культуры фибробластов печени крыс при действии различных концентраций цинка.

Таблица 1

Экспрессия генов MT-1 и MT-2 в клеточной культуре фибробластов печени крыс через 1 час после экспозиции хлоридом цинка, (по данным Real time PCR\*)

		Экспрессия генов MT-1 и MT-2, относительно контроля	
		MT-1a	MT-2
Дополнительно созданная концентрация Zn <sup>2+</sup> в культуральной среде, мкмоль/л	0; контроль	1,0	1,0
	0,51	2,16	2,99
	1,53	4,12	5,13
	5,09	3,88	4,95

Примечание: количественные показатели рассчитаны автоматически с помощью программы прибора. Данные приведены относительно интактного контроля.

после введения цинка в культуральную среду имеет место экспрессия генов MT-1 и MT-2, которая зависит от концентрации цинка в культуральной среде и носит фазовый характер. При этом экспрессия генов MT-1a и MT-2 происходит одновременно, однако интенсивность этого процесса выше для MT-2.

Наиболее сильный рост наблюдается при концентрации цинка 1,53 мкмоль/л. Возможно, при более высокой концентрации (5,09 мкмоль/л) включаются механизмы блокирования проникновения Zn<sup>2+</sup> в клетку и активируются процессы его выведения. Известно, что за поддержание гомеостаза цинка в клетке отвечает большое количество белков, которые вовлечены в транспорт и буферизацию Zn<sup>2+</sup>, среди них, по крайней мере десять членов семейства ZnT (Zn<sup>2+</sup>-транспортер) [15], 15 членов семейства ZIP (например, Zn<sup>2+</sup>-регулируемый металлотранспортер, семейство SLC39 (подсемейство семейства ZIP) железо-регулируемый металло-

транспортероподобный белок) [16]. Многие транспортные белки из семейства ZIP-транспортеров включаются в клеточный обмен цинка. Так транспортер Zrt3 в *S. cerevisiae*, транспортирует цинк во внутриклеточную область в процессе адаптации к дефициту цинка. Напротив, члены семейства CDF обеспечивают выход цинка из клетки или способствуют транспортировке цинка во внутриклеточные компартменты для хранения, детоксикации и/или выведения. Мы считаем,

что различные изоформы металлотионеина — не связанного с мембранами подвижного белка — отвечают в клетке за внутриклеточный транспорт цинка между клеточными компартментами, т.е. играют роль, близкую к роли шаперонов в транспорте меди.

Таким образом, проведенный эксперимент подтвердил, что введение ионов Zn<sup>2+</sup> в культуральную среду уже через 1 час вызывает экспрессию генов MT, которая приводит к росту концентрации MT в клетках.

Для выяснения протекторной роли MT при действии на клеточную культуру солей токсичных тяжелых металлов (ТМ) нами был проведен следующий эксперимент.

Клеточная культура была культивирована в 96-луночном планшете. В часть лунок был введен хлорид цинка в разных концентрациях для индукции синтеза MT. Через сутки после введения Zn<sup>2+</sup> в лунки в соответствии с прописью, представлен-

Таблица 2

**Зависимость количества живых клеток в культуре фибробластов печени крыс после обработки солями ТМ от предыдущей индукции МТ (в % к общему количеству клеток)\***

Группа	0 Zn <sup>2+</sup> , 0 ТМ <sup>2+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 0,13 Hg <sup>2+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 0,36 Hg <sup>2+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 1,26 Hg <sup>2+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 0,13 Cd <sup>2+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 0,36 Cd <sup>2+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 1,26 Cd <sup>2+</sup>
% живых клеток	98,3 ± 1,1	8,2 ± 0,9	0	0	5,3 ± 1,1	0	0
Группа		0 Zn <sup>2+</sup> , 1,09 Pb <sup>2+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 3,28 Pb <sup>2+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 10,92 Pb <sup>2+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 1,73 Eu <sup>3+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 5,18 Eu <sup>3+</sup>	0 Zn <sup>2+</sup> , 17,27 Eu <sup>3+</sup>
% живых клеток		39,4 ± 2,8	25,7 ± 3,1	12,4 ± 1,2	98,7 ± 1,7	97,3 ± 1,4	92,5 ± 1,9
Группа	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 0 ТМ <sup>2+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 0,13 Hg <sup>2+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 0,36 Hg <sup>2+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 1,26 Hg <sup>2+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 0,13 Cd <sup>2+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 0,36 Cd <sup>2+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 1,26 Cd <sup>2+</sup>
% живых клеток	97,1 ± 1,1	38,5 ± 3,2	28,7 ± 2,9	4,3 ± 1,5	43,1 ± 2,7	36,1 ± 2,9	6,1 ± 1,1
Группа		0,51 Zn <sup>2+</sup> , 1,09 Pb <sup>2+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 3,28 Pb <sup>2+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 10,92 Pb <sup>2+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 1,73 Eu <sup>3+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 5,18 Eu <sup>3+</sup>	0,51 Zn <sup>2+</sup> , 17,27 Eu <sup>3+</sup>
% живых клеток		43,2 ± 3,1	32,6 ± 2,4	16,7 ± 1,9	96,3 ± 1,9	92,3 ± 2,4	89,7 ± 3,1
Группа	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 0 ТМ <sup>2+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 0,13 Hg <sup>2+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 0,36 Hg <sup>2+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 1,26 Hg <sup>2+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 0,13 Cd <sup>2+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 0,36 Cd <sup>2+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 1,26 Cd <sup>2+</sup>
% живых клеток	88,6 ± 2,8	47,4 ± 2,9	30,9 ± 2,6	12,7 ± 1,8	54,5 ± 3,4	40,8 ± 3,1	9,1 ± 1,3
Группа		1,53 Zn <sup>2+</sup> , 1,09 Pb <sup>2+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 3,28 Pb <sup>2+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 10,92 Pb <sup>2+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 1,73 Eu <sup>3+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 5,18 Eu <sup>3+</sup>	1,53 Zn <sup>2+</sup> , 17,27 Eu <sup>3+</sup>
% живых клеток		41,0 ± 2,8	31,7 ± 2,2	11,7 ± 1,9	85,7 ± 1,8	81,1 ± 1,9	77,4 ± 2,2
Группа	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 0 ТМ <sup>2+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 0,13 Hg <sup>2+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 0,36 Hg <sup>2+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 1,26 Hg <sup>2+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 0,13 Cd <sup>2+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 0,36 Cd <sup>2+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 1,26 Cd <sup>2+</sup>
% живых клеток	83,4 ± 2,1	39,1 ± 3,1	19,2 ± 2,7	1,7 ± 0,8	53,5 ± 3,3	34,7 ± 2,4	2,1 ± 0,8
Группа		5,09 Zn <sup>2+</sup> , 1,09 Pb <sup>2+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 3,28 Pb <sup>2+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 10,92 Pb <sup>2+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 1,73 Eu <sup>3+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 5,18 Eu <sup>3+</sup>	5,09 Zn <sup>2+</sup> , 17,27 Eu <sup>3+</sup>
% живых клеток		33,0 ± 3,5	24,1 ± 2,9	3,7 ± 0,9	79,9 ± 2,1	76,1 ± 2,9	72,4 ± 2,5

\* Название группы – концентрация соответствующих ионов ТМ в культуральной среде, мкмоль/л

ной в табл. 2, вводили соли ТМ. Таким образом, изучали влияние предварительной индукции МТ разными дозами цинка на токсическое действие солей ТМ. В качестве контроля к каждой серии использовали клеточные культуры, в которые цинк не вводили, т.е. содержание МТ в этих клетках находилось на базальном уровне.

Через 24 часа проводили микроскопическое изучение цитологических препаратов, а также культуральной взвеси клеток с подсчетом количества живых клеток методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре Attune производства "Life Technologies".

Количество живых клеток в каждой лунке (усредненное по данным 3 параллельных экспериментов, в % к общему количеству клеток) приведено в табл. 2

Из анализа данных табл. 2 можно сделать ряд выводов. Во-первых, без предварительной индукции МТ кадмий оказывается более токсичным, чем ртуть. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными Beattie J.H. et al. [17] в схожем эксперименте. Во-вторых, индукция МТ путем предварительного введения цинка в культуральную среду защищает клетки от воздействия кадмия и ртути неодинаково. Хотя количество живых клеток на фоне цинка при всех действующих концентрациях Hg<sup>2+</sup> и Cd<sup>2+</sup> достоверно выше, чем в группе без введения цинка (p < 0,01), защита МТ от

воздействия кадмия достоверно более эффективна, чем от воздействия ртути (p < 0,01 при сравнении соответствующих проб с одинаковыми концентрациями цинка и токсичного ТМ).

В-третьих, Pb<sup>2+</sup> гораздо менее токсичен для клеточной культуры, чем Hg<sup>2+</sup> и Cd<sup>2+</sup>, а эффективность защиты при предварительном введении цинка ниже, хотя выживаемость клеток повышается на 8-10 %. Вероятно, защитный эффект предварительного введения цинка является суперпозицией как минимум двух факторов: во-первых, поскольку избыток цинка не менее опасен для клеток млекопитающих, чем недостаток [18], в предварительно насыщенной цинком клетке инактивируются высокоспецифичные мембранные металлтранспортеры, обеспечивающие поступление Zn<sup>2+</sup> в клетку (семейство Zip) и активируются транспортеры, обеспечивающие его вы-

ведение (семейство ZnT). Семейства ZnT и Zip транспортеров демонстрируют уникальную тканеспецифическую экспрессию, дифференциальное реагирование на дефицит или избыток цинка в диете, а также физиологические стимулы с помощью гормонов и цитокинов. Кроме того, инактивируется транспортер DMT1 (Транспортер двухвалентных металлов 1), который осуществляет перенос ионов железа, цинка, меди, марганца и кобальта, свинца и кадмия через мембрану по механизму, связанному с транспортом протонов [19]. Деятельность этих транспортеров регулируется в ответ на концентрацию цинка по транскрипционному и пост-транскрипционному механизму поддержания гомеостаза цинка как на клеточном, так и на организменном уровнях [20]. Поскольку мы считаем, для транспорта свинца в клетку используются транспортные пути эссенциальных металлов, инактивация этих транспортеров и снижение их количества затрудняют проникновение Pb<sup>2+</sup> внутрь клеток, соответственно снижая его токсическое действие. Во-вторых, играет место кинетический фактор при конкурентном взаимодействии Pb<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> с молекулярными рецепторами, определяющий большую скорость связывания Zn<sup>2+</sup> с рецепто-

ром в силу более высокой его концентрации в соответствии с уравнением

$$v_{Zn^{2+}-pec.} = k_1 \cdot [C_{Zn^{2+}}] \cdot [C_{pec.}]$$

$$v_{Pb^{2+}-pec.} = k_2 \cdot [C_{Pb^{2+}}] \cdot [C_{pec.}]$$

$$\frac{v_{Zn^{2+}-pec.}}{v_{Pb^{2+}-pec.}} = \frac{k_1 \cdot [C_{Zn^{2+}}] \cdot [C_{pec.}]}{k_2 \cdot [C_{Pb^{2+}}] \cdot [C_{pec.}]} = k \frac{[C_{Zn^{2+}}]}{[C_{Pb^{2+}}]}$$

Где  $C_{Zn^{2+}}$  и  $C_{Pb^{2+}}$  — соответствующие локальные молярные концентрации вблизи рецептора,  $k_1$  и  $k_2$  — соответ-

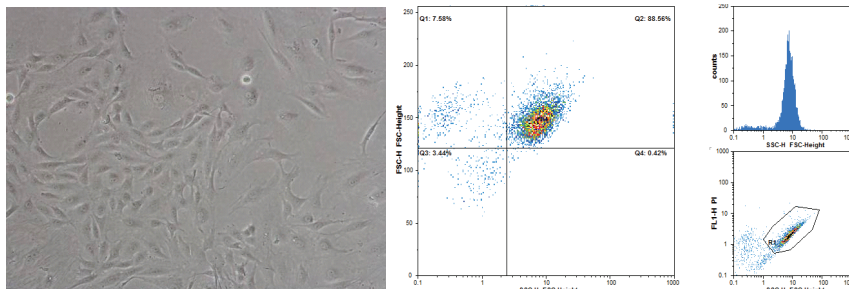


Рис. 4. Микрофотография клеточной культуры (Ув. x 200) и результаты проточной цитофлуориметрии фибробластов фетальной печени крысы через 24 часа после добавления в культуральную среду раствора цинка до концентрации 1,53 мкмоль.

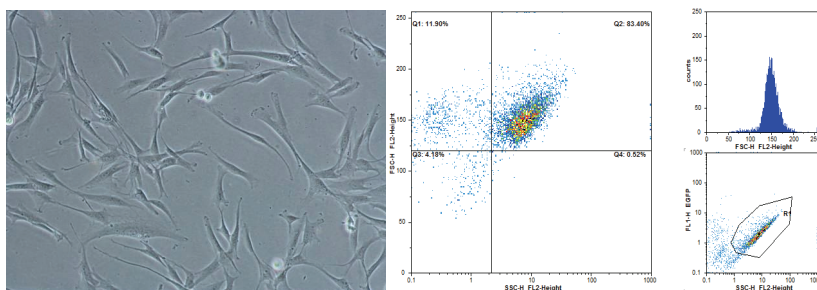


Рис. 5. Микрофотография клеточной культуры (Ув. x 200) и результаты проточной цитофлуориметрии фибробластов фетальной печени крысы через 24 часа после добавления в культуральную среду раствора цинка до концентрации 5,09 мкмоль/л.

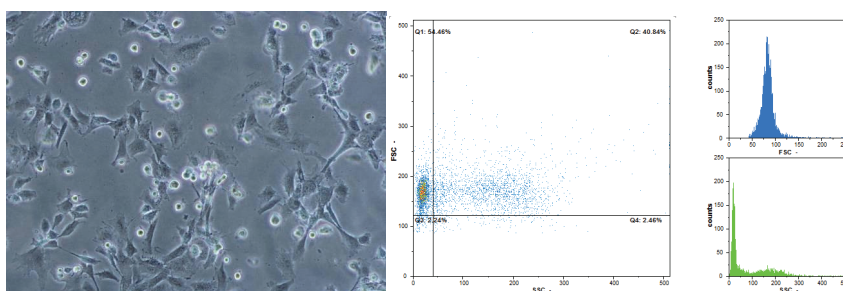


Рис. 6. Микрофотография клеточной культуры (ув. x 200) и данные проточной цитофлуориметрии после культивирования фибробластов в течение 24 часов в присутствии сульфата кадмия в концентрации 0,36 мкмоль/л на фоне введенного в культуральную среду хлорида цинка в концентрации 1,53 мкмоль/л.

ствующие константы скорости связывания  $Zn^{2+}$  и  $Pb^{2+}$  с рецептором.

По сравнению с концепцией механизма токсичности ТМ, определяемой блокированием сульфгидрильных групп белков [21], современная концепция дополнительно учитывает общность транспортных путей, опосредованное влияние на генетический аппарат клеток, а также конкурентные взаимодействия между эссенциальными и токсичными металлами при связывании с рецепторами.

Наиболее показательные микрофотографии и скактограммы клеточных культур приведены на следующих рисунках.

На рис. 4 показана фотография клеточной культуры после добавления в культуральную среду хлорида цинка до концентрации 1,53 мкмоль/л.

Как видно из рисунка 4, количество живых клеток составляет 88,6 %.

При введении более высокой концентрации цинка количество живых клеток немного уменьшается, и составляет 83,4 %, что хорошо видно на рисунке 5.

В то же время, через 24 часа после добавления сульфата кадмия, на фоне введенного ранее хлорида цинка характер скактограммы меняется. Наблюдается уменьшение количества живых клеток, их форма и размер меняются. Общее содержание

живых клеток по данным проточной цитофлуориметрии составляет (см. рис. 6) – 40,84 %.

Культивирование клеток в присутствии сульфата кадмия, без предварительной обработки сульфатом цинка приводит к гибели клеток (см. рис. 7, табл. 2).

Приблизительно такой же результат наблюдается в случае культивирования клеток в присутствии ацетата ртути, без предварительной обработки клеток сульфатом цинка.

Как видно из рис. 8, практически все клетки погибли, подверглись некро-

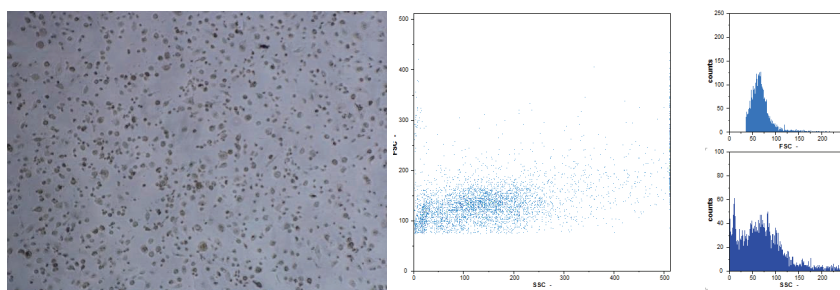


Рис. 7. Микрофотография клеточной культуры (Ув. x 200) и данные проточной цитофлуориметрии культивирования фибробластов через 24 часа после добавления в ростовую среду сульфата кадмия в концентрации 0,32 мкмоль/л без предварительной обработки сульфатом цинка.

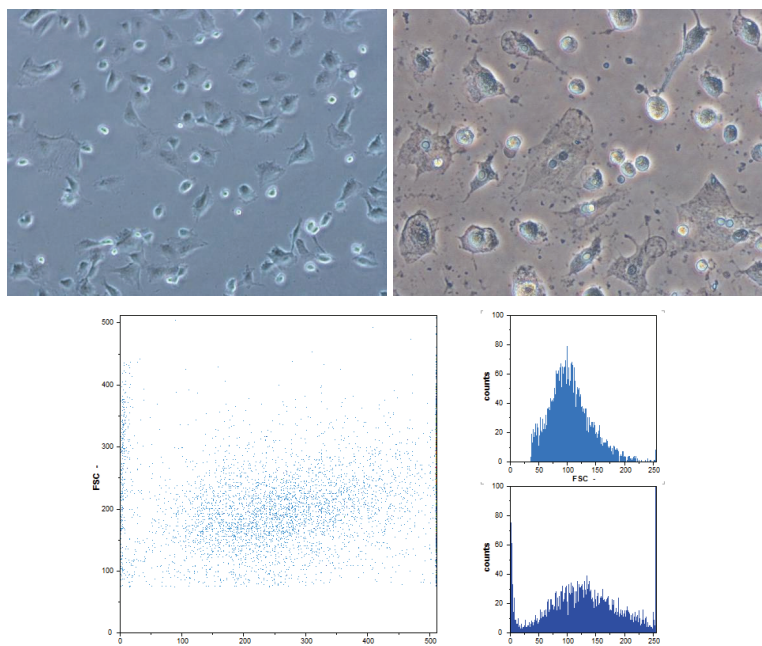


Рис. 8. Микрофотографии клеточной культуры (ув. x 200) и данные проточной цитофлуориметрии через 24 часа культивирования клеток в растворе ацетата ртути (0,13 мкмоль/л  $Hg^{2+}$ ), без предварительной обработки сульфатом цинка и



тическим изменениям. В растворе появляется большое количество клеточного детрита, клетки округлены, частично лизированы. В этом случае практически нельзя выделить какие-либо субпопуляции, облако на скактограмме не имеет четких границ.

Однако, если происходит культивирование фибробластов в присутствии ацетата ртути на фоне сульфата цинка, то наблюдается картина выживания значительно большего числа клеток. При этом, количество живых клеток составляет 47,4 %, что хорошо иллюстрируют рис. 9.

Сравнение рис. 8 и 9 показывает высокую цитопротекторную роль предварительного введения цинка, который вызывает индуктивный синтез металлоioneина.

Из всех протестированных металлов наименее цитотоксичен  $\text{Eu}^{3+}$  (рис. 10). Наш интерес к этому металлу вызван перспективной возможностью его использования в качестве люминесцентного зонда при исследовании клеточного транспорта ТМ.

Как впервые показано нами, цинк не оказывает заметного протекторного действия при введении соли  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ , что, вероятно, может свидетельствовать о том, что для транспорта европия в клетку не используются мембранные транспортеры цинка, и не происходит прочного связывания  $\text{Eu}^{3+}$  с МТ. Полученные данные укладываются в предлагаемую нами концепцию клеточного транспорта метал-

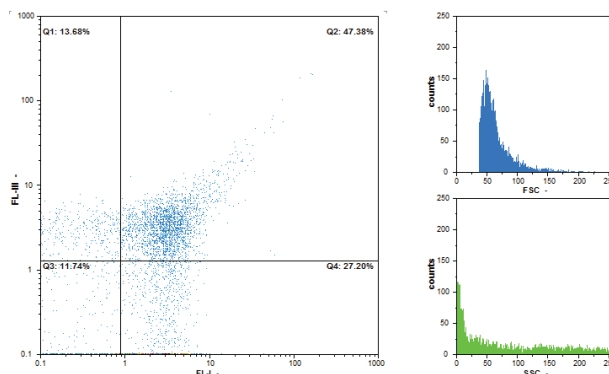


Рис. 9. Микрофотография и данные проточной цитофлуориметрии клеточной культуры после культивирования фибробластов в течение 24 часов в присутствии ацетата ртути ( $0,13 \text{ мкмоль/л Hg}^{2+}$ ) на фоне сульфата цинка ( $1,53 \text{ мкмоль/л Zn}^{2+}$ ). Ув. x 200.

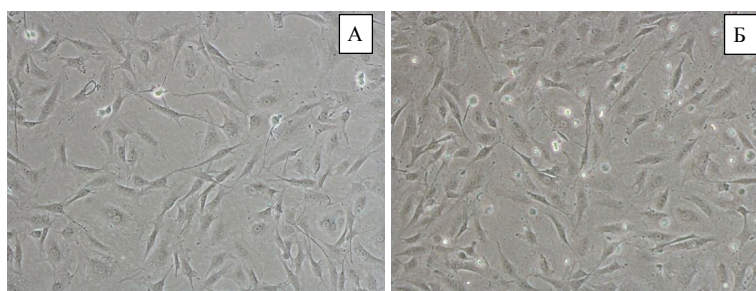


Рис. 10. Микрофотография клеточной культуры после культивирования фибробластов в течение 24 часов в присутствии  $5,18 \text{ мкмоль/л Eu}^{3+}$  (А) и  $5,18 \text{ мкмоль/л Eu}^{3+}$  на фоне  $1,53 \text{ мкмоль/л Zn}^{2+}$  (Б). Ув. x 200

лов, в соответствии с которой размер иона, степень его гидратации, заряд, стехиометрия и прочность образуемых с белками и другими лигандами комплексов определяет транспортные пути неэссенциальных металлов. Возможно, европий в клеточном транспорте будет использоваться для преодоления липидных мембран пути железа. Однако, этот вопрос требует дальнейших исследований.

### Выводы

Таким образом, эксперимент, проведенный на культуре фибробластов фетальной печени крысы, позволил показать, что при поступлении цинка в клетки наблюдается дозозависимая экспрессия генов МТ, которая носит фазовый характер. Максимальной степени индукции МТ соответствует наибольшая выживаемость клеток при воздействии ионов  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Hg}^{2+}$ . При этом свой вклад в протекторное действие предварительного введения цинка вносит увеличение концентрации  $\text{Zn}^{2+}$  вблизи соответствующих рецеп-

торов, что особо важно при конкуренции за связывание с ними между токсичными и эссенциальными металлами. Кроме того, результаты косвенно свидетельствуют о том, что введение цинка влияет на активность металлотранспортной системы в целом, в том числе, на активность мембранных транспортеров.

### Литература

1. Антологія біоетики Н Anthology of bioethics / [Редкол.: Ю. І. Кундієв (відп. ред.) та ін.]. — Львів: БаК, 2003. — 589 с.
2. Дмитруха Н.М. Імунотоксична дія свинцю і кадмію як гігієнічна проблема (до патогенезу, діагностики та профілактики інтоксикацій важкими металами). 14.02.01 – гігієна та професійна патологія. Автореферат дисертації ... доктора біологічних наук, Київ – 2010, 42 С.
3. Марченко М. Л. Культура клітин людини як альтернативний метод в комплексній токсиколого-гігієнічній оцінці сполук важких металів. 14.02.01 – гігієна та професійна патологія. Автореферат дисертації ... кандидата медичних наук, Київ – 2011, 22 С.
4. Vignais Paulette M. Discovering Life, Manufacturing Life: How the experimental method shaped life sciences/ Vignais, Paulette M.; Pierre Vignais. — 2010. — Berlin: Springer. 420 p. ISBN 90-481-3766-7.
5. Jacqueline Nairn; Price Nicholas C. Exploring proteins: a student's guide to experimental skills and methods / Nicholas Price and Jacqueline Nairn. — 2009. -Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press. 528 p. ISBN 0-19-920570-1.
6. Rothman, S. S. Lessons from the living cell: the culture of science and the limits of reductionism. / Rothman, S. S. — New York: McGraw-Hill, 2002. 272 pp.
7. Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В. Металлотионеины / Под редакцией проф. Л.М. Шафрана – Одесса: Издательство “Чорномор’я”, 2011. – 428 с.
8. 21CFR1271. Code of Federal Regulations. Title 21 Food and drugs. Chapt. I – Food and Drug Administration: Department of health and human services. Subchapt. L – Regulations under certain other acts administered by the Food and Drug Administration. Part 1271 – Human cells, tissues, and cellular and tissue-based products: Subpart D – Current Good Tissue Practice. – [valid from 2001-01-19, revised as of 2011-04-01]. – Title 21, Vol. 8. – 66 FR 5466, Jan. 19, 2001.
9. Prockop D. J. Mesenchymal stem cells: methods and protocols / D. J. Prockop, D. G. Phinney, B. A. Bunnell. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – 192 p.
10. Культура животных клеток. Методы: пер. с англ. М. А. Панова / под ред. Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 333 с.
11. Терских В. В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных: проблемы культивирования и трансплантации / В. В. Терских, А. В. Васильев. – М.: Наука, 1995. – 104 с.
12. GM-CSF promoter chromatin remodelling and gene transcription display distinct signal and transcription factor requirements. / Brettingham-Moore K.H., Rao S., Juelich T. [et al.] / Nucleic Acids Res. – 2005. — Vol. 33. – P. 225–234.
13. Additive genetic variation of transcriptional regulation: metallothionein expression in the soil insect *Orchesella cincta*. / Roelofs D., Overhein L., De Boer M.E. [et al.] // Heredity – 2006. — Vol. 96. – P. 85–92.
14. Heid C.A. Real-time quantitative PCR. / C.A. Heid // Genome Res. -1996. -№ 6.- p. 986-994.
15. Liuzzi J.P. Mammalian zinc transporters. / J. P. Liuzzi, R. J. Cousins // Annu Rev Nutr. – 2004. — Vol.24. – P. 151-172.
16. Eide D. J. The SLC39 family of metal ion

- transporters./ D. J. Eide / Pflugers Arch. – 2004 — Vol. 447(5). – P. 796-800.
17. The cytotoxic effects of cadmium chloride and mercuric chloride mixtures in rat primary hepatocyte cultures. / Beattie J.H., Marion M., Schmit J.P. [et al.] // Toxicology — 1990. — Vol. 62, № 2 — P 161-73
18. Frederickson C.J. The neurobiology of zinc in health and disease. / C. J. Frederickson, J.Y. Koh, A. I. Bush // Nat Rev Neurosci. – 2005. — Vol. 6 (6). — P. 449-462.
19. Liver and iron metabolism — a comprehensive hypothesis for the pathogenesis of genetic hemochromatosis. /Stremmel W., Karner M., Manzhali E. [et al.] // Z Gastroenterol. – 2007. — Vol. 45(1). – P. 71-75.
20. Gaither L. A. / Eukaryotic zinc transporters and their regulation. / L. A. Gaither, D. J. Eide // Biometals.– 2001. – Vol. 14(3-4) – P.251-270.
21. Общая токсикология// Под ред. Б.А.-Курляндского, В.А.Филова – М.: Медицина, 2002 – 608 с.

### Резюме

#### ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ МЕТАЛОТІОНЕЇНУ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН ФІБРОБЛАСТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ТА ЇЇ РОЛІ У ВИЖИВАНОСТІ КЛІТИН ПРИ ЕКСПОЗИЦІЇ ВАЖКИМИ АМИ

*Пихтєєв Д.М., Пихтєєва О.Г., Большой Д.В., Самойленко Т.В., Яременко К.М.*

В експерименті на культурі фібробластів фетальної печінки щурів методом Real time PCR показано, що у при введенні в культуру хлориду цинку до кінцевих концентрацій у культуральному середовищі 0,51; 1,53 і 5,09 мкмоль/л, вже через годину реєструється експресія генів металотіонеїну MT -1a і MT -2. Експресія максимальна при концентрації 1,53 мкмоль/л. Попередня індукція синтезу металотіонеїну підвищує виживання клітин при введенні в культуральне середовище солей важких металів (Hg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; Pb(OOCCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; CdSO<sub>4</sub>). Захист

максимально ефективний при дії солей кадмію та ртуті і залежить від кількості попередньо введеного цинку. Найменш токсичним виявилася сіль Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, при дії якої протекторної дії металотіонеїну не спостерігали, ймовірно через відмінності у механізмах транспорту Eu<sup>3+</sup> та Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>.

*Ключові слова: металотіонеїн, експресія генів, культура фібробластів фетальної печінки щурів.*

### Summary

#### METALLOTHIONEIN GENE EXPRESSION STUDIES IN CELL CULTURE OF FIBROBLASTS RAT LIVER AND ITS ROLE IN CELL SURVIVAL DURING HEAVY METAL EXPOSURE

*Pykhteev D.M., Pykhteeva E.G., Bolshoy D.V., Samojlenko T.V., Yaremenko E.N.*

In experiment on fibroblasts culture of fetal rats' liver the Real time PCR method showed that on condition of injection of zinc chloride into culture until final concentration 0,51; 1,53 and 5,09 micromole/l in culture medium metallothionein genes' MT-1a and MT-2 expression is registered already in an hour. The expression reaches its maximum upon concentration 1,53 micromole/l. Preliminary induction of metallothionein synthesis increases survivance of cells on condition of injection of salts of heavy metals (Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; Pb(OOCCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; CdSO<sub>4</sub>) into culture medium. The maximum efficient protection is observed under action of cadmium and mercury salts and depends on quantity of previously added zinc. The salt Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> appeared to be the least toxic, under action of the latter protective behavior of metallothionein was not observed, probably due to the differences in transport mechanisms of Eu<sup>3+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>.

*Keywords: metallothionein, genes' expression, fibroblasts culture of fetal rats' liver.*

*Впервые поступила в редакцию 15.09.2013 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*