

МЕТАЛОЗВ'ЯЗУВАЛЬНА ЗДАТНІСТЬ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА ОТРУЄННЯ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

Б. О. ЦУДЗЕВИЧ, І. В. КАЛІНІН

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: ikalin@rambler.ru

Досліджено функціонування металотіонеїнів печінки щурів за отруєння сульфатом міді і сульфатом кадмію. Шляхом послідовної хроматографії на сефадексі G-50 та ДЕАЕ-целюлозі одержали металотіонеїни (MT-1, MT-1a, MT-2, MT2a), які відрізняються молекулярною масою та зв'язаними металами. У разі отруєння важкими металами спостерігається активація синтезу та металозв'язувальної функції металотіонеїнів, а також зміна складу їхніх ізоформ.

Ключові слова: кадмій, мідь, цинк, печінка, металотіонеїни, ізоформи металотіонеїнів, щури.

Сьогодні дуже гостро постало питання забруднення навколишнього середовища важкими металами. Вони, як і інші хімічні забруднювачі, потрапляють у середовище існування людини внаслідок не лише природних процесів, а й інтенсивного розвитку промисловості, нераціонального використання природних ресурсів і урбанізації життя суспільства. Викиди металів в навколишнє середовище, що обумовлені техногенною діяльністю, в сотні і тисячі разів перевищують фонові концентрації.

Важкі метали та інші негативні чинники довкілля призводять до активації системи захисту організму, направленої на підтримання гомеостазу. Однією із її складових є синтез металотіонеїнів та стресових протеїнів, які забезпечують виживання організму та його адаптацію до змінених умов навколишнього середовища [1–7].

Мета роботи – дослідження функціонування металотіонеїнів печінки щурів та їхня участь у процесах детоксикації при отруєнні важкими металами.

Матеріали і методи

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях одного віку масою 180–200 г впродовж 14 діб відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях. Тварин було розділено на три групи: перша – інтактні (контроль), друга – тваринам перорально вводили розчин сульфату міді в дозі 3 мг/кг, що становить 1/10 від ЛД₅₀, третя – тваринам перорально вводили розчин сульфату кадмію в дозі 1,5 мг/кг, що становить 1/30 від ЛД₅₀. Після

закінчення експерименту щурів декапітували під ефірним наркозом та відбирали тканини печінки для подальших досліджень.

Вміст металотіонеїнів визначали за методом А. Viarengo та ін. [8], який ґрунтується на визначенні тіолів за допомогою 5,5'-дитіобіснітробензойної кислоти (ДТНБ) після екстракції в системі етанол/хлороформ. Наважку тканини масою 300 мг гомогенізували у 3 об'ємах 20 мМ трисахарозного буфера з додаванням 0,05 мл 0,01%-го β-меркаптоетанолу та інгібіторів протеаз 0,5 мМ фенілметилсульфонілфториду та 0,006 мМ лейпептину. Одержану суміш центрифугували протягом 45 хв при 14 000 г, 4 °С. Екстракцію супернатанту проводили сумішшю охолодженого етанолу (до –20 °С) та хлороформу з наступним центрифугуванням при 6000 г протягом 10 хв. До супернатанту додавали 3 мл охолодженого етанолу, змішували протягом 15 с та інкубували 1 год при –20 °С. Після цього до суміші додавали 1 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 8,0) і пробу центрифугували протягом 12 хв при 6000 г. Супернатант декантували, а осад промивали 2 мл промивочного буфера та знову центрифугували протягом 20 хв при 3000 г, 4 °С. Супернатант знову декантували, а осад ресуспендували в 0,3 мл трис-ЕДТА буфера, рН 7,0, після чого додавали 4,2 мл 0,43 мМ розчину ДТНБ в 0,2 М фосфатному буфері, рН 8,0. Світлопоглинання проби вимірювали при 412 нм.

Вміст металотіонеїнів у пробі визначали за калібровочною кривою, побудованою на GSH і виражали в мкг/г вологої тканини.

Металотіонеїни із тканин печінки виділяли шляхом гель-фільтрації, а ізоформи металотіонеїнів за допомогою іонообмінної

хроматографії розчину термостабільних сполук [9, 10], розчин яких одержували з 10%-ого гомогенату тканини в 10 мМ трис-НСІ буфері (рН 8,0) з додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу (Sigma, США) для запобігання окислення SH-груп та інгібітора протеаз 0,1 мМ фенілметилсульфонілфториду (Sigma, США). Гомогенат виготовляли з об'єднаних рівних наважок тканини восьми тварин дослідної групи та центрифугували протягом 45 хв при 14 000 g. Одержаний надосад інкубували 5 хв при 85 °С і знову центрифугували в тих самих умовах. Надосад, що містить розчинні термостабільні сполуки, піддавали гелерозподільчій хроматографії на сефадексі G-50 та іонообмінній хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Розподільчу хроматографію здійснювали 0,01 М трис-НСІ буфером (рН 8,0) на колонці, заповненій сефадексом G-50 (Pharmacia, Україна), з охолоджуючим кожухом розміром 50×1,5 см із швидкістю 0,33 мл/хв. Для запобігання втрат металів, зв'язаних із протеїнами, в елюент не додавали ЕДТА. Світлопоглинання проб вимірювали при довжині хвилі 280 і 254 нм (D_{280} і D_{254}). Калібрування колонки здійснювали за допомогою протеїнів з відомою молекулярною масою: хімотрипсिनогену (25,8 кДа), міоглобіну (17,0 кДа), цитохрому с (12,3 кДа), убіквітину (8,6 кДа) та інсуліну (5,8 кДа) (всі маркери фірми Sigma, США). Металотіонеїни ідентифікували як низькомолекулярні термостабільні протеїни із високим показником співвідношення світлопоглинання D_{254}/D_{280} . УФ-спектри поглинання об'єднаних фракцій (10 мл), одержаних із хроматографічного піку, реєстрували за зазначених довжин хвиль світла і проводили визначення в них вмісту металів.

Частину розчину термостабільних сполук наносили на іонообмінну хроматографічну колонку розміром 50×1,5 см з охолоджуючим кожухом, заповнену ДЕАЕ-целюлозою (Pharmacia, Україна). Для видалення незв'язаних протеїнів колонку промивали 100 мл 10 мМ трис-НСІ буфера з рН 8,0. Після цього протеїни елюювали розчином NaCl з лінійним градієнтом концентрації 0–1 М в трис-НСІ буфері з додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу та 0,1 мМ фенілметилсульфонілфториду в загальному об'ємі 400 мл. Об'єм проб становив 5 мл, швидкість елюції – 0,5 мл/хв. Абсорбцію елюату реєстрували при 254 і 280 нм. Після об'єднання проб кожної фракції (15 мл) реєстрували їхні УФ-спектри та проводили визначення в них вмісту металів.

Вміст металів у тканинах печінки та фракціях визначали на атомно-абсорбційному

спектрофотометрі С-115 після спалювання зразків в азотній кислоті. Вміст протеїнів у тканинах печінки і фракціях визначали методом Lowry et al. [11]. Експериментальні дані обробляли статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента [12].

Результати та обговорення

При розподільчій хроматографії на сефадексі G-50 з гомогенату тканин печінки було одержано фракцію з молекулярною масою близько 7 кДа, у складі якої ідентифіковано металотіонеїни за показниками світлопоглинання (рис. 1).

У протеїнах фракції виявлено наявність металтіолатних кластерів (смуга поглинання з максимумом 254 нм), які втрачаються під час переходу протеїну в апоформу, та відсутність в їхньому складі ароматичних груп (відсутність смуги поглинання при 280 нм).

Методом іонообмінної хроматографії з тканин печінки було виділено металотіонеїни з різною молекулярною масою – МТ-1, МТ-1а, МТ-2 та МТ-2а (рис. 2), які є типовою ознакою металотіонеїнів тварин [13, 14].

МТ-1 всіх досліджуваних груп елюються при 0,38–0,40 М NaCl, для МТ-1а відзначено різний об'єм елюції: 0,14–0,17 М NaCl – у контролі, 0,15–0,18 М NaCl у групі щурів, отруєних сульфатом міді, і 0,20–0,23 М NaCl – у тварин, отруєних сульфатом кадмію; для МТ-2 також відзначено різний об'єм елюції: 0,35 М NaCl для контрольної групи, 0,38 М

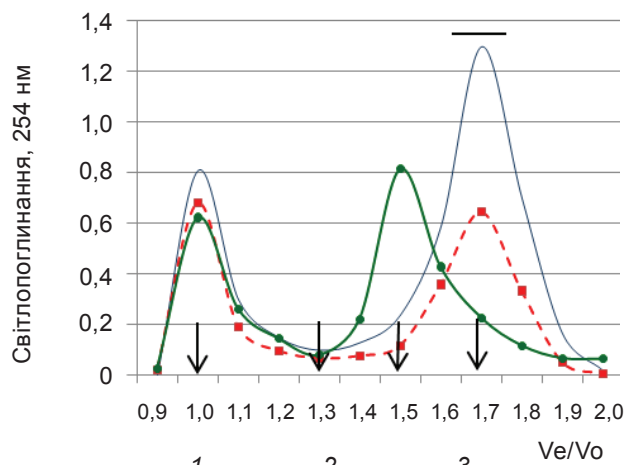


Рис. 1. Профілі елюції термостабільних протеїнів печінки щурів на сефадексі G-50. Горизонтальною лінією виділено металотіонеїнвмісну фракцію, стрілками вказано об'єм елюції маркерів: 1 – контроль; 2–3 – групи піддослідних тварин

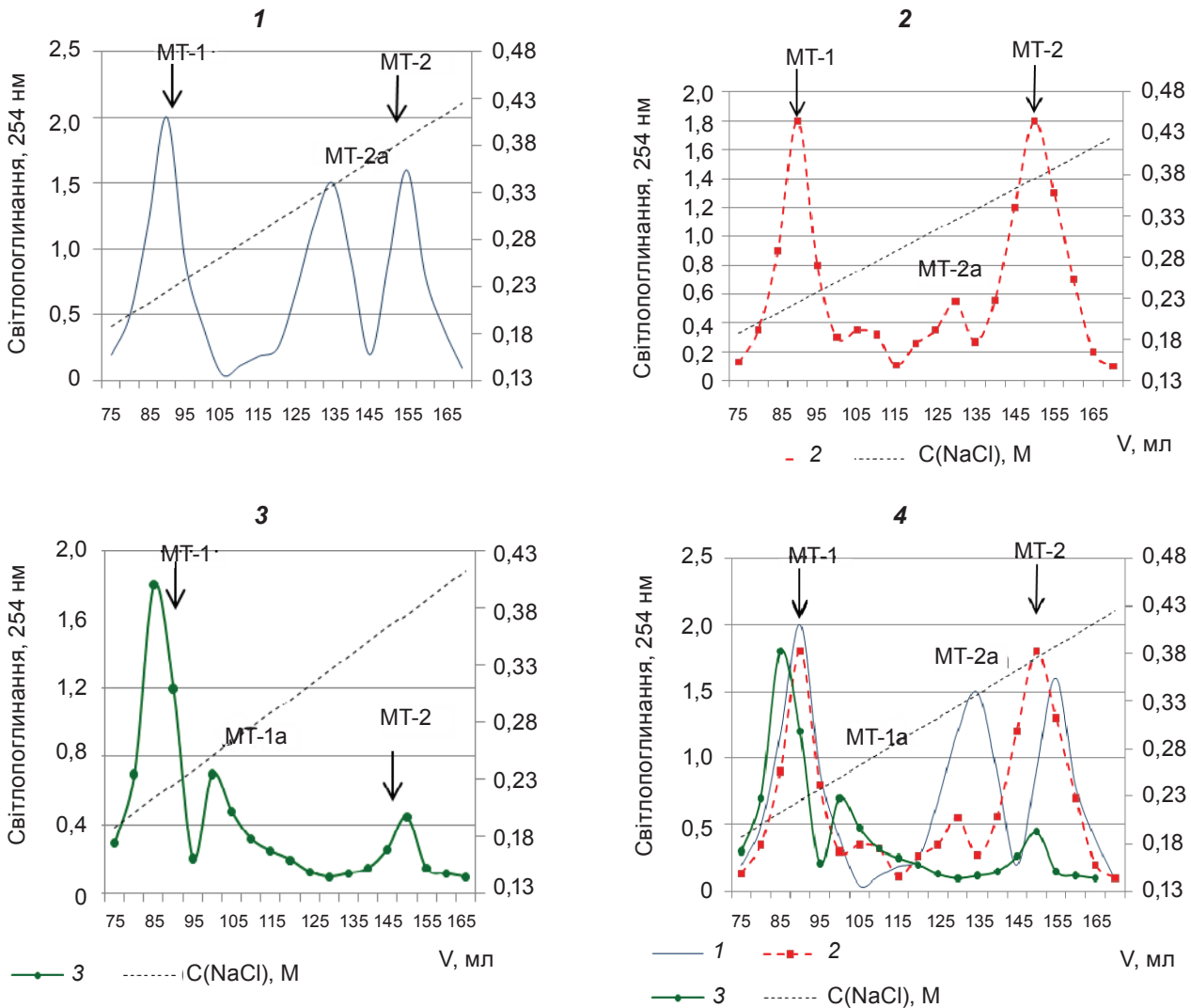


Рис. 2. Профілі елюції металотіонеїнів печінки щурів, одержані методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі в лінійному градієнті NaCl в 0,01 М трис-НСl буфері, рН 8,0. Стрілками вказано об'єм елюції стандартного розчину кроличого металотіонеїну II. 1 – контроль; 2–3 – номер дослідних груп, 4 – сумарний графік профілів елюції дослідних груп

NaCl для другої групи та 0,20 М NaCl для третьої групи щурів.

Співвідношення об'ємів MT-1 до MT-2 становить в контролі 0,7. Слід зазначити, що тільки в 3-й дослідній групі щурів присутня молекулярна форма MT-1a, а відсутня – MT-2a. Проведені нами розрахунки свідчать, що вміст MT-2 у тканині печінки в контролі у 3 рази більший, ніж MT-1.

Розрахунок розподілу окремих металів серед ізоформ металотіонеїнів тканин печінки (рис. 3) показав, що іони міді та кадмію впливають на збільшення вмісту міді у MT-2 і MT-2a у три рази – в другій групі, та в 9 разів – у третій порівняно з контрольною гру-

пою. Вміст цинку у MT-2 і MT-2a збільшується у 2 рази у другій групі та в 3 рази – в третій відносно контролю. Залишається незмінним вміст кадмію у другій групі порівняно з контролем, а в третій – вміст кадмію збільшується в MT-2 і MT-2a в 4 рази відносно контролю.

Встановлене нами збільшення досліджуваних металів у декілька разів, як зазначено вище, є свідченням збільшення металозв'язувальної функції металотіонеїнів.

Вміст металотіонеїнів третьої групи досить тісно корелює з кумуляцією кадмію в печінці щурів і може бути пояснено здатністю цього металу швидко індукувати їхній синтез у всіх органах і тканинах [15].

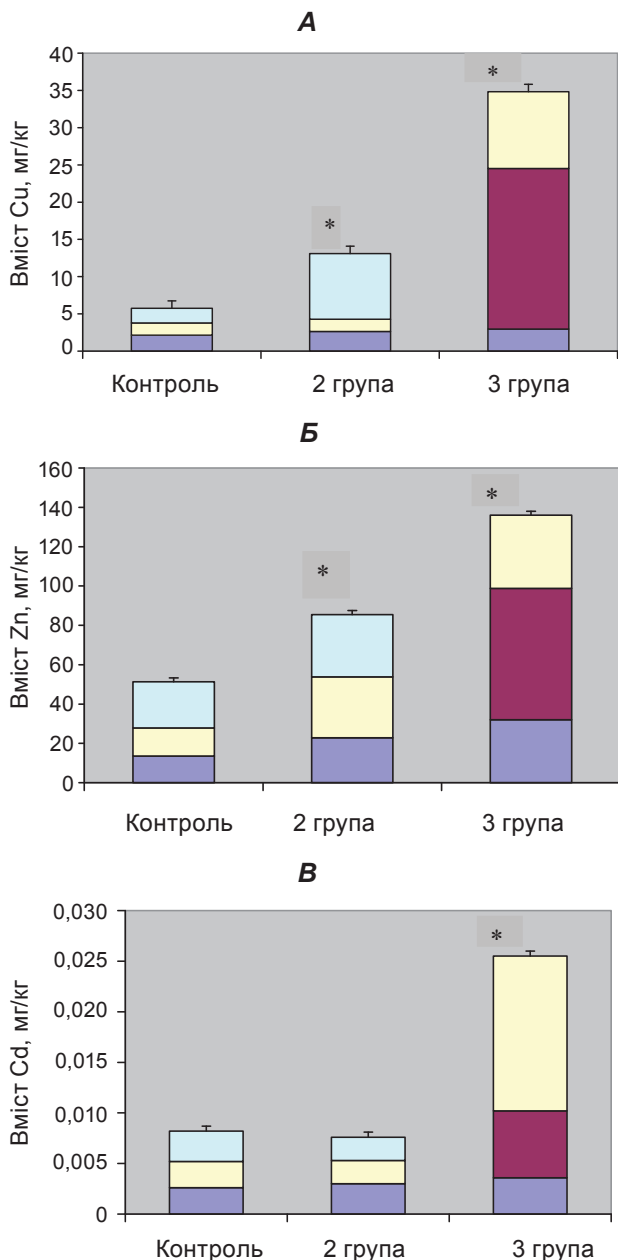


Рис. 3. Вміст міді (А), цинку (Б) та кадмію (В) в печінці щурів (n = 8, * P ≤ 0,05): □ – MT-2a, □ – MT-2, ■ – MT-1a, ■ – MT-1

Отже, внаслідок проведених нами досліджень встановлено, що зміни вмісту металів у тканині печінки щурів мають концентраційнозалежний характер і не узгоджуються із загальними закономірностями накопичення металів у металотіонеїнах. Найбільше ураження металозв'язувальної функції спостерігається в ізоформах MT-1a, MT-2 і MT-2a печінки щурів та інтенсивніше за умов отруєння сульфатом кадмію.

Таким чином, підсумовуючи одержані нами результати, слід відмітити, що в умовах отруєння важкими металами активується металозв'язувальна функція металотіонеїнів печінки щурів та спостерігається зміна складу ізоформ металотіонеїнів, що найбільш чітко і наочно встановлено за дії сульфату кадмію.

МЕТАЛОСВ'ЯЗУВАЮЩІЕ СВОЙСТВА МЕТАЛОТИОНЕИНОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Б. А. Цудзевич, И. В. Калинин

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина; e-mail: ikalin@rambler.ru

Исследовано функционирование металлотіонеинов печени крыс при отравлении сульфатом меди и сульфатом кадмия. Путем последовательной хроматографии на сефадексе G-50 и ДЭАЭ-целлюлозе получены металлотіонеины (MT-1, MT-1a, MT-2, MT-2a), которые отличаются молекулярной массой и составом связанных металлов. Отравление тяжелыми металлами приводит к активации синтеза и металлосвязывающей функции металлотіонеинов, а также изменению состава их изоформ.

Ключевые слова: кадмий, медь, цинк, печень, металлотіонеины, изоформы металлотіонеинов, крысы.

METAL-BINDING CAPACITY OF METALLOTHIONEINS OF THE LIVER OF RATS POISONED WITH HEAVY METALS

B. O. Tsudzevich, I. V. Kalinin

Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine; e-mail: ikalin@rambler.ru

Summary

The functioning of metallothioneins in the liver of rats, poisoned with copper sulfate and cadmium sulfate has been investigated. By sequential chromatography on sephadex G-50 and DEAE-cellulose the authors obtained metallothioneins (MT-1, MT-1A, MT-2, MT-2a), which differ in molecular weight and composition of associated metals. Heavy metal poisoning leads to activation of synthesis and metal-binding function of metallothioneins, as well as to changes in the composition of their isoforms.

Key words: cadmium, copper, zinc, liver, metallothioneins, isoforms of metallothioneins, rats.

1. Трахтенберг И. М., Колесников В. С., Луковенко В. П. / Тяжелые металлы во внешней среде : Современные гигиенические и токсикологические аспекты. — Минск: Наука і техніка, 1994. — 285 с.
2. Foyer C. H., Noctor G. // *Plant Cell*. — 2005. — **17**, N 5. — P. 1866–1876.
3. Данилин И. А., Павловская В. В., Залуцкая Е. А. // Вестник РУДН. Серия — экология и безопасность жизнедеятельности. — № 1 (13) — 2006. — С. 16–19.
4. Столяр О. Б. Роль металотіонеїнів в детоксикації йонів міді, цинку, марганцю та свинцю в організмі прісноводних риб і молюсків // Автореф. дис...д-ра біол. — Львів. — 2004. — 30 с.
5. Барабой В. А., Петрина Л. Г. // Укр. біохім. журн. — 2003. — **75**, № 4. — С. 28–36.
6. Valls M., Vofill R., Gonzales-Duarte R. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2001. — **276**, N 35. — P. 32835–32843.
7. Astrid S., Helmut S., Roland K. O. / *Metallothioneins and Related Chelators (Metal Ions in Life Sciences)*. — Copyright: 2009. — 514 p.
8. Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. // *Mar. Environ. Res.* — 1997. — **44**, N 1. — P. 69–84.
9. Suzuki K. T. Purification of vertebrate metallothioneins. *Methods in Enzymology Metallobiochemistry, Part B: Metallothionein and Related Molecules*, Academic Press, San Diego, 205 (1991), 252–263.
10. Falfushynska H. I., Stoliar O. B. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2009. — **72**. — P. 1425–1432.
11. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* — 1951. — **193**, N 1. — P. 265–275.
12. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — Киев: Морион, 2001. — 407 с.
13. Das K., Jacob V., Bounquegneau J. M. // *Comp. Biochem. Physiol.* — 2002. — P. 245–251.
14. Florianczyk Boleslaw, Staroslawska Elzbieta // *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* — 2003. — **47**, N 1. — P. 153–156.
15. Хижняк С. В. Клітинні механізми токсичності кадмію. — К.: Видавництво «LAT&K», 2010. — 213 с.

Отримано 21.04.2011