



Экспериментальная оценка состояния печени крыс в ответ на воздействие хлорида кадмия в течение трёх месяцев и ремиссии

Гизатуллина А. А., Валова Я. В., Смолянкин Д. А., Каримов Д. О., Хуснутдинова Н. Ю., Репина Э. Ф.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека»,
(ул. Степана Кувыкина, 94, Уфа, 450106, Россия)

Для цитирования: Гизатуллина А. А., Валова Я. В., Смолянкин Д. А., Каримов Д. О., Хуснутдинова Н. Ю., Репина Э. Ф. Экспериментальная оценка состояния печени крыс в ответ на воздействие хлорида кадмия в течение трёх месяцев и ремиссии. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2024;223(3): 97–107. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-223-3-97-107

✉ Для переписки:
Гизатуллина
Алина Анваровна
alinagisa@yandex.ru

Гизатуллина Алина Анваровна, м.н.с. отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных
Валова Яна Валерьевна, к.б.н., м.н.с. отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных
Смолянкин Денис Анатольевич, м.н.с. токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных
Каримов Денис Олегович, к.м.н., заведующий отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных
Хуснутдинова Надежда Юрьевна, научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных
Репина Эльвира Фаридовна, к.м.н., с.н.с. отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных

Резюме

Актуальность: Тяжёлые металлы можно было бы считать одним из определяющих развитие человека и общества фактором, но их распространение влечёт за собой опасность загрязнения окружающей среды, что может сказываться на здоровье самого общества.

Цель исследования: Целью исследования стало изучение влияния хлорида кадмия на печень крыс с помощью уровня экспрессии генов *Mt1a* и *Mt2a* после воздействия токсикантом в течение трёх месяцев и ремиссией продолжительностью в один месяц.

Материалы и методы: Методом случайной выборки из общей лабораторной популяции были отобраны 40 особей белых аутбредных крыс с учётом полового соотношения 1:1. Далее животные были распределены по 5 самцов и 5 самок соответственно в четыре группы. Особям трёх экспериментальных групп ежедневно в течение трёх месяцев перорально вводили водный раствор CdCl_2 в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/кг.

Результаты: По результатам анализа экспрессии генов *Mt1a* и *Mt2a* в печёночной ткани в ответ на ежедневное поступление кадмия в указанных концентрациях в течение эксперимента были выявлены статистически значимые различия между исследуемыми группами.

Заключение: Проведённое исследование демонстрирует взаимосвязь между дозировками кадмия, получаемого экспериментальными животными в течение трёх месяцев с одним месяцем ремиссии, и ростом экспрессии генов металлотионеинов *Mt1a* и *Mt2a* в печени, а также с изменениями некоторых биохимических показателей по сравнению с контрольной группой. Результаты многочисленных исследований в данной области дополняют друг друга и формируют надёжную информационную базу для профилактики и лечения токсических отравлений соединениями кадмия.

Ключевые слова: тяжёлые металлы; хлорид кадмия; экспрессия генов; биохимические показатели; металлотионеины; ген *Mt1a*; ген *Mt2a*

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDN: UWZQCC



<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-223-3-97-107>

Experimental assessment of the state of the rat organism in response to exposure to cadmium chloride for three months and remission

A. A. Gizatullina, Ya. V. Valova, D. A. Smolyankin, D. O. Karimov, N. Yu. Khusnutdinova, E. F. Repina

Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, (94, Stepan Kuvykin Street, Ufa, 450106, Russia)

For citation: Gizatullina A. A., Valova Ya. V., Smolyankin D. A., Karimov D. O., Khusnutdinova N. Yu., Repina E. F. Experimental assessment of the state of the rat organism in response to exposure to cadmium chloride for three months and remission. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2024;223(3): 97–107. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-223-3-97-107

✉ **Corresponding author:**

Alina A. Gizatullina
alinagisa@yandex.ru

Alina A. Gizatullina, Junior Researcher of the Department of Toxicology and Genetics with the experimental clinic of Laboratory Animals; ORCID: 0000-0002-7321-0864

Yana V. Valova, Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Department of Toxicology and Genetics with the experimental clinic of Laboratory Animals; ORCID: 0000-0001-6605-9994

Denis A. Smolyankin, Junior Researcher of the Department of Toxicology and Genetics with the experimental clinic of laboratory animals; ORCID: 0000-0002-7957-2399

Denis O. Karimov, Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Toxicology and Genetics with the experimental clinic of laboratory animals; ORCID: 0000-0003-0039-6757

Nadezhda Yu. Khusnutdinova, Researcher of the Department of Toxicology and Genetics with the experimental clinic of Laboratory Animals; ORCID: 0000-0001-5596-8180

Elvira F. Repina, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Department of Toxicology and Genetics with the experimental clinic of Laboratory Animals; ORCID: 0000-0001-8798-0846

Summary

Background: Heavy metals could be considered one of the factors determining the development of man and society, but their spread entails the danger of environmental pollution, which can affect the health of society itself.

The aim of the study: The aim of the study was to study the effect of cadmium chloride on the liver of rats by assessing changes in biochemical parameters in blood serum and determining the expression level of *Mt1a* and *Mt2a* genes after exposure to a toxicant for three months and remission lasting one month.

Materials and methods: 40 individuals of white outbred rats were selected by random sampling from the general laboratory population, taking into account the sex ratio of 1:1. Then the animals were distributed into 5 males and 5 females, respectively, into four groups. Individuals of the three experimental groups were orally administered an aqueous solution of CdCl_2 daily for three months at concentrations of 1, 10 and 100 micrograms/kg.

Results: According to the results of the analysis of the expression of *Mt1a* and *Mt2a* genes in liver tissue in response to the daily intake of cadmium in these concentrations during the experiment, statistically significant differences between the study groups were revealed. The differences between the levels of AST, LDH and total protein in the blood serum of the control and experimental groups also turned out to be statistically significant.

Conclusion: The study demonstrates the relationship between the dosages of cadmium obtained by experimental animals for three months with one month of remission and an increase in the expression of *Mt1a* and *Mt2a* metallothionein genes in the liver, as well as with changes in some biochemical parameters compared with the control group. The results of numerous studies in this field complement each other and form a reliable information base for the prevention and treatment of toxic poisoning with cadmium compounds.

Keywords: heavy metals; cadmium chloride; gene expression; biochemical parameters; metallothioneins; *Mt1a* gene; *Mt2a* gene

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Тяжёлые металлы представляют собой группу химических элементов, обладающих свойствами металлов и имеющих атомную массу более 50. Представители группы обнаруживаются как на техногенных территориях, таких как окрестности

химических производств и города большинства развитых стран, а также в некотором количестве во всех природных средах. Тяжёлые металлы можно было бы считать одним из определяющих развитие человека и общества фактором, но их распространение

влечёт за собой опасность загрязнения окружающей среды, что может сказываться на здоровье самого общества [1]. Основной причиной повышения уровня загрязнения тяжёлыми металлами является активное задействование таких видов деятельности, как горнодобывающая, промышленная и сельскохозяйственная. Кроме того, весомый вклад в распространение ионов данных металлов приносит захоронение отходов в почвах [2]. Для наиболее точного определения уровня загрязнения с целью дальнейшего устранения негативных последствий необходимо применение различных видов анализа проб всех объектов окружающей среды [3, 4].

Такие химические элементы как мышьяк, свинец, кадмий и ртуть являются особенно вредоносными [5], их токсичность проявляется даже при малых концентрациях вещества, что особенно опасно в связи с их особенностью накопления в живых системах [6].

Кадмий – один из представителей группы тяжёлых металлов, относящийся к высокоопасным веществам первого класса опасности [7, 8]. Изучение токсичности кадмия по отношению к живым организмам является актуальным во всём мире [9, 10]. Влияние тяжёлых металлов на организм исследуется с конца прошлого века, ярким примером является работа 1998 года, которая описывает эксперимент с телятами, получавшими водный раствор кадмия [11].

Несмотря на наличие исследований, посвящённых острому отравлению кадмием, в повседневной жизни живые организмы могут подвергаться скорее хроническому воздействию со стороны данного тяжёлого металла, что провоцируется множественными объектами загрязнения окружающей среды, и, как следствие, попадания кадмия в организм с пищей, водой, вдыхаемым воздухом. Однако токсические эффекты металла, возникающие при продолжительном поступлении небольших концентраций кадмия в организм, наступают за счёт аккумуляции элемента, связанной с неспособностью организма своевременно обезвреживать токсикант [12].

Повышение экспрессии генов металлотионеинов является одним из наиболее выраженных внутриклеточных ответов на воздействие соединений кадмия [13, 14].

Данные белки, содержащие в большом количестве остатки цистеина, необходимые для образования тиольных групп, участвуют в регуляции концентрации металлов в организме и защищают организм от окислительного стресса. Они связывают двух- и трёхвалентные ионы, в числе которых могут оказаться как важные микроэлементы, так и тяжёлые металлы, обладающие токсическим воздействием, и образуют термодинамически стабильные структуры тиолата металла [15]. Анализ металлотионеинов у дождевых червей использовался в качестве основного инструмента для

оценки загрязнения тяжёлыми металлами почв вблизи промышленных предприятий [16]. Однако, есть данные, свидетельствующие о наличии более высокого сродства металлотионеинов к кадмию, чем, например, к цинку, что говорит о том, что ионы первого при наличии ионов второго будут их вытеснять [17]. На территориях с повышенной концентрацией ионов тяжёлых металлов, в том числе – кадмия, у *Aspergillus oryzae* было замечено резкое повышение уровня экспрессии металлотионеинов как в нейтральных, так и в щелочных условиях [18].

Семейство металлотионеинов включает в себя 4 группы, каждая из которых дополнительно подразделяется на несколько изоформ. Так, например для металлотионеинов 1 и 2 известны следующие изоформы: –1A, –1B, –1E, –1F, –1G, –1H, –1X и –2A [19].

Гены металлотионеинов расположены на 16 хромосоме, однако уровень экспрессии различных видов металлотионеинов неодинаков в разных тканях [20]. В исследовании Будагова Р.С. с соавт., единовременное подкожное введение лабораторным крысам хлористого кадмия в дозировке 1 мг/кг было использовано с целью индукции синтеза металлотионеинов в печени, что увеличило их концентрацию в 20 раз [21]. Информация о скорости накопления данного тяжёлого металла и распределения его в системах и тканях организма важна для формирования целостной картины отравления кадмием, оценки его токсического действия, что, в свою очередь, необходимо для выработки стратегии терапии при подобной патологии.

Предполагается, что курение табачных изделий влияет на повышение концентрации кадмия в организме, что, в свою очередь, может индуцировать синтез белков, принимающих участие в детоксикации этого металла, в том числе, металлотионеинов [22]. В исследовании М. Ściskalska с соавторами было показано, что концентрация кадмия заметно выше в организме людей, которые потребляют табачную продукцию, по сравнению с некурящими ($p < 0.0001$). Увеличение концентрации кадмия в пять раз в лизате эритроцитов у курильщиков по сравнению с некурящими было обнаружено в группе пациентов с острым панкреатитом. При этом наблюдалась и высокая концентрация белков металлотионеинов [23].

Немаловажным является изучение биохимических показателей сыворотки крови, поскольку их изменение является важным маркером патологических изменений организма и его состояния здоровья в целом, что также регулярно исследуется учёными [24, 25, 26].

Цель исследования: изучить влияние хлорида кадмия на печень крыс, оценив изменения биохимических показателей в сыворотки крови и определив уровень экспрессии генов *Mt1a* и *Mt2a* после воздействия токсикантом в течение трёх месяцев и ремиссией продолжительностью в один месяц.

Материалы и методы исследования

Дизайн проведённого хронического эксперимента выглядит следующим образом: методом случайной выборки из общей лабораторной популяции

были отобраны 40 особей белых аутбредных крыс средней массой около 200 г с учётом полового соотношения 1:1. Далее животные были распределены

Таблица 1
Дизайн исследования
Table 1
Study design

Группа животных / A group of animals	Состав группы / The composition of the group	Контрольное вещество, токсикант / Control substance, toxicant	Доза вводимого вещества, мкг/кг / The dose of the injected substance, mcg / kg
I	5 самцов (5 males) 5 самок (5 females)	Водный раствор хлорида кадмия / Aqueous solution of cadmium chloride (CdCl ₂)	1
II	5 самцов (5 males) 5 самок (5 females)	Водный раствор хлорида кадмия / Aqueous solution of cadmium chloride (CdCl ₂)	10
III	5 самцов (5 males) 5 самок (5 females)	Водный раствор хлорида кадмия / Aqueous solution of cadmium chloride (CdCl ₂)	100
IV (Контроль) / (Control)	5 самцов (5 males) 5 самок (5 females)	Дистиллированная вода / Distilled water	-

по 5 самцов и 5 самок соответственно в четыре группы. Особям трёх экспериментальных групп ежедневно в течение трёх месяцев перорально вводили водный раствор CdCl₂.

Расчёт введения препарата был произведён с учётом показателя временного переносимого недельного потребления (ВППН) на уровне 7 мкг/кг массы тела человека, установленного для соединений кадмия экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединённых Наций (FAO). Согласно данному показателю, были определены дозировки токсиканта и контрольного вещества для исследуемых групп (табл. 1).

Животным контрольной группы вводили чистую дистиллированную воду.

Все экспериментальные животные содержались в стандартных условиях с постоянной температурой воздуха (20–25 °C), уровнем влажности и освещённости. Уход за животными осуществлялся в соответствии с ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», также были использованы рекомендации комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздраве России, ВОЗ и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Условия проведения эксперимента, а также условия вывода экспериментальных животных из него строго соответствуют международным принципам Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

После вывода крыс из эксперимента с помощью углекислого газа проводилась декапитация и вскрытие. Фрагменты почек помещались в пробирки с тризолом (Extract RNA) и замораживались

в жидком азоте. Далее, из замороженных образцов, следуя требованиям протокола коммерческого набора ExtractRNA («Evrogen», РФ), выделяли суммарную РНК. Анализ уровня транскриптов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с помощью прибора Rotor-Gene («QIAGEN», Германия) с использованием олигонуклеотидных специфичных праймеров («Eurogene», РФ), в состав которых входит интеркалирующий краситель SYBR Green. Уровень экспрессии мРНК исследуемых генов был оценен относительно экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) – белка «домашнего хозяйства».

В сыворотке крови экспериментальных животных кинетическими методами были проанализированы уровни активности биохимических показателей: аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ), общего белка и альбумина. Исследование проводилось в соответствии с инструкциями производителя с помощью наборов реагентов «Вектор – Бест» (г. Новосибирск, РФ) на лабораторном анализаторе «Stat Fax 3300» («Awareness Technology», USA).

Полученные результаты интерпретировали с помощью статистической обработки с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 21 (IBM, США). Был проведена предварительная проверка результатов на нормальное распределение с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Оценку значимости различий между исследуемыми группами проводили с помощью t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Итоговые данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ биохимического исследования крови экспериментальных животных после воздействия в течение трёх месяцев на их организм водного раствора хлорида кадмия и одного месяца восстановления выявил следующие результаты.

Активность фермента АСТ в сыворотке крови исследуемых животных была неодинакова, кроме того, были обнаружены статистически значимые различия ($H=11,18$; $p=0,011$) (рис. 1).

Так, например, активность фермента в контрольной группе составила 154,75 [119,38; 173,4], а в группе с минимальной дозировкой токсиканта (1 мкг/кг) повысилась до максимального из полученных результатов уровня 225,7 [179,78; 288,1] ($p=0,006$). Увеличение концентрации кадмия в вводимых водных растворах привело к снижению активности АСТ относительно максимума в сыворотке крови животных второй и третьей экспериментальных

Рисунок 1. Уровень активности АСТ в сыворотке крови животных через 3 месяца интоксикации и 1 месяце ремиссии при разных дозах затравки.

Figure 1. The level of AST activity in the blood serum of animals after 3 months of intoxication and 1 month of remission at different doses of seed.

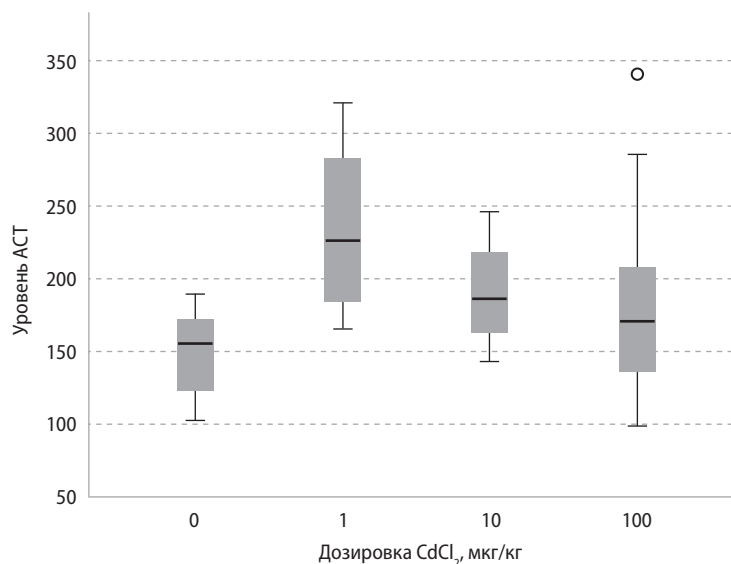
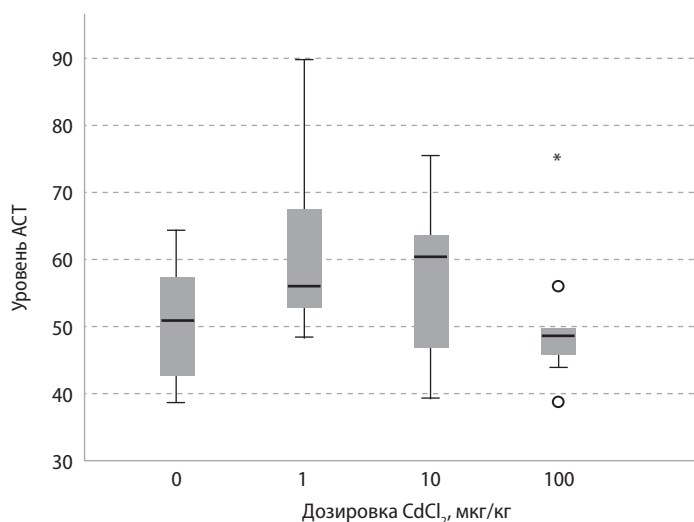


Рисунок 2. Уровень активности АЛТ в сыворотке крови животных через 3 месяца интоксикации и 1 месяце ремиссии при разных дозах затравки.

Figure 2. The level of ALT activity in the blood serum of animals after 3 months of intoxication and 1 month of remission at different doses of seed.



групп: 186 [160,25; 221,45] ($p=0,335$) при дозировке 10 мкг/кг и 170,3 [134,23; 227,2] ($p=0,908$) при дозировке 100 мкг/кг. Статистически значимые различия при сравнении групп между собой не были определены.

Активность фермента АЛТ имела похожую картину распределения в исследуемых группах (рис. 2).

Уровень активности фермента в группе контроля был зафиксирован при значении 51,05 [42,6; 58,18]. Максимальная выраженность данного биохимического показателя была отмечена в группе, получавших токсикант в дозировке 1 мкг/кг, – 56,05 [52,4; 69,68], а минимальное значение обнаружено в третьей группе животных – 48,5 [44,9; 52,95]. Во второй опытной группе при дозировке токсиканта 10 мкг/кг уровень АЛТ показал промежуточное значение – 60,3 [46,15; 64,3].

Активность фермента ЛДГ после введения токсиканта в течение трёх месяцев и одним месяцем ремиссии представлена далее (рис. 3).

Уровень количественной выраженности данного фермента в первой группе экспериментальных животных с дозировкой токсиканта 1 мкг/кг достиг значения 1603 [1531,5; 1636,25]. С увеличением

концентрации кадмия во вводимом растворе до 10 мкг/кг уровень ЛДГ снизился до 1507,5 [1224,5; 1556,75] и незначительно поднялся при концентрации 100 мкг/кг до 1559 [1095,5; 1798,5]. Наименьшее значение активности исследуемого фермента было зафиксировано в контрольной группе животных 1470 [1268,5; 1746].

Изменения уровня ЛДГ в рамках проведённого исследования не достигли значения статистической значимости ($H=3,16$; $p=0,368$).

Активность фермента ЩФ показала дозозависимое снижение с увеличением дозировки токсиканта в сыворотке крови экспериментальных животных при анализе после трёх месяцев введения водного раствора хлорида кадмия и одного месяца ремиссии (рис. 4). Обнаруженные различия достигли уровня статистической значимости ($H=15,55$; $p=0,001$).

Уровень активности фермента в группе отрицательного контроля составил 216,7 [151,75; 243,25]. В 1 и 2 экспериментальной группах значения снизились до 163,2 [153,4; 199,38] и 135,45 [122,1; 192,5] соответственно, однако данные различия не были статистически значимыми ($p=1,000$ и $p=0,091$). В группе с дозировкой токсиканта 100 мкг/кг

Рисунок 3. Уровень активности ЛДГ в сыворотке крови животных через 3 месяца интоксикации и 1 месяце ремиссии при разных дозах затравки.

Figure 3. The level of LDH activity in the blood serum of animals after 3 months of intoxication and 1 month of remission at different doses of seed.

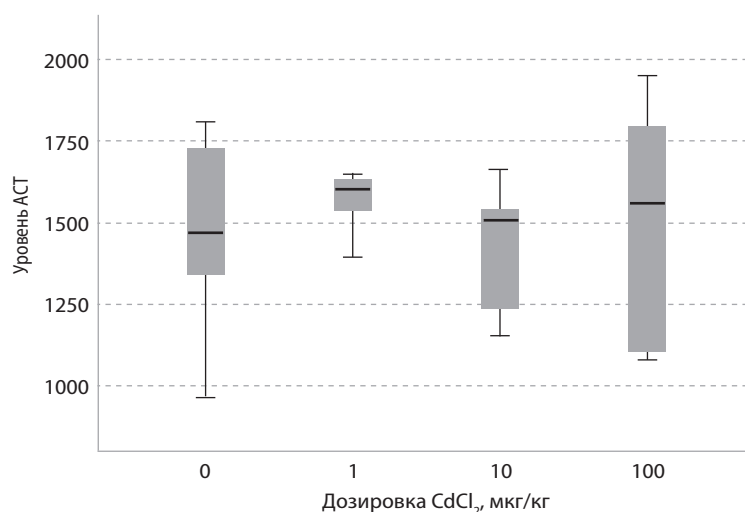
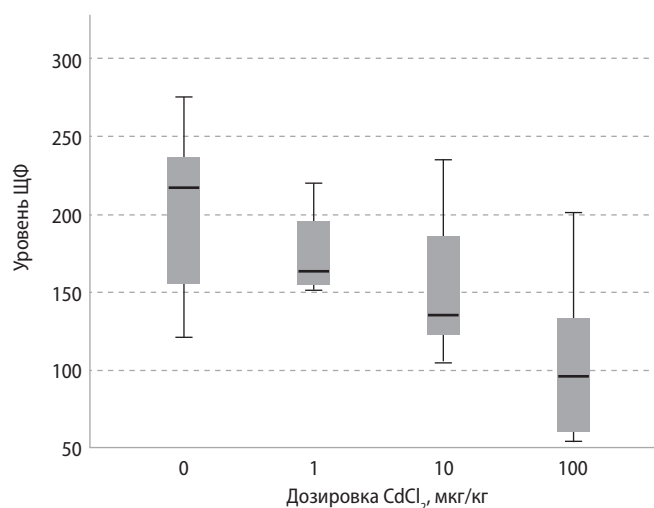


Рисунок 4. Уровень активности ЩФ в сыворотке крови животных через 3 месяца интоксикации и 1 месяце ремиссии при разных дозах затравки.

Figure 4. The level of ALP activity in the blood serum of animals after 3 months of intoxication and 1 month of remission at different doses of seed.



исследуемый параметр снизился ещё сильнее – 96,6 [59,55; 141,75] ($p=0,002$).

Анализ уровня общего белка, исследуемого в сыворотке крови экспериментальных животных после воздействия токсикантом, выявил статистически значимые различия между группами ($N=23,27$; $p=0,001$) (рис. 5).

В контрольной группе значение показателя составило 57,85 [55,5; 60,8], что значимо ниже, чем уровень белка в образцах сыворотки крови опытных животных, подвергшихся воздействию токсиканта в концентрациях 1 мкг/кг и 10 мкг/кг. Исследуемый показатель в данных группах увеличился до значений 72,5 [69,95; 78,18] ($p=0,001$) и 67,8 [64,03; 74,43] ($p=0,006$), соответственно. В оставшейся группе с дозировкой хлорида кадмия 100 мкг/кг уровень белка также был выше, чем в группе контроля 66,65 [60,63; 69,03], однако различия не достигали уровня статистической значимости ($p=0,137$).

Анализ концентрации альбумина в сыворотке крови экспериментальных животных показал следующие результаты (рис. 6).

Согласно представленному графику различия между величинами показателя четырех исследованных групп не были статистически значимыми

($N=4,01$; $p=0,261$). Тем не менее, наиболее высокий уровень альбумина был обнаружен в группе, получавшей раствор хлорида кадмия в концентрации 1 мкг/кг – 40,35 [37,68; 43,8], тогда как минимальное значение показателя было зафиксировано в сыворотке крови животных, которым вводили токсикант в концентрации 100 мкг/кг – 34,3 [29,95; 41,63]. После воздействия повреждающего вещества в дозе 10 мкг/кг значение содержания данного белка была равна 38,85 [36,8; 41,35], что близко к результатам по данному показателю в группе контроля 38,6 [37,88; 40,78].

Нами также был проведен анализ уровня транскриптов генов металлотионеинов в печени экспериментальных животных после воздействия в течение трех месяцев на их организм водного раствора хлорида кадмия и одного месяца восстановления.

По результатам анализа экспрессии гена *Mt1a* в печеночной ткани в ответ на ежесуточное поступление кадмия в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/кг в течение эксперимента были выявлены статистически значимые различия между исследуемыми группами ($N=16,54$; $p=0,001$). Уровень экспрессии данного гена в печени особей, получавших только

Рисунок 5. Уровень общего белка в сыворотке крови животных через 3 месяца интоксикации и 1 месяце ремиссии при разных дозах затравки.

Figure 5. The level of total protein in the blood serum of animals after 3 months of intoxication and 1 month of remission at different doses of seed.

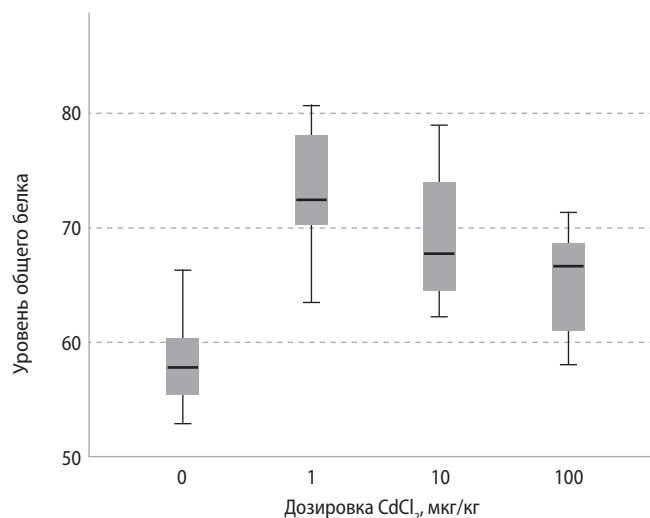
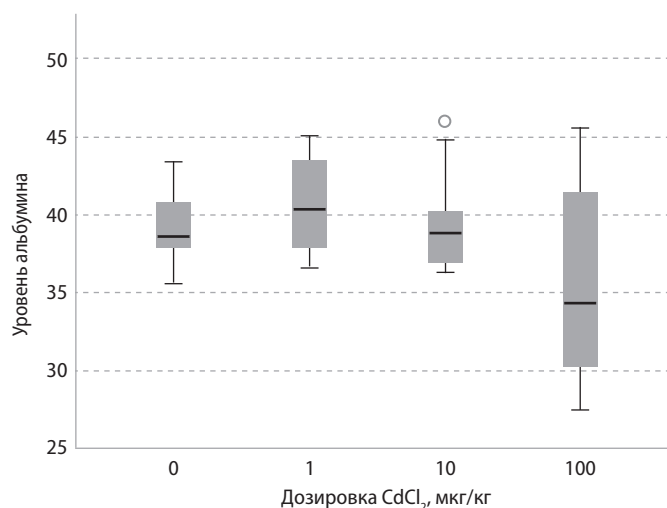


Рисунок 6. Уровень альбумина в сыворотке крови животных через 3 месяца интоксикации и 1 месяце ремиссии при разных дозах затравки.

Figure 6. The level of albumin in the blood serum of animals after 3 months of intoxication and 1 month of remission at different doses of seed.



чистую дистиллированную воду, был значительно ниже, чем в экспериментальной группе (рис. 7). Кроме того, с увеличением дозировки увеличивалось и количество транскриптов: 1,37 [0,47; 2,29]; ($p=0,012$), 1,69 [0,68; 2,9]; ($p=0,02$), 1,79 [1,26; 2,17]; ($p=0,01$) соответственно.

Оценка экспрессии гена *Mt2a* в печёночной ткани также привела к выявлению статистически значимых различий между экспериментальными группами и группой контроля ($N=21,99$; $p=0,001$) (рис. 8), но очевидного дозозависимого эффекта уже не было обнаружено.

Воздействие хлорида кадмия в минимальной из исследуемых концентраций повысило уровень транскриптов в печени животных до 4,45 [1,01; 5,5]; ($p=0,009$). Однако увеличение концентрации не дало дальнейшего роста экспрессии, а, напротив, привело к небольшому понижению кратности – 3,23 [1,77; 4,49]; ($p=0,091$). Дозировка токсиканта 100 мкг/кг максимально повысило уровень транскриптов до 6,16 [3,96; 6,79]; ($p=0,001$).

В результате проведённого нами исследования был отмечен рост транскриптов генов *Mt1a* и *Mt2a* в печени экспериментальных животных в ответ на постоянное введение токсиканта в течение трёх

месяцев и одного месяца ремиссии. Причём для уровня экспрессии гена *Mt1a* замечен дозозависимый эффект, и количество транскриптов тем больше, чем выше была концентрация раствора хлорида кадмия. Подобный дозозависимый рост экспрессии гена *Mt1a* был отмечен и ранее [27].

Также по результатам проведённого нами исследования уровень экспрессии гена *Mt2a* в печёночной ткани крыс не показал явного дозозависимого роста, количество транскриптов в гепатоцитах после воздействия токсиканта в концентрации 100 мкг/кг больше, чем при концентрации 1 мкг/кг. Однако при среднем уровне хлорида кадмия (10 мкг/кг), уровень транскрипции понижается, относительно и минимальной, и максимальной дозировки.

Похожая картина наблюдалась в более раннем эксперименте, где оценивался уровень транскрипции этого же гена в печени крыс в ответ на воздействие водного раствора хлорида кадмия в течение трёх месяцев, но без периода восстановления. Количество транскриптов при дозировках вводимого вещества 1 и 100 мкг/кг заметно возросло, однако при средней концентрации токсиканта 10 мкг/кг значительно снизилось ($p=0,008$) [28].

Рисунок 7. Экспрессия гена *Mt1a* в печёночной ткани крыс при разных дозах затравки CdCl_2 через 3 месяца интоксикации и 1 месяц ремиссии.

Figure 7. Expression of the *Mt1a* gene in rat liver tissue at different doses of CdCl_2 seed after 3 months of intoxication and 1 month of remission.

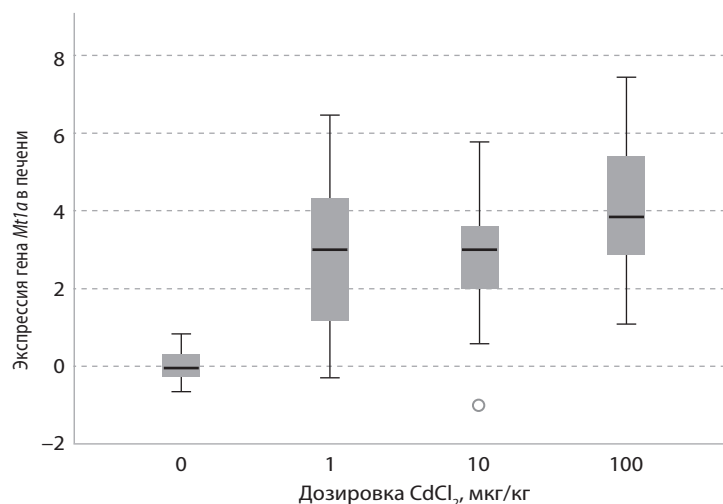
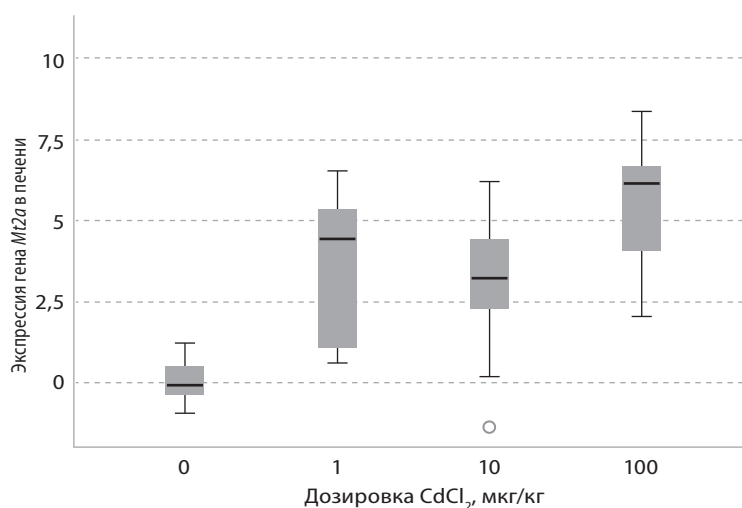


Рисунок 8. Экспрессия гена *Mt2a* в печёночной ткани крыс при разных дозах затравки CdCl_2 через 3 месяца интоксикации и 1 месяц ремиссии.

Figure 8. Expression of the *Mt2a* gene in rat liver tissue at different doses of CdCl_2 seed after 3 months of intoxication and 1 month of remission.



Обсуждение

Накопление кадмия, поступающего в организм даже в небольших дозировках, но регулярно, приводит к возникновению патологических состояний. Интоксикация отравляющим веществом негативно влияет, в первую очередь, на функции печени.

Снижение активности ЩФ и ЛДГ является, по-видимому, следствием нарушения физиологического баланса, возникшего в ответ на интоксикацию организма, тогда как рост концентрации ферментов аминотрансфераз могут указывать на излишнюю проницаемость плазматической мембраны гепатоцитов.

В исследовании Orhan Bahar с соавт., результаты биохимического анализа показали сходные результаты. Активность ЛДГ и ЩФ в ответ на 28-дневное введение карбаматного инсектицида – бендиокарба – снижалась, тогда как значения АСТ, АЛТ, МК, мочевины и креатинина увеличивались [29, 30], что указывает на процессы повреждения тканей организма. Изменение АЛТ, АСТ, ЩФ и ЛДГ также изучали Jemai H. с соавт. после внутрибрюшинного введения крысам хлорида кадмия в течение 15 дней с интервалом 3 дня [31]. Исследователи

обнаружили значительное повышение уровня биомаркеров повреждения печени по сравнению с группой контроля.

В другом исследовании раствор хлорида кадмия вводили внутривенно крысам только с 8 по 15 день, тогда как с первого дня эксперимента животные получали аторвастатин. Показано, что даже недельное воздействие токсиканта повышало уровень АЛТ, АСТ и ЩФ, при этом дополнительное введение лекарства не повлияло на результаты [32].

Более длительная затравка в течение четырёх недель токсическим агентом, содержащим кадмий, также вызвала заметное увеличение печёночных ферментов (АЛТ, АСТ, ЩФ), однако уровень альбуминов, общего белка и общего билирубина, напротив, уменьшался [33]. Данные исследования демонстрирует протектирующее действие экстракта солодки и витексина, которое выражается в снижении уровня биохимических показателей.

Повышение уровня транскриптов генов белков, выполняющих защитную функцию, естественно для здорового организма, столкнувшегося с усилением токсического воздействия опасных соединений.

К таковым относятся и белки металлотионеинов, которые, в том числе, играют важную роль в транспорте ионов тяжёлых металлов, тем самым принимая активное участие в их детоксикации. Белки металлотионеинов могут связывать одновалентные и двухвалентные ионы металлов, находящихся в избыточном количестве, что также увеличивает рост экспрессии соответствующих генов [34], однако эксперимент Пыхтеевой Е. Г. показал наличие повышенной чувствительности металлотионеинов 1 и 2, проявляющейся в наиболее высоком росте транскриптов, именно к соединениям кадмия [35].

Большая часть активизированных металлотионеинов, в ответ на поступающие извне токсины, образуется именно в почках и печени. Так, введённый мышам раствор кадмия в дозировке 1 мг/кг привёл к скачку уровня транскриптов генов металлотионеинов в печени в 20 раз [36], а при нокауте данных генов наблюдалось разрушение печёночной ткани с гораздо более высоким уровнем воспаления, нежели у особей дикого типа [37]. Эксперимент Малова А. М. с соавт., в рамках которого крысам в течение 5–30 дней, в зависимости от группы, вводили кадмий с питьевой водой в суточной дозе 1,2 мг/кг, показал, что содержание кадмия в мышечной, костной и жировой тканях было сравнимо с содержанием элемента в крови. При этом распределение кадмия в почках и печени на графике было приближено к экспоненте с поступательным нарастанием концентрации элемента, с максимумом к 30-му дню [38]. Кроме

того, был проведён ряд исследований, подтверждающих накопление кадмия в плаценте и сопутствующий рост транскриптов генов *Mt1a* и *Mt2a* [39, 40]. Опубликованные материалы подтверждают гипотезу о пассивном распределении кадмия в организме с аккумуляцией, преимущественно, в органах, выполняющих барьерную функцию.

Важно отметить, что большей чувствительностью к накоплению кадмия в организме отличается именно уровень транскриптов, то есть мРНК, а не готового белка. Это показал в своей работе Ding Zhang с соавт. Они вводили крысам на протяжении полутора месяцев раствор хлорида кадмия внутривенно из расчёта 1 мг кадмия на 1 кг веса, после чего оценивали экспрессию генов *Mt1a* и *Mt2a*, а также количество белков металлотионеинов. Учёные также не обнаружили строгой дозозависимой взаимосвязи содержания кадмия, экспрессией генов *Mt1a* и *Mt2a* и синтезом белков металлотионеинов [41].

При увеличении роста экспрессии генов металлотионеинов в гепатоцитах в ответ на продолжительное воздействие кадмия заметно снижается уровень транскриптов их ингибиторов [42]. С токсическим воздействием тяжёлых металлов связывают прогрессирование некоторых видов опухолей. Так, Tarabay H. с соавт. описали положительную корреляцию между токсичностью кадмия и развитием хромофобного подтипа почечно-клеточного рака. При этом отмечался рост экспрессии ряда генов, в том числе гена *Mt2a* [43].

Заключение

Таким образом, проведённое нами исследование демонстрирует взаимосвязь между дозировками кадмия, получаемого экспериментальными животными в течение трёх месяцев с одним месяцем ремиссии, и ростом экспрессии генов металлотионеинов *Mt1a* и *Mt2a* в печени по сравнению с контрольной группой. Кроме того, отмечены

изменения биохимических показателей сыворотки крови крыс, демонстрирующих нарушение работы печени. Полученные результаты дополняют результаты подобных экспериментов, проведённых ранее, а также могут послужить основой для разработки методов профилактики и лечения токсических отравлений соединениями кадмия.

Литература | References

1. Makhnichenko A.S., Pashchenko A.E. [The effect of heavy metals on the human body]. *Science Time*. 2016; 26(2): 395–401. (in Russ.)
Махниченко А. С., Пащенко А. Е. Влияние тяжелых металлов на организм человека. *Science Time*. 2016; 26(2): 395–401.
2. Ding R., Cheong Y. H., Ahamed A., Lisak G. Heavy Metals Detection with Paper-Based Electrochemical Sensors. *Anal Chem*. 2021 Feb 2;93(4):1880–1888. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04247.
3. Joon NK, Ek P, Zevenhoven M, Hupa L, Miró M, Bobacka J, Lisak G. On-line microcolumn-based dynamic leaching method for investigation of lead bioaccessibility in shooting range soils. *Chemosphere*. 2020 Oct;256:127022. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127022.
4. Joon N. K., Barnsley J. E., Ding R. et al. Silver (I)-selective electrodes based on rare earth element double-decker porphyrins. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020; 127311. doi: 10.1016/j.snb.2019.127311.
5. Wuana R. A., Okieimen F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available 174 Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*. 2011; Article ID: 402647. doi: 10.5402/2011/402647.
6. Medvedev I. F., Derevyagin S. S. [Heavy metals in ecosystems]. *Saratov. Rakurs Publ*. 2017:178. (in Russ.)
Медведев И. Ф., Деревягин С. С. Тяжелые металлы в экосистемах. Саратов. Ракурс. 2017. –178 с.
7. Yildirim S., Celikezen F. C., Oto G., Sengul E., Bulduk M., Tasdemir M., Ali Cinar D. An Investigation of Protective Effects of Lithium Borate on Blood and Histopathological Parameters in Acute Cadmium-Induced Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2018 Apr;182(2):287–294. doi: 10.1007/s12011-017-1089-9.
8. Sanjeev S., Bidanchi R. M., Murthy M. K., Gurusubramanian G., Roy V. K. Influence of ferulic acid consumption in ameliorating the cadmium-induced liver and renal oxidative damage in rats. *Environ Sci Pollut Res*

- Int.* 2019 Jul;26(20):20631–20653. doi: 10.1007/s11356–019–05420–7.
9. Souza-Arroyo V., Fabián J. J., Bucio-Ortiz L., Miranda-Labra R. U., Gomez-Quiroz L. E., Gutiérrez-Ruiz M. C. The mechanism of the cadmium-induced toxicity and cellular response in the liver. *Toxicology*. 2022 Oct;480:153339. doi: 10.1016/j.tox.2022.153339.
 10. Yang X., Han Y., Mu Y., Yang P., Gu W., Zhang M. Multigenerational effects of cadmium on the lifespan and fertility of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*. 2020 Apr;245:125533. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125533.
 11. Pechová A., Illek J., Pavlata L., Šindelář M., Horký D. Effects of chronic exposure to cadmium on state of health and cumulation in tissues of calves. *Acta Vet. Brno*. 1998, 67 (3): 167–174. doi: 10.2754/avb199867030167.
 12. Satarug S., Moore M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect.* 2004 Jul;112(10):1099–103. doi: 10.1289/ehp.6751.
 13. Yazğan B., Baltacı A. K., Mogulkoc R., Avunduk M. C. Effects of zinc supplementation on metallothionein levels in ischemic renal tissue. *Biotech Histochem.* 2020 May;95(4):285–296. doi: 10.1080/10520295.2019.1691264.
 14. Pabis K., Chiari Y., Sala C. et al. Elevated metallothionein expression in long-lived species mediates the influence of cadmium accumulation on aging. *Geroscience*. 2021 Aug;43(4):1975–1993. doi: 10.1007/s11357–021–00393–3.
 15. Yuan A. T., Korkola N. C., Wong D. L., Stillman M. J. Metallothionein Cd₄S₁₁ cluster formation dominates in the protection of carbonic anhydrase. *Metallomics*. 2020 May 27;12(5):767–783. doi: 10.1039/d0mt00023j.
 16. Yuvaraj A., Govarthan M., Karmegam N. et al. Metallothionein dependent-detoxification of heavy metals in the agricultural field soil of industrial area: Earthworm as field experimental model system. *Chemosphere*. 2021 Mar;267:129240. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129240.
 17. Pabis K., Gundacker C., Giacconi R. et al. Zinc supplementation can reduce accumulation of cadmium in aged metallothionein transgenic mice. *Chemosphere*. 2018 Nov;211:855–860. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.017.
 18. Okasha H., Abdel-Motleb A., Abdel-Wareth M. T. A. Metallothionein expression in *Aspergillus* exposed to environmentally relevant concentrations of heavy metals at different pH levels. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021 Sep;28(36):49936–49948. doi: 10.1007/s11356–021–14237–2.
 19. Hongfang G., Guanghui C., Khan R. et al. Review: Molecular structure and functions of zinc binding metallothionein-1 protein in mammalian body system. *Pak J Pharm Sci.* 2020 Jul;33(4):1719–1726.
 20. Migliaccio V., Putti R., Scudiero R. Metallothionein gene expression in rat tissues: response to dietary restriction after orally dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure and high-fat feeding. *J Environ Sci Health B.* 2022;57(11):859–864. doi: 10.1080/03601234.2022.2127594.
 21. Budagov R. A., Ul'yanova L. P., Smoryzanova O. A., Rott G. M. Elevated metallothionein level in mice liver after cadmium chloride administration does not protect against combined radiation and thermal injury. *Radiation biology. Radioecology*. 2001; 41(6):671–676.
Будагов Р. С., Ульянова Л. П., Сморызанова О. А., Ротт Г. М. Повышение содержания металлотионеинов в печени мышей после введения хлористого кадмия не защищает от комбинированных радиационно-термических повреждений. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2001; 41(6):671–676.
 22. Saedi S., Jafarzadeh Shirazi M. R., Totonchi M., Zamiri M. J., Derakhshanfar A. Effect of Prepubertal Exposure to CdCl₂ on the Liver, Hematological, and Biochemical Parameters in Female Rats; an Experimental Study. *Biol Trace Elem Res.* 2020 Apr;194(2):472–481. doi: 10.1007/s12011–019–01800–9.
 23. Ściskalska M., Ołdakowska M., Milnerowicz H. Importance of Genetic Polymorphisms in *MT1* and *MT2* Genes in Metals Homeostasis and Their Relationship with the Risk of Acute Pancreatitis Occurrence in Smokers-Preliminary Findings. *Int J Mol Sci.* 2021 May 27;22(11):5725. doi: 10.3390/ijms22115725.
 24. Ağır M. S., Eraslan G. The effect of diosmin against liver damage caused by cadmium in rats. *J Food Biochem.* 2019 Sep;43(9): e12966. doi: 10.1111/jfbc.12966.
 25. Ronco A. M., Garrido F., Llanos M. N. Smoking specifically induces metallothionein-2 isoform in human placenta at term. *Toxicology*. 2006 Jun 1;223(1–2):46–53. doi: 10.1016/j.tox.2006.03.002.
 26. Elhelaly A. E., AlBasher G., Alfarraj S. et al. Protective effects of hesperidin and diosmin against acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative damage in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019 Dec;26(34):35151–35162. doi: 10.1007/s11356–019–06660–3.
 27. Kluxen F. M., Diel P., Höfer N., Becker E., Degen G. H. The metallothionein modulates AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol. *Arch Toxicol.* 2013 Apr;87(4):633–43. doi: 10.1007/s00204–012–0971–7.
 28. Gizatullina A. A., Valova Ya. V., Ziatdinova M. M. et al. Evaluation of the effect of cadmium chloride on *mt2a* gene expression in rat kidneys. *Occupational Medicine and human Ecology*. 2022; (4) 124–131. (in Russ.) doi: 10.24411/2411–3794–2022–10410.
Гизатуллина А. А., Валова Я. В., Зиятдинова М. М. и соавт. Оценка влияния хлорида кадмия на экспрессию гена *Mt2a* в почках крыс. *Медицина труда и экология человека*. 2022; (4) 124–131. doi: 10.24411/2411–3794–2022–10410.
 29. Bahar O., Eraslan G. Investigation of the efficacy of diosmin against organ damage caused by bendiocarb in male Wistar albino rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023 Apr;30(19):55826–55845. doi: 10.1007/s11356–023–26105–2.
 30. Tekeli M. Y., Eraslan G., Çakır Bayram L., Soyer Sarıca Z. Effect of diosmin on lipid peroxidation and organ damage against subacute deltamethrin exposure in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021 Apr;28(13):15890–15908. doi: 10.1007/s11356–020–11277–y.
 31. Jemai H., Mahmoudi A., Feryeni A. et al. Hepatoprotective Effect of Oleuropein-Rich Extract from Olive Leaves against Cadmium-Induced Toxicity in Mice. *Biomed Res Int.* 2020 Apr 3;2020:4398924. doi: 10.1155/2020/4398924.
 32. Goodarzi Z., Karami E., Yousefi S., Dehdashti A., Bandegi A. R., Ghanbari A. Hepatoprotective effect of atorvastatin on Cadmium chloride induced hepatotoxicity in rats. *Life Sci.* 2020 Aug 1;254:117770. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117770.
 33. Noor K. K., Ijaz M. U., Ehsan N. et al. Hepatoprotective role of vitexin against cadmium-induced liver damage in male rats: A biochemical, inflammatory, apoptotic and histopathological investigation. *Biomed Pharmacother.* 2022 Jun;150:112934. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112934.

34. Zhang C.C., Volkmann M., Tuma S., Stremmel W., Merle U. Metallothionein is elevated in liver and duodenum of Atp7b^(-/-) mice. *Biomaterials*. 2018 Aug;31(4):617–625. doi: 10.1007/s10534-018-0110-x.
35. Pykhteeva A.G., Samokhina N.A., Bolshoy D.V. Experimental basis for use drug esmin for the induction of metallothionein and cadmium toxic effects reduction. *Actual problems of transport medicine*. 2014;36(2-1):94–98. (in Russian)
Пыхтеева А. Г., Самохина Н. А., Большой Д. В. Экспериментальное обоснование возможности использования микроэлементного препарата Эсмин для индукции металлотионеина и снижения токсического действия кадмия. *Актуальные проблемы транспортной медицины*. 2014. 2(1):94–98.
36. Bezruchko N.V., Rubtsov G. C., Grigorieva O. M. Metallothioneins: relationship with oxidative modification of proteins and lipids, monitoring methods. *Tomsk State Pedagogical University Bulletin*. 2015; 11 (164):161–168.
Безручко Н.В., Рубцов Г.К., Григорьева О.М. Металлотионеины: взаимосвязь с окислительной модификацией белков и липидов, методы мониторинга. *Вестник Томского государственного педагогического университета*. 2015;11(164):161–168.
37. Habeebu S.S., Liu J., Liu Y., Klaassen C. D. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium. *Toxicol Sci*. 2000 May;55(1):223–32. doi: 10.1093/toxsci/55.1.223.
38. Malov A. M., Sibiryakov V. K., Ivanenko A. A. Accumulation of cadmium in some organs and tissues of rats. *Clinical Toxicology*. 2013;14(22) 228–240. (in Russian.)
(Available at: <http://www.medline.ru/public/art/tom14/art22.html> accessed 05.05.2023)
- Малов А. М., Сибирыков В. К., Иваненко А. А. Накопление кадмия в некоторых органах и тканях крыс. [Электронный ресурс]. *Клиническая токсикология*. 2013;14(22):228–240. URL: <http://www.medline.ru/public/art/tom14/art22.html>
39. Phuapittayalert L., Saengnantakarn P., Supanpaiboon W., Cheunchoojit S., Hipkaeo W., Sakulsak N. Increasing CACNA1C expression in placenta containing high Cd level: an implication of Cd toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 Dec;23(24):24592–24600. doi: 10.1007/s11356-016-7841-4.
40. Bilde K., Olesen R. H., Ernst E. H. et al. Reduced hepatic metallothionein expression in first trimester fetuses in response to intrauterine smoking exposure: a consequence of low maternal zinc levels? *Hum Reprod*. 2019 Nov 1;34(11):2129–2143. doi: 10.1093/humrep/dez197.
41. Zhang D., Gao J., Zhang K., Liu X., Li J. Effects of chronic cadmium poisoning on Zn, Cu, Fe, Ca, and metallothionein in liver and kidney of rats. *Biol Trace Elem Res*. 2012 Oct;149(1):57–63. doi: 10.1007/s12011-012-9394-9.
42. Hirao-Suzuki M., Takeda S., Sakai G., Waalkes M. P., Sugihara N., Takiguchi M. Cadmium-stimulated invasion of rat liver cells during malignant transformation: Evidence of the involvement of oxidative stress/TET1-sensitive machinery. *Toxicology*. 2021 Jan 15;447:152631. doi: 10.1016/j.tox.2020.152631.
43. Tarabay H.H., Abol-Enein H., Awadalla A., Mortada W. I., Abdel-Aziz A. F. Gene expression and oxidative stress markers profile associated with toxic metals in patients with renal cell carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2022 Feb;49(2):1161–1169. doi: 10.1007/s11033-021-06944-3.