

УДК 577.215.3

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ХЛОРИДА КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *Mt2a* В ПОЧКАХ КРЫС

Гизатуллина А.А., Валова Я.В., Зиятдинова М.М., Мухаммадиева Г.Ф., Каримов Д.О.,
Смолянкин Д.А., Хуснутдинова Н.Ю.

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

*Изучение влияния тяжелых металлов на биологические системы, в том числе на живые организмы, является важным этапом процесса создания безопасной и экологичной среды для функционирования данных систем. Цель работы заключалась в оценке влияния хлорида кадмия в трех различных концентрациях на экспрессию гена *Mt2a* в ткани почек у крыс. Моделирование хронической интоксикации было проведено на белых аутбредных крысах без гендерного предпочтения, разделенных на три группы в зависимости от дозы введенного токсиканта. Оценку экспрессии проводили спустя 3 месяца методом ПЦР в режиме реального времени. В результате исследования было обнаружено статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *Mt2a* после введения раствора хлорида кадмия в концентрации 0,001, 0,01 и 0,1 мг/кг по сравнению с контрольной группой.*

Ключевые слова: экспрессия генов; тяжелые металлы; хлорид кадмия; кадмий; хроническая интоксикация; металлотионеины; ген *Mt2a*.

Для цитирования: Гизатуллина А.А., Валова Я.В., Зиятдинова М.М., Мухаммадиева Г.Ф., Каримов Д.О., Смолянкин Д.А., Хуснутдинова Н.Ю. Оценка влияния хлорида кадмия на экспрессию гена *Mt2a* в почках крыс. Медицина труда и экология человека. 2022;4:124-131.

Для корреспонденции: Гизатуллина Алина Анваровна, младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», e-mail: alinagisa@yandex.ru.

Финансирование: Отраслевая научно-исследовательская программа Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2021-2025 гг. п. 6.1.9. «Экспериментальное обоснование высокочувствительных маркеров воздействия токсичных металлов на организм и разработка мер профилактики».

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2022-10410>

EVALUATION OF THE EFFECT OF CADMIUM CHLORIDE ON *Mt2a* GENE EXPRESSION IN RAT KIDNEYS

Gizatullina A.A., Valova Ya.V., Ziatdinova M.M., Mukhammadiyeva G.F., Karimov D.O.,
Smolyankin D.A., Khusnutdinova N.Yu.

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russia

The study of the influence of heavy metals on biological systems, including living organisms, is an important step in the process of creating a safe and environmentally friendly environment for

the functioning of these systems. The aim of the work was to evaluate the effect of cadmium chloride at three different concentrations on Mt2a gene expression in kidney tissue in rats. Modeling of chronic intoxication was carried out on white outbred rats without gender preference, divided into three groups depending on the dose of the administered toxicant. Expression was evaluated after 3 months by real-time PCR. As a result of the study, a statistically significant increase in the expression level of the Mt2a gene was found after the introduction of a solution of cadmium chloride at a concentration of 0,001, 0,01 and 0,1 mg/kg compared with the control group.

Keywords: *gene expression; heavy metals; cadmium chloride; cadmium; chronic intoxication; metallothioneins; Mt2a gene.*

Citation: *Gizatullina A.A., Valova Ya.V., Ziatdinova M.M., Mukhammadiyeva G.F., Karimov D.O., Smolyankin D.A., Khusnutdinova N.Yu. Evaluation of the effect of cadmium chloride on mt2a gene expression in rat kidneys. Occupational Health and Human Ecology. 2022;4:124-131.*

Correspondence: *Alina A.Gizatullina, Junior Researcher at the Department of Toxicology and Genetics With An Experimental Laboratory, E-mail:alinagisa@yandex.ru.*

Financing: *Branch research program of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being for 2021-2025 p. 6.1.9. «Experimental substantiation of highly sensitive markers of exposure to toxic metals on the body and development of preventive measures»*

Conflict of interest: *The authors declare no conflict of interest.*

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2022-10410>

Изучение влияния тяжелых металлов на биологические системы, в том числе на живые организмы, является важным и необходимым этапом процесса создания безопасной и экологичной среды для функционирования данных систем. Тяжелые металлы являются условной группой химических элементов со свойствами металлов и атомной массой свыше 50 атомных единиц. Особенно токсичными представителями группы являются мышьяк, свинец, кадмий и ртуть [1]. Токсичность низких доз тяжелых металлов, наряду со склонностью к биоаккумуляции, негативно влияет на биологические системы [2].

Ярким представителем группы тяжелых металлов является кадмий, который характеризуется высокой токсичностью, наряду с мышьяком, свинцом, ртутью, хромом и относится к высокоопасным веществам – первого класса опасности [3, 4]. Ежедневно человек с пищей и водой может получить до 40 мкг кадмия. Кроме того, до 20 мкг данного вещества может поступать при вдыхании оксида кадмия (CdO) из загрязненного воздуха вблизи дорог, на производствах, а также с сигаретным дымом, как при активном, так и при пассивном курении [5]. Однако токсические эффекты кадмия в большей степени обусловлены дозой и продолжительностью нахождения вещества в организме, нежели путем поступления.

Пагубное влияние кадмия на организм человека выражается в нарушении сразу нескольких систем. При этом основными органами-мишенями воздействия токсиканта являются печень и почки, поскольку именно в этих органах накапливается подавляющая часть поступающего в организм кадмия. Нарушения функции печени и почек впоследствии влекут за собой сбои в работе сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, эндокринной и

опорно-двигательной систем [6, 7, 8]. Хроническое воздействие металла также может проявляться в расстройстве репродуктивной системы [9, 10, 11].

Высокую проницаемость в клетки тканей организма несвязанный кадмий получил благодаря сродству с кальцием и, соответственно, возможности прохождения сквозь кальциевые каналы клеточных мембран. Однако и соединения кадмия с металлотионеином, которые в малых количествах хранятся в печени или клетках почечных канальцев и участвуют в поддержке окислительно-восстановительного баланса клеток, при накоплении оказывают негативное влияние [12]. Повышенное содержание кадмия в клетках приводит к нарушению метаболических процессов, активному перекисному окислению, разрушению структуры белков и ошибкам в механизмах репарации нуклеиновых кислот [13].

В организме крыс, получавших недостаточное количество кальция, марганца, цинка или железа, задерживалось до восьми раз больше меченого кадмия (^{109}Cd) по сравнению с животными, имеющими в своем рационе достаточное количество минералов в пище [14, 15]. Кроме того, влияние кадмия на организм человека принято канцерогенным. Имеются данные о корреляции длительного воздействия данного вещества с возникновением и прогрессированием злокачественных опухолей легких, мочевого пузыря, молочной, предстательной и поджелудочной желез [16, 17, 18, 19].

Ген *Mt2a* (металлотионеин 2A) кодирует белок семейства металлотионеинов, играющих важнейшую роль в транспорте, депонировании, обмене ионов металлов, защите от металл-индуцированных повреждений, антиоксидантной защите, влияют на иммунный ответ и канцерогенез [20]. Металлотионеин 2A выполняет важную роль в гомеостатическом контроле ионов тяжелых металлов в клетке и в их выведении [21]. Наибольший уровень экспрессии данного гена в организме человека обнаруживается в тканях печени и коры надпочечников [21].

Целью исследования была оценка уровня экспрессии гена *Mt2a* в тканях почек крыс при хронической интоксикации хлоридом кадмия.

Материалы и методы. Для исследования хронической интоксикации хлоридом кадмия были отобраны 40 особей белых аутбредных крыс (170-230 г), которых методом случайной выборки разделили поровну на четыре группы по 5 самцов и 5 самок соответственно. Животным из трех экспериментальных групп ежедневно в течение трех месяцев перорально вводили водный раствор хлорида кадмия согласно методологии. Контрольная группа получала дистиллированную воду без примесей.

Расчет дозировки кадмия выполнен исходя из установленного для данного вещества экспертами ВОЗ и FAO (продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций) показателя временного переносимого недельного потребления (ВПНП) на уровне 7 мкг/кг массы тела человека. Согласно ВПНП, для экспериментальных животных был смоделирован дизайн исследования с расчетом доз токсиканта и контрольного вещества для экспериментальных групп (табл. 1).

Таблица 1

Table 1

Дизайн исследования

The study design

Группа животных	Контрольное вещество, токсикант	Доза вводимого вещества, мг/кг
Cd1	Водный раствор хлорида кадмия (CdCl ₂)	0,001
Cd10	Водный раствор хлорида кадмия (CdCl ₂)	0,01
Cd100	Водный раствор хлорида кадмия (CdCl ₂)	0,1
Контроль	Дистиллированная вода	-

Условия содержания для всех групп животных соответствовали стандартным: постоянство температуры воздуха (20-25°C), уровня влажности и освещенности. Основным нормативным документом по уходу за экспериментальными животными является ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», кроме того, были использованы рекомендации комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздраве России, рекомендации ВОЗ, а также рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Все условия проведения и вывода экспериментальных животных из эксперимента соответствовали международным принципам Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

Животные выводились из эксперимента путем эвтаназии с помощью углекислого газа с последующей декапитацией и вскрытием. К фрагментам почек, извлеченным после декапитации и вскрытия животных, добавляли тризол (Extract RNA), необходимый для лизиса клеток и дальнейшего выделения РНК, образцы с реагентом замораживали в жидком азоте. Для выделения тотальной (суммарной) РНК использовали коммерческий набор ExtractRNA (Evrogen, Москва) с учетом требований протокола. Изучение экспрессии генов в норме и при интоксикации кадмием проводили методом ПЦР в режиме реального времени на приборе Rotor-Gene (QIAGEN, Германия) с использованием олигонуклеотидных специфичных праймеров (Eurogene), в состав которых входит интеркалирующий краситель SYBR Green. Уровень экспрессии мРНК был стандартизирован относительно экспрессии гена белка «домашнего хозяйства» – *GAPDH*. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Анализ экспрессии гена *Mt2a* в почечной ткани показал статистически значимые различия между экспериментальными группами и контролем ($F=10,35$; $p < 0,001$) (рис. 1). Введение водного раствора хлорида кадмия в

течение трех месяцев перорально в дозировке 0,001 мг/кг привело к значительному увеличению уровня транскрипции по сравнению со значением, полученным в группе контроля ($0,00 \pm 0,35$; $2,55 \pm 0,66$; $p < 0,001$). Сопоставимый подъем уровня экспрессии наблюдался и при длительном введении раствора токсиканта в максимальной экспериментальной дозировке 0,1 мг/кг ($2,79 \pm 0,27$; $p < 0,001$). Трехмесячное введение хлорида кадмия в концентрации 0,01 мг/кг также вызвало значимое увеличение уровня транскрипционной активности по сравнению с группой контроля ($1,91 \pm 0,09$; $p = 0,008$), что сравнительно ниже уровня экспрессии гена *Mt2a* при максимальной и минимальной дозировке раствора тяжелого металла, однако данные различия незначимы.

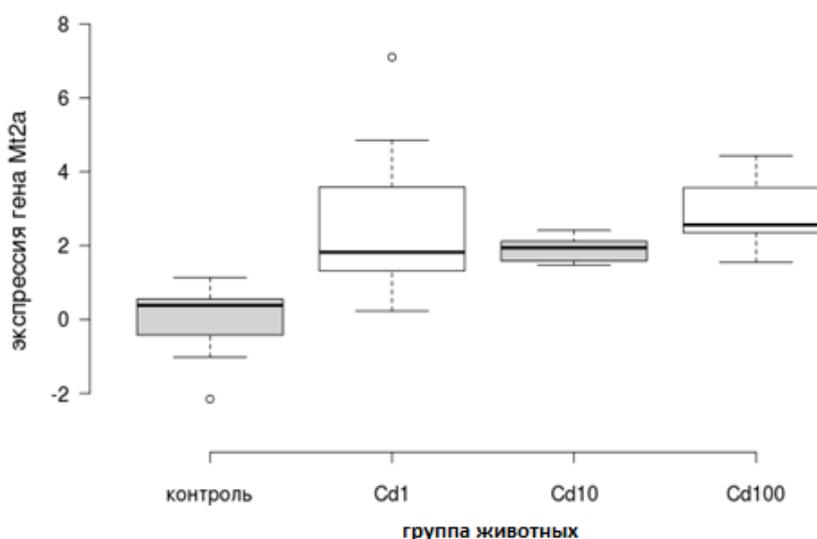


Рис. 1. Экспрессия гена *Mt2a* в почках крыс через 3 месяца интоксикации CdCl_2 в разных группах животных

Fig.1. Expression of the *Mt2a* gene in rat kidneys after 3 months of CdCl_2 intoxication in different groups of animals

Обсуждение. В нашем исследовании введение хлорида кадмия в организм экспериментальных животных в течение трех месяцев привело к значительному повышению уровня экспрессии гена *Mt2a* в тканях почек при различных концентрациях токсиканта. При увеличении концентрации токсичных веществ в организме закономерным событием является и увеличение количества протекторных агентов. Белки семейства металлотионеинов, в частности металлотионеины 2А, выполняют важную роль в транспорте металлов, контролируя в том числе уровень тяжелых металлов и принимая участие в их выведении. Соответственно, уровень экспрессии гена *Mt2a* в норме должен возрастать, особенно в тех органах, которые выполняют барьерную функцию (печень, почки).

В исследовании Безручко Н.В. с соавторами обнаружено, что введение хлорида кадмия в концентрации 1 мг/кг самцам мышей вызывало повышение концентрации металлотионеинов в двадцатикратном объеме [22]. У мышей с нокаутом генов металлотеоненинов развилось разрушение тканей печени, индуцированное соединением кадмия. Максимально переносимая доза тяжелого металла у

мышей с нулевым уровнем экспрессии была в 6-8 раз ниже, а тяжесть воспаления заметно выше, чем у мышей дикого типа [23].

Заключение. Таким образом, в данной работе продемонстрировано значительное повышение уровня экспрессии гена *Mt2a* в почках крыс, подвергнутых хронической интоксикации хлоридом кадмия, по сравнению с контрольной группой.

Список литературы:

1. Wuana RA, Okieimen FE. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available 174 Strategies for Remediation. International Scholarly Research Network ISRN Ecology. 2011; Article ID 402647, 20 pages doi:10.5402/2011/402647.
2. Медведев И.Ф., Деревягин С.С. Тяжелые металлы в экосистемах. Саратов, «Ракурс». 2017.
3. Yildirim S, Celikezen FC, Oto G, et al. An investigation of protective effects of lithium borate on blood and histopathological parameters in acute cadmium-induced rats. Biological trace element research. 2018; 182(2):287–294.
4. Sanjeev S, Bidanchi RM, Murthy MK, et al. Influence of ferulic acid consumption in ameliorating the cadmium-induced liver and renal oxidative damage in rats. Environmental Science and Pollution Research. 2019; 26(20):20631–20653.
5. Environmental health criteria 134: Cadmium. – World Health Organization/International Program on Chemical Safety. Geneva: WHO/IPCS, 1992.
6. Giuseppe G, Maria Stefania S, Graziantonio L, et al. The Effects of Cadmium Toxicity. Int J Environ Res Public Health. 2020; 17(11): 3782. doi: 10.3390/ijerph17113782.
7. Jeong EM, Moon CH, Kim CS, et al. Cadmium stimulates the expression of ICAM-1 via NF-kappaB activation in cerebrovascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 320(3): 887–92. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.218.
8. Shagirtha K, Muthumani M, Prabu SM. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011;15(9):1039–50.
9. Maretová E, Maretta M, Legáth J. Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: a review. Anim Reprod Sci. 2015;155:1–10. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.01.007.
10. Massányi P, Uhrín V, Toman R, et al. Ultrastructural changes of ovaries in rabbits following cadmium administration. Acta Vet Brno. 2005;74(1):29–35. doi: 10.2754/avb200574010029.
11. Kumar S., Sharma A. Cadmium toxicity: Effects on human reproduction and fertility. Rev. Environ. Health. 2019;34:327–338. doi: 10.1515/reveh-2019-0016.
12. Đukić-Čosić D. et al. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. Current Opinion in Toxicology. 2020;(19):56-62.
13. Rana MN, Tangpong J, Rahman MM. Toxicodynamics of lead, cadmium, mercury and arsenic-induced kidney toxicity and treatment strategy: a mini review. Toxicology reports. 2018;(5):704-713.
14. Babaknejad N, et al. The protective roles of zinc and magnesium in cadmium-induced renal toxicity in male wistar rats. Iran J Toxicol. 2015;8:1160-7.
15. Yang H, Shu Y. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. Int J Mol Sci. 2015;16(1):1484-94.

16. Wang, Mengmeng, et al. Time-dependent toxicity of cadmium telluride quantum dots on liver and kidneys in mice: histopathological changes with elevated free cadmium ions and hydroxyl radicals. *International journal of nanomedicine*. 2016; 11: 2319–2328. doi: 10.2147/IJN.S103489
17. Martinez-Zamudio, Ricardo, HyoChol Ha. Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics*. 2011; 6(7): 820–827. doi: 10.4161/epi.6.7.16250.
18. Buha, Aleksandra, et al. Cadmium exposure as a putative risk factor for the development of pancreatic cancer: three different lines of evidence. *BioMed research international*. 2017; 2017: 1981837. doi: 10.1155/2017/1981837
19. Joe Luevano and ChendilDamodaran. A Review of Molecular Events of Cadmium-Induced Carcinogenesis. *J Environ PatholToxicolOncol*. 2014; 33(3): 183–194.
20. JeeyonJeong and David J. Eide. The SLC39 family of metal ion transporters. *Mol Aspects Med*. 2004; 447(5): 796-800. doi: 10.1016/j.mam.2012.05.011
21. ThirumoorthyN, Shyam SunderA, Manisenthil Kumar K. et al. A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology. *World J SurgOnc*2011;9: 54. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-9-54>
22. 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.
23. Habeebu SS, Liu J, Liu Y. Klaassen CD. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium. *Toxicol. Sci*. 2002; 55: 223-232.

References:

1. Wuana RA, Okieimen FE. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available 174 Strategies for Remediation. *International Scholarly Research Network ISRN Ecology*. 2011; Article ID 402647, 20 pages doi:10.5402/2011/402647.
2. Medvedev I.F., Derevyagin S.S. Heavy metals in ecosystems. Saratov, «Rakurs». 2017. (In Russ.)
3. Yildirim S, Celikezen FC, Oto G, et al. An investigation of protective effects of lithium borate on blood and histopathological parameters in acute cadmium-induced rats. *Biological trace element research*. 2018; 182(2):287–294.
4. Sanjeev S, Bidanchi RM, Murthy MK, et al. Influence of ferulic acid consumption in ameliorating the cadmium-induced liver and renal oxidative damage in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019; 26(20):20631–20653.
5. Environmental health criteria 134: Cadmium. – World Health Organization/International Program on Chemical Safety. Geneva: WHO/IPCS, 1992.
6. Giuseppe G, Maria Stefania S, Graziantonio L, et al. The Effects of Cadmium Toxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(11): 3782. doi: 10.3390/ijerph17113782.
7. Jeong EM, Moon CH, Kim CS, et al. Cadmium stimulates the expression of ICAM-1 via NF-kappaB activation in cerebrovascular endothelial cells. *BiochemBiophys Res Commun*. 2004; 320(3): 887–92. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.218.

8. Shagirtha K, Muthumani M, Prabu SM. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15(9):1039–50.
9. Marettová E, Mareta M, Legáth J. Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: a review. *AnimReprod Sci*. 2015;155:1–10. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.01.007.
10. Massányi P, Uhrín V, Toman R, et al. Ultrastructural changes of ovaries in rabbits following cadmium administration. *Acta Vet Brno*. 2005;74(1):29–35. doi: 10.2754/avb200574010029.
11. Kumar S., Sharma A. Cadmium toxicity: Effects on human reproduction and fertility. *Rev. Environ. Health*. 2019;34:327–338. doi: 10.1515/reveh-2019-0016.
12. Đukić-Čosić D. et al. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. *Current Opinion in Toxicology*. 2020;(19):56-62.
13. Rana MN, Tangpong J, Rahman MM. Toxicodynamics of lead, cadmium, mercury and arsenic-induced kidney toxicity and treatment strategy: a mini review. *Toxicology reports*. 2018;(5):704-713.
14. Babaknejad N, et al. The protective roles of zinc and magnesium in cadmium-induced renal toxicity in male wistar rats. *Iran J Toxicol*. 2015;8:1160-7.
15. Yang H, Shu Y. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):1484-94.
16. Wang, Mengmeng, et al. Time-dependent toxicity of cadmium telluride quantum dots on liver and kidneys in mice: histopathological changes with elevated free cadmium ions and hydroxyl radicals. *International journal of nanomedicine*. 2016; 11: 2319–2328. doi: 10.2147/IJN.S103489
17. Martinez-Zamudio, Ricardo, HyoChol Ha. Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics*. 2011; 6(7): 820–827. doi: 10.4161/epi.6.7.16250.
18. Buha, Aleksandra, et al. Cadmium exposure as a putative risk factor for the development of pancreatic cancer: three different lines of evidence. *BioMed research international*. 2017; 2017: 1981837. doi: 10.1155/2017/1981837
19. Joe Luevano and Chendil Damodaran. A Review of Molecular Events of Cadmium-Induced Carcinogenesis. *J Environ PatholToxicolOncol*. 2014; 33(3): 183–194.
20. Jeeyon Jeong and David J. Eide. The SLC39 family of metal ion transporters. *Mol Aspects Med*. 2004; 447(5): 796-800. doi: 10.1016/j.mam.2012.05.011
21. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K. et al. A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology. *World J SurgOnc* 2011;9: 54. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-9-54>
22. Bezruchko NV., Rubtsov GK., Grigorieva OM. Metallothioneins: relationship with oxidative modification of proteins and lipids, monitoring methods. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta*. 2015;11 (164):161-168. (In Russ.)
23. Habeebu SS, Liu J, Liu Y. Klaassen CD. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium. *Toxicol. Sci*. 2002; 55: 223-232.

Поступила/Received: 31.09.2022

Принята в печать/Accepted: 31.10.2022