

УДК 577.215.3

## ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ГЕНОВ MT2A И MT3 В ПЕЧЕНИ И ПОЧКАХ КРЫС В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ РАЗНЫХ ДОЗ ХЛОРИДА КАДМИЯ

Зиатдинова М.М., Валова Я.В., Мухаммадиева Г.Ф., Фазлыева А.С., Каримов Д.О., Хуснутдинова Н.Ю.

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

*Цель данной работы заключалась в изучении экспрессии генов металлотioneина в печени и почках крыс при остром отравлении хлоридом кадмия. Моделирование отравления хлоридом кадмия проводили на белых беспородных крысах женского пола, разделенных на 4 группы в зависимости от дозы введенного токсиканта. В качестве материалов исследования использовали образцы РНК, выделенные из печени и почек крыс. При минимальной дозе, которая была использована в данном эксперименте (0,029 мг/кг), кратность экспрессии гена MT3 в почках была повышена, с увеличением дозировки уровень экспрессии данного гена снижался, но не ниже показателей контроля. Анализ экспрессии этого же гена в печени показал склонность к снижению содержания транскриптов при увеличении дозы. Активность же гена MT2A с увеличением дозы хлорида кадмия повышалась как в печени, так и в почках. Полученные результаты показали статистически значимые дозозависимые изменения кратности экспрессии генов металлотioneина через 24 часа после введения хлорида кадмия.*

**Ключевые слова:** металлотioneины, хлорид кадмия, экспрессия генов.

**Для цитирования:** Зиатдинова М.М., Валова Я.В., Мухаммадиева Г.Ф., Фазлыева А.С., Каримов Д.О., Хуснутдинова Н.Ю. Оценка активности генов MT2A и MT3 в печени и почках крыс в ответ на введение разных доз хлорида кадмия. Медицина труда и экология человека. 2021;1:93-101

**Для корреспонденции:** Зиатдинова Мунира Мунировна, м.н.с. отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», [munira.munirovna@yandex.ru](mailto:munira.munirovna@yandex.ru)

**Финансирование:** Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора «Гигиеническое научное обоснование минимизации рисков здоровью населения России» на 2016-2020 годы по теме 3.4, № гос. регистрации AAAA-A16-116022610048-5.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2021-10109>

## ESTIMATION OF THE ACTIVITY OF THE MT2A AND MT3 GENES IN THE LIVER AND KIDNEY OF RATS IN RESPONSE TO THE ADMINISTRATION OF DIFFERENT DOSES OF CADMIUM CHLORIDE

Ziatdinova M.M., Valova Ya.V., Mukhammadieva G.F., Fazlyeva A.S., Karimov D.O., Khusnutdinova N.Yu.

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

*The aim of this work was to study the expression of genes of metallothionein in the liver and kidneys of rats during acute poisoning with cadmium chloride. Simulation of poisoning with cadmium chloride was carried out on white outbred female rats, divided into 4 groups depending on the dose of the injected toxicant. RNA samples isolated from rat liver and kidneys were used as research materials. At the minimum dose that was used in this experiment (0.029 mg / kg), the frequency of MT3 gene expression in the kidneys was increased; with increasing dosage, the expression level of this gene decreased, but not lower than the control values. Analysis of the expression of the same gene in the liver showed a tendency to decrease the content of transcripts with increasing doses. The activity of the MT2A gene, with an increase in the dose of cadmium chloride, increased both in the liver and in the kidneys. The results obtained showed statistically significant dose-dependent changes in the frequency of expression of genes of metallothionein 24 hours after administration of cadmium chloride.*

**Key words:** metallothioneins, cadmium chloride, gene expression.

**Citation:** Ziatdinova M.M., Valova Ya.V., Mukhammadieva G.F., Fazlyeva A.S., Karimov D.O., Khusnutdinova N.Yu. Assessment of the activity of MT2A and MT3 genes in liver and kidneys of rats in response to administration of different doses of cadmium chloride. *Occupational health and human ecology*. 2021: 1:93-101

**Correspondence:** Munira M. Ziatdinova, Junior researcher, Department of Toxicology and Genetics, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, [munira.munirovna@yandex.ru](mailto:munira.munirovna@yandex.ru)

**Financing:** The work was carried out at the expense of subsidies for fulfilling a state task within the framework of the sectoral research program of Rospotrebnadzor "Hygienic scientific substantiation of minimizing risks to the health of the Russian population" for 2016-2020 on topic 3.4, No of state registration AAAA-A16-116022610048-5.

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2021-10109>

Актуальность проблемы загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) объясняется, прежде всего, широким спектром их действия на организм человека. ТМ влияют практически на все системы организма, оказывая токсическое, аллергическое, канцерогенное и гонадотропное действие [1]. Доказано эмбриотоксическое действие ТМ через фетопланцентарную систему, а также их способность вызывать наследственные изменения-мутации [2].

К числу наиболее высокотоксичных и широко распространенных промышленных загрязнителей окружающей среды среди ТМ относится кадмий (Cd). Cd вызывает перекисное окисление мембранных липидов, деградацию системы антиоксидантной защиты, способствует возникновению воспалительных реакций. В результате токсического действия Cd на ферментную систему человека и экспериментальных животных нарушаются многие процессы метаболизма, возникает дисфункция митохондрий и повреждение клеточных мембран в связи с образованием свободных радикалов. Интоксикация Cd сопровождается нарушениями синтеза белка и изменениями в структуре нуклеиновых кислот, что, в свою очередь, приводит к ингибированию восстановительной способности

ДНК [3, 4]. К тому же по своим химическим свойствам Cd близок к цинку (Zn) и способен замещать его в активных центрах металлсодержащих ферментов [5].

Наиболее выраженный ингибирующий эффект Cd оказывает на антиоксидантную защитную систему, что ведет к окислительному повреждению клеток. Индуцируемые им процессы перекисного окисления липидов являются одной из главных причин неблагоприятного влияния на мембранозависимые функции клеток [6]. Cd обладает активными канцерогенными свойствами, а хроническая интоксикация Cd нередко ассоциируется с раком почек, легких, мочевого пузыря, предстательной и поджелудочной железы [7].

Кроме канцерогенного действия, Cd обладает мутагенным, а в условиях эксперимента — и тератогенным эффектом, что связано с повреждением клеток плаценты и эмбриональных тканей на ранних стадиях органогенеза [8].

Воздействие тяжелых металлов приводит к усилению активности многих генов, что приводит к экспрессии белков, участвующих в элиминации металлов, либо восстановлению вызванных ими повреждений. Большая часть Cd в организме связана с небольшим, богатым цистеином, металлсвязывающим белком металлотионеином (MT) [9]. Известно, что MT участвуют в гомеостазе и транспорте эссенциальных (Zn, Cu) и элиминации токсичных металлов (Cd, Hg), принимают участие в процессах апоптоза, модуляции внутриклеточного редокс-баланса, к тому же они способны проявлять противовоспалительные свойства [10].

**Целью** данного исследования было сравнительное изучение дозозависимой экспрессии генов *MT2A* и *MT3* через 24 часа после введения хлорида кадмия.

**Материалы и методы исследования.** Всего в эксперименте использовано 35 белых аутбредных крыс женского пола (по 10 голов в экспериментальных группах и 5 - в контрольной) массой 210–280 г. Условия содержания и кормления были одинаковы для всех групп животных. При уходе за животными, питании и проведении экспериментов руководствовались базисными нормативными документами с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Острое отравление кадмием моделировали путем однократного перорального введения крысам водного раствора  $CdCl_2$  (дихлорид кадмия) в дозе 0,029 мг/кг, 0,29 мг/кг и 2,9 мг/кг массы тела. Контрольной группе животных перорально вводили дистиллированную воду. Кусочки печени и почек сразу после декапитации животных и их вскрытия замораживали жидким азотом и заливали ExtractRNA (ЗАО Евроген, Россия). Тотальную РНК экстрагировали в соответствии с инструкциями производителя. Очищенную РНК, выделенную из печени и почек каждой крысы, подвергали обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы MMLV и праймеров олиго-dT (№ кат. № SK021, Евроген). Анализ экспрессии генов выполняли методами ПЦР в реальном времени на приборе Rotor-Gene (QIAGEN, Германия) с использованием олигонуклеотидспецифических праймеров (Eurogene), содержащих интеркалирующий краситель SYBR Green (№ кат. № PB025S, Евроген). Конструирование праймеров qPCR проводили с помощью программы PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies, США). Нормализацию уровня экспрессии осуществляли с использованием гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Статистический анализ выполнялся с использованием программы SPSS 19.0 (IBM, США). Нормальность распределения оценивалась с помощью

критерия Колмогорова-Смирнова. Различия между группами определяли с помощью критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа.

**Результаты и обсуждение.** Нами был проведен анализ транскрипционной активности гена *MT2A* в тканях печени и почек в зависимости от дозы хлорида кадмия. Анализ кратности экспрессии гена *MT2A* в почечной ткани крыс не показал статистически значимых различий между группами ( $F=0,68$ ;  $p=0,74$ ; рис. 1). При введении минимальной дозы  $CdCl_2$  ( $0,029$  мг/кг) количество транскриптов изучаемого гена понизилось по сравнению с группой контроля ( $-0,54 \pm 0,66$  и  $-1,81 \pm 0,41$  соответственно). Однако дальнейшее повышение дозы  $CdCl_2$  с  $0,029$  до  $2,9$  мг/кг способствовало плавному повышению кратности экспрессии ( $-1,81 \pm 0,41$ ;  $-1,06 \pm 0,87$ ;  $-0,45 \pm 0,88$ ;  $p=0,883$ ).

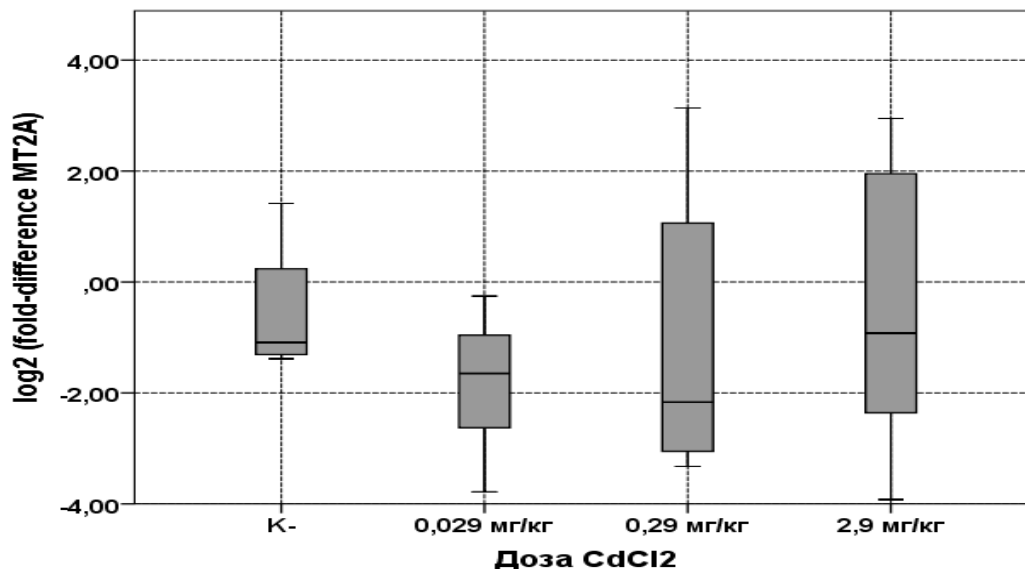


Рис. 1. Кратность экспрессии гена *MT2A* в почках при пероральном введении раствора  $CdCl_2$  через 24 часа

Оценка кратности экспрессии того же гена в тканях печени также не выявила статистически значимых различий между группами ( $F=5,22$ ;  $p=0,987$ ; рис. 2). Введение  $CdCl_2$  в дозе  $0,029$  мг/кг привело к снижению уровня транскриптов по сравнению со значением контроля ( $-1,32 \pm 1,32$  и  $-1,76 \pm 0,38$  соответственно). При увеличении дозы до  $0,29$  мг/кг кратность экспрессии резко возросла, достигнув своего максимального значения ( $-1,76 \pm 0,38$ ;  $2,26 \pm 0,97$ ;  $p=0,005$ ). При дальнейшем увеличении дозировки до  $2,9$  мг/кг отмечалось уменьшение количества транскриптов ( $2,26 \pm 0,97$ ;  $0,26 \pm 0,74$ ;  $p=0,276$ ), однако их уровень оставался выше показателей контроля ( $p=0,636$ ).

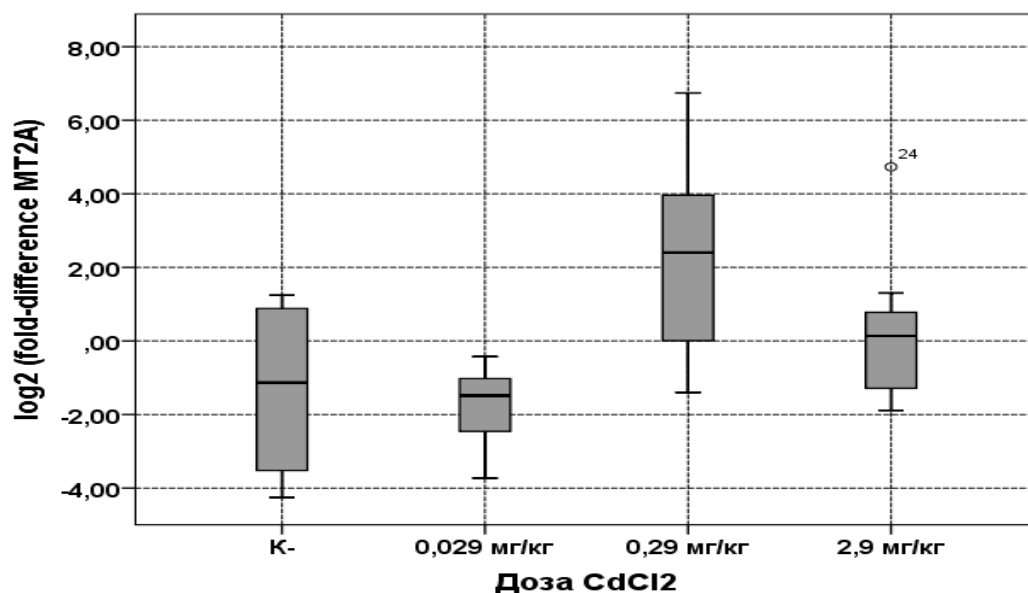
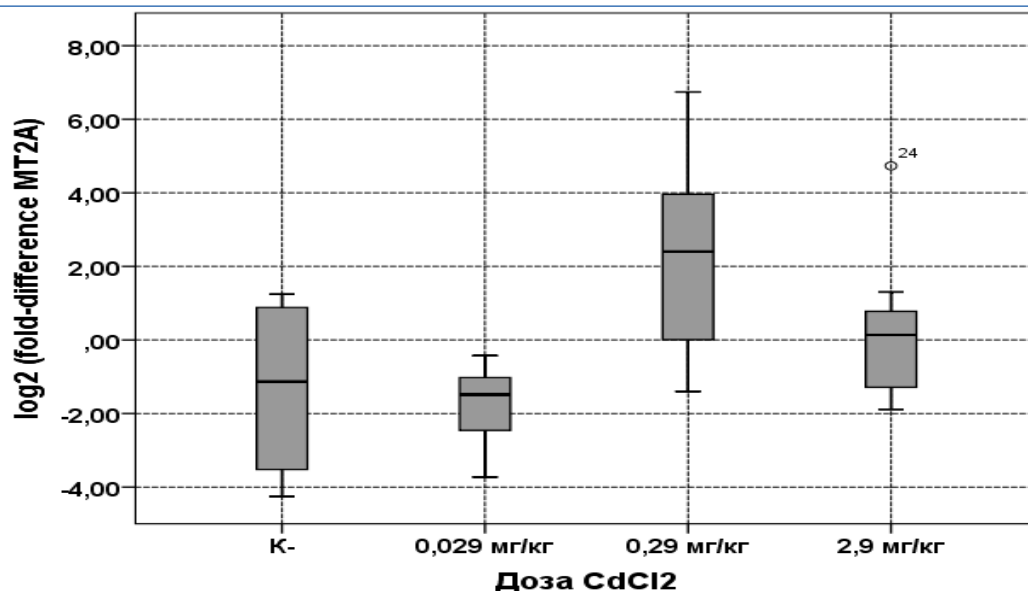


Рис. 2. Кратность экспрессии гена *MT2A* в печени при пероральном введении раствора  $\text{CdCl}_2$  через 24 часа

Анализ представленности транскриптов гена *MT3* в почечной ткани показал статистически значимые различия между группами ( $F=6,66$ ;  $p=0,019$ ; рис. 3). Наиболее выраженная реакция в ответ на воздействие токсиканта была установлена при минимальной дозе  $\text{CdCl}_2$ , которая была использована в данном эксперименте ( $-0,35 \pm 0,54$ ;  $3,60 \pm 0,62$ ). Однако увеличение дозы  $\text{CdCl}_2$  до  $0,29$  мг/кг приводило к спаду кратности экспрессии в сравнении с группой, получавшей  $\text{CdCl}_2$  в дозе  $0,029$  мг/кг ( $3,60 \pm 0,62$ ;  $-0,14 \pm 0,75$ ;  $p=0,006$ ), с последующим повышением представленности транскриптов при достижении дозы  $2,9$  мг/кг ( $-0,14 \pm 0,75$ ;  $-0,1 \pm 0,86$ ;  $p=1,000$ ).

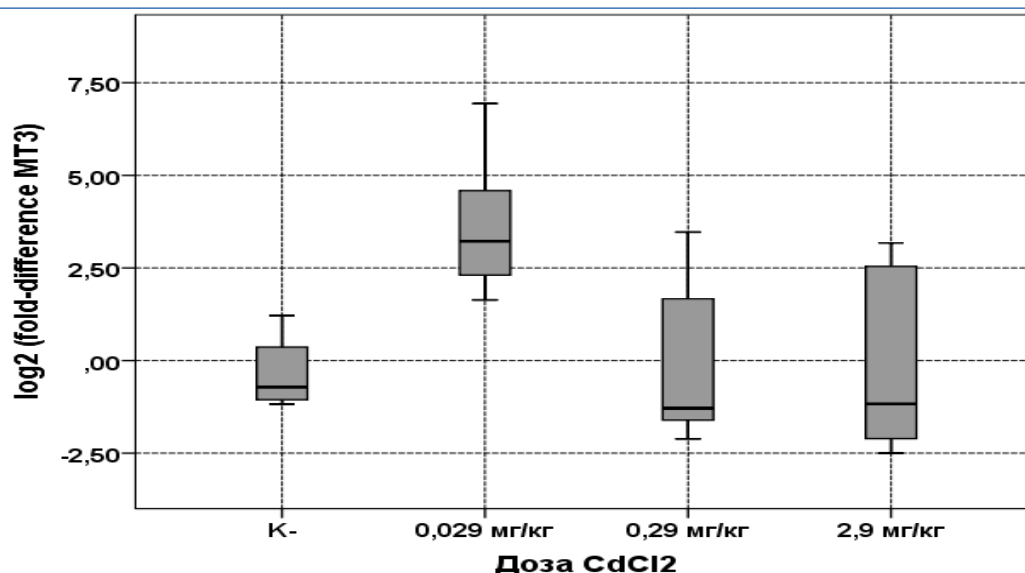


Рис. 3. Кратность экспрессии гена *MT3* в почках при пероральном введении раствора CdCl<sub>2</sub> через 24 часа

Изменение экспрессии гена *MT3* в тканях печени было статистически значимым ( $F=17,59$ ;  $p=0,001$ ; рис. 4). Отмечено, что с увеличением дозы CdCl<sub>2</sub> происходило снижение количества соответствующих транскриптов ( $3,64\pm 0,62$ ;  $-7,07\pm 0,46$ ;  $-12,88\pm 1,34$ ;  $-14,48\pm 0,91$ ;  $p=0,001$ ).

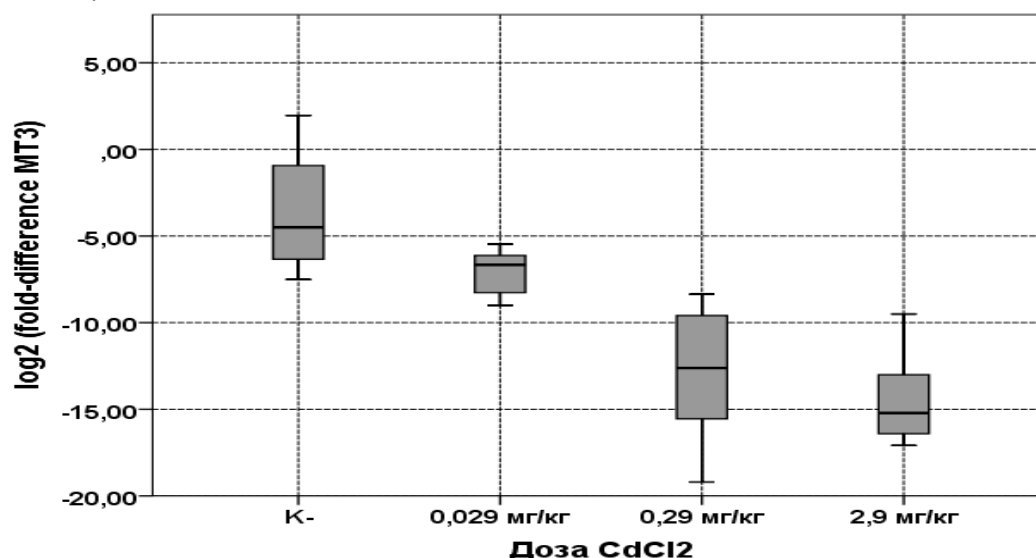


Рис. 4. Кратность экспрессии гена *MT3* в печени при пероральном введении раствора CdCl<sub>2</sub> через 24 часа

Кадмий относится к числу одних из самых токсичных тяжелых металлов, и его токсичность можно считать разнонаправленной. Ионы Cd проявляют высокое сродство к биологическим структурам, содержащим сульфгидрильные (SH-) и дисульфидные группы (–S–S–), вызывая нарушение их функций. Cd не способен генерировать свободные радикалы напрямую, однако после воздействия кадмия наблюдается повышенная продукция активных форм кислорода (АФК), а именно супероксидных и гидроксильных радикалов, а также перекиси водорода. Кадмий индуцирует окислительный стресс и выработку АФК, которые обычно сбалансированы ферментативными и неферментативными (глутатионы, витамины С,

Е) антиоксидантными барьерами. Вызванный данным токсином окислительный стресс приводит к окислению и повреждению биологически важных макромолекул, таких как белки, ДНК, липиды и фосфолипиды клеточных мембран. Кроме того, снижая мембранный потенциал в митохондриях, кадмий нарушает окислительное фосфорилирование и синтез АТФ [11].

Активность и функционирование МТ зависит от их распределения внутри клетки, а также экспрессии этих белков в различных типах ткани. Индукция экспрессии МТ тяжелыми металлами, последующее их накопление в тканях и его выведение из организма нередко используется в качестве биомаркера в области экологической токсикологии [11].

В проведенном нами эксперименте кратность экспрессии гена *MT2A* имела склонность к снижению относительно значений контроля при малых дозах  $CdCl_2$ , как в печеночной ( $p=0,006$ ), так и в почечной тканях ( $p=0,573$ ). Однако дальнейшее повышение дозы  $CdCl_2$  способствовало усилению активности гена *MT2A*, что можно связать с началом работы антиоксидантной системы в ответ на введение токсиканта либо со сбоями нормального функционирования клетки [12].

Оценивая активность гена *MT3* в почечной ткани мы наблюдали максимальный уровень транскриптов при дозе 0,029 мг/кг  $CdCl_2$  и незначительные повышения при введении токсиканта в более высоких дозах ( $p=0,002$ ). Вероятно, интоксикация  $CdCl_2$  при дозе 0,029 мг/кг вызывает повреждения клеточных структур, которые впоследствии поддаются репарации, однако с увеличением дозы  $CdCl_2$  это становится невозможным, что, по-видимому, связано с истощением пула адаптационного потенциала системы антиоксидантной защиты.

Анализ экспрессии гена *MT3* в печени позволил установить неуклонное снижение содержания транскриптов с повышением дозы  $CdCl_2$  ( $p=0,001$ ). В отличие от гена *MT2A*, который экспрессируется практически во всех органах, активность гена *MT3* ограничивается центральной нервной системой. К тому же было показано, что биосинтез изоформы *MT2A* индуцируется целым рядом факторов, включая глюкокортикоиды, цитокины, активные формы кислорода и ионы металлов, в то время как экспрессия *MT3* не реагирует на данные факторы стресса [13]. Однако в работе Nozumi I. с соавт. было обнаружено, что *MT3* экспрессируется в некоторых периферических органах, включая незначительную активность гена в почечных клетках крыс [14]. Исходя из этого, можно объяснить отрицательную экспрессию гена *MT3* в тканях печени и присутствие его активности в почечной ткани.

**Заключение.** В данной работе мы обнаружили статистически значимые дозозависимые изменения кратности экспрессии гена металлотионеина спустя сутки после введения  $CdCl_2$ . Однако обнаруженные нами различия требуют дальнейшего исследования в данном направлении, так как, вероятно, существуют различия в уровне экспрессии генов на более ранних или поздних сроках действия токсиканта.

#### Список литературы:

1. Теплая Г.А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды. Астраханский вестник экологического образования. 2013;1(23):182-192.
2. Saini, Shivi, Neena Nair, and Mali Ram Saini. Embryotoxic and teratogenic effects of nickel in Swiss albino mice during organogenetic period. BioMed research international. 2013; 2013: 701439. doi: 10.1155/2013/701439.

3. Milena Andjelkovic, et al. Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019; 16(2):274. doi: 10.3390/ijerph16020274.
4. Unsal, Velid, et al. The role of natural antioxidants against reactive oxygen species produced by cadmium toxicity: a review. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2020;10(2):184–202. doi: [10.34172/apb.2020.023](https://doi.org/10.34172/apb.2020.023).
5. Parameswaran Aravind, Majeti Narasimha Vara Prasad. Cadmium-zinc interactions in hydroponic system using *Ceratophyllum demersum*: adaptive plant ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2005.17(1):3-20. doi:10.1590/S1677-04202005000100002.
6. Кривошеев А.Б., Потеряева Е.Л., Кривошеев Б.Н., Куприянова Л.Я., Смирнова Е.Л. Токсическое действие кадмия на организм человека. *Медицина труда и промышленная экология*. 2012;6:35-42.
7. Xiao, C. L., et al. Research progress of the mechanisms underlying cadmium-induced carcinogenesis. *Zhonghua yu Fang yi xue za zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]*. 2016;50(4):380-4. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.04.021.
8. Díaz, M. del C., et al. Effect of a single dose of cadmium on pregnant Wistar rats and their offspring. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014; 49(6):1049-1056. doi: 10.1111/rda.12439.
9. Joanna Homa, Stephen R. Stürzenbaum, and Elzbieta Kolaczowska. Metallothionein 2 and Heat Shock Protein 72 Protect *Allolobophora chlorotica* from Cadmium But Not Nickel or Copper Exposure: Body Malformation and Coelomocyte Functioning. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2016;71:267–277. doi: 10.1007/s00244-016-0276-6.
10. Daniel Juárez-Rebollar, Camilo Rios, Concepción Nava-Ruíz, and Marisela Méndez-Armenta. Metallothionein in Brain Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017; 2017: 5828056. doi: 10.1155/2017/5828056.
11. Giuseppe Genchi, Maria Stefania Sinicropi, Graziantonio Lauria, Alessia Carocci, and Alessia Catalano. The Effects of Cadmium Toxicity. *International journal of environmental research and public health*. 2020;17(11):3782. doi: 10.3390/ijerph17113782.
12. Xue-Bin Ling et al. Mammalian Metallothionein-2A and Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(9):1483. doi: 10.3390/ijms17091483.
13. Milan Vašák and Gabriele Meloni. Mammalian Metallothionein-3: New Functional and Structural Insights. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6):1117. doi: 10.3390/ijms18061117
14. Hozumi I. et al. Metallothionein-3 is expressed in the brain and various peripheral organs of the rat. *Neuroscience letters*. 2008;438(1): 54–58. doi: 10.1016/j.neulet.2008.04.047.

## References:

1. Tyeplaya G.A. *Heavy metals as a factor of environmental pollution. Astrakhan Bulletin of Environmental Education*. 2013;1(23):182-192.
2. Saini, Shivi, Neena Nair, and Mali Ram Saini. *Embryotoxic and teratogenic effects of nickel in Swiss albino mice during organogenetic period. BioMed research international* 2013; 2013: 701439. doi: 10.1155/2013/701439.



3. Milena Andjelkovic, et al. Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019;16(2):274. doi: 10.3390/ijerph16020274.
4. Unsal, Velid, et al. The role of natural antioxidants against reactive oxygen species produced by cadmium toxicity: a review. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2020;10(2):184–202. doi: 10.34172/apb.2020.023.
5. Parameswaran Aravind, Majeti NarasimhaVara Prasad. Cadmium-zinc interactions in hydroponic system using *Ceratophyllum demersum*: adaptive plant ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2005.17(1):3-20. doi:10.1590/S1677-04202005000100002.
6. Krivosheev A.B. , Poteryaeva E.L., Krivosheev B.N., Kupriyanova L.Ya., Smirnova E.L. Toxic effect of cadmium on the human body. *Occupational health and industrial ecology*. 2012; 6: 35-42.
7. Xiao, C. L., et al. Research progress of the mechanisms underlying cadmium-induced carcinogenesis. *Zhonghuayu Fang yixuezhazhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]*. 2016; 50(4):380-4. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.04.021.
8. Díaz, M. del C., et al. Effect of a single dose of cadmium on pregnant Wistar rats and their offspring. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014;49(6):1049-1056. doi: 10.1111/rda.12439.
9. Joanna Homa, Stephen R. Stürzenbaum, and Elzbieta Kolaczowska. Metallothionein 2 and Heat Shock Protein 72 Protect *Allolobophora chlorotica* from Cadmium But Not Nickel or Copper Exposure: Body Malformation and Coelomocyte Functioning. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2016;71:267–277. doi: 10.1007/s00244-016-0276-6.
10. Daniel Juárez-Rebollar, Camilo Rios, Concepción Nava-Ruíz, and Marisela Méndez-Armenta. Metallothionein in Brain Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017:5828056. doi: 10.1155/2017/5828056.
11. Giuseppe Genchi, Maria Stefania Sinicropi, Graziantonio Lauria, Alessia Carocci, and Alessia Catalano. The Effects of Cadmium Toxicity. *International journal of environmental research and public health*. 2020;17(11):3782. doi: 10.3390/ijerph17113782.
12. Xue-Bin Ling et al. Mammalian Metallothionein-2A and Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(9):1483. doi: 10.3390/ijms17091483.
13. Milan Vašák and Gabriele Meloni. Mammalian Metallothionein-3: New Functional and Structural Insights. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6):1117. doi: 10.3390/ijms18061117
14. Hozumi I. et al. Metallothionein-3 is expressed in the brain and various peripheral organs of the rat. *Neuroscience letters*. 2008;438(1):54–58. doi: 10.1016/j.neulet.2008.04.047.

Поступила/Received: 25.02.2021

Принята в печать/Accepted: 12.03.2021