

УДК 615.9

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ АОС ОРГАНИЗМА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТОКСИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГОРЕНИЯ ПВХ

*Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В., Самохина Н.А., Стужук Е.С.,
Третьяков А.М.*

Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса

Ключевые слова: металлотионеин, ПВХ, горение полимеров, оксидативный стресс

Введение

Горение полимерных материалов сопровождается выделением большого количества разнообразных токсических веществ (неорганические соединения – оксиды углерода, азота, хлороводород (для ПВХ), различные по составу соединения тяжелых металлов, хлорорганические соединения, продукты неполного окисления и т.п.). Одним из механизмов комплексного токсического действия сложной смеси соединений выступает оксидативный стресс, который можно диагностировать по увеличению в тканях лабораторных животных, подвергшихся такому воздействию, продуктов перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид МДА) и изменению активности антиоксидантной системы (АОС).

Как известно [1], интенсификация свободнорадикальных процессов, перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот наблюдается при развитии общего неспецифического адаптационного синдрома (стресса), т. е. практически при большинстве острых заболеваний и состояний, обострении хронических заболеваний, интоксикациях, ожогах, травмах, операциях и т. п. В основе биологической целесообразности этой интенсификации лежит усиление в возникающих экстремальных условиях синтеза эйкозаноидов, обновления мембран, детоксикационных (обезвреживающих) процессов. Накопление активных форм кислорода, перекисей в значительных количествах (как это наблюдается при действии радиации, ультрафиолетового излучения,

гипербарической оксигенации, интоксикациях, в том числе алкоголем, а также токсичными продуктами горения полимерных материалов) может сопровождаться целым рядом негативных изменений.

АОС клетки представлена низкомолекулярными соединениями – ловушками радикалов (витамины А, С, Е и К, биофлавоноиды, низкомолекулярные тиолы (глутатион и эрготионеин)), а также антиперекисными ферментами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза и т.д.). Как показали многочисленные исследования последних лет, [2, 3, 4, 5] низкомолекулярный металлотранспортный белок металлотионеин (МТн) может поглощать реактивные разновидности кислорода, особенно гидроксильные радикалы. Механизм антиоксидантного действия МТн на сегодня до конца не выяснен. В одной из последних работ [6] на основании данных, полученных *in vitro*, показано, что в условиях окислительного стресса МТн теряет цинк. К такому изменению в строении МТн приводит окисление сульфгидрильных групп с формированием дисульфидной связи.

Цель работы

В эксперименте *in vivo* изучить влияние предварительной индукции МТн на воздействие токсичных продуктов горения ПВХ на биохимические показатели белых крыс.

Материалы и методы

Лабораторные животные – самцы белых крыс массой 180-220 г, содержащиеся на общевиварном рационе, были раз-

делены на 4 группы по 5 животных в каждой. 1-я группа служила контролем. Животным 2-й и 4-й групп ввели хлорид кадмия в дозе 1 мг/кг. На следующий день после введения кадмия животных 2-4 групп подвергли ингаляционному воздействию токсичных продуктов горения (ТПГ) поливинилхлорида (ПВХ). Предварительно методами аналитической химии было доказано, что при горении этого материала в воздух выделяются оксиды углерода, азота, хлороводород, различные по составу соединения тяжелых металлов (в основном свинца и цинка), продукты

неполного окисления органических соединений, в т.ч. формальдегид, а также целый ряд органических соединений (в т.ч. хлорсодержащих), идентифицировать которые методом ГЖХ не удалось. Навеска образца была подобрана таким образом, чтобы ингаляционное воздействие продуктов ее сгорания в течение 30 минут не вызывало гибели животных, и была одинакова в серии экспериментов. Уровень кислорода в затравочной камере не снижался ниже 18 %.

Через сутки после ингаляционного воздействия ТПГ ПВХ животные были выведены из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом. Все манипуляции с животными проводили с соблюдением всех правил биоэтики.

Интегральная схема эксперимента представлена на рис. 1.

Определение активности ферментов проводили по стандартным методикам [7], содержание металлотioneина - по методике разработанной нами [8]. Содержание ТМ в пластике и продуктах горения определяли методом АЭС. Для определения перехода металлов в процессе горения в пароаэрозольную фазу проводили последовательную сорбцию ТПГ на твердом (вата) сорбенте и абсорбцию в раствор азотной кисло-

ты.

Схему установки можно видеть на рис. 2. Предварительными исследованиями нами было показано, что при этом улавливается 92-95 % металлов, переходящих в пароаэрозольную фазу и способных к воздействию на организм при ингаляционном


Группа	1-контроль	2 - Cd	3 - ТПГ	4 – Cd+ТПГ
1 день	-	Введение 0,1 мг/кг Cd ²⁺	-	Введение 0,1 мг/кг Cd ²⁺
2 день	-	Ингаляционное воздействие ТПГ ПВХ		
3 день	Выведение из эксперимента			
				
1. Морфометрия 2. Биохимические исследования (определение активности ГР, ГП, Г-6-ФДГ, ЛДГ, а также концентрации МТн и МДА в тканях печени и почек) 3. Определение содержания металлов в тканях печени и почек				

Рис.1. Интегральная схема эксперимента.

воздействию.

Результаты и их обсуждение

Металлы входят в состав многих полимеров, однако самое большое их содержание наблюдается в поливинилхлоридных пластиках. Кроме того, при термоокислительной деструкции ПВХ при температурах 400-750 °С выделяется большое количество паров хлороводородной кислоты, которая способствует образованию достаточно летучих соединений многих тяжелых металлов, особенно меди, свинца, кадмия и цинка, которые в ПВХ содержатся в большом количестве [9]. Эти соединения, наряду с металлами, сорбированными на частицах дыма и сажи, уносятся из зоны горения в затравочную камеру и оказывают токсическое действие при аэрозольном воздействии на животных в комплексе с оксидом и диоксидом углерода, парами хлороводородной кислоты, оксидами хлора в разных степенях окисления, хлорорганическими соединениями и т.п.

При горении изучаемого материала ПВХ при 350 °С в воздух выделялось с 1 грамма материала свинца 0,388 мг, алюминия 9,2 мг, олова 2,5 мг, а также менее значительные количества других металлов

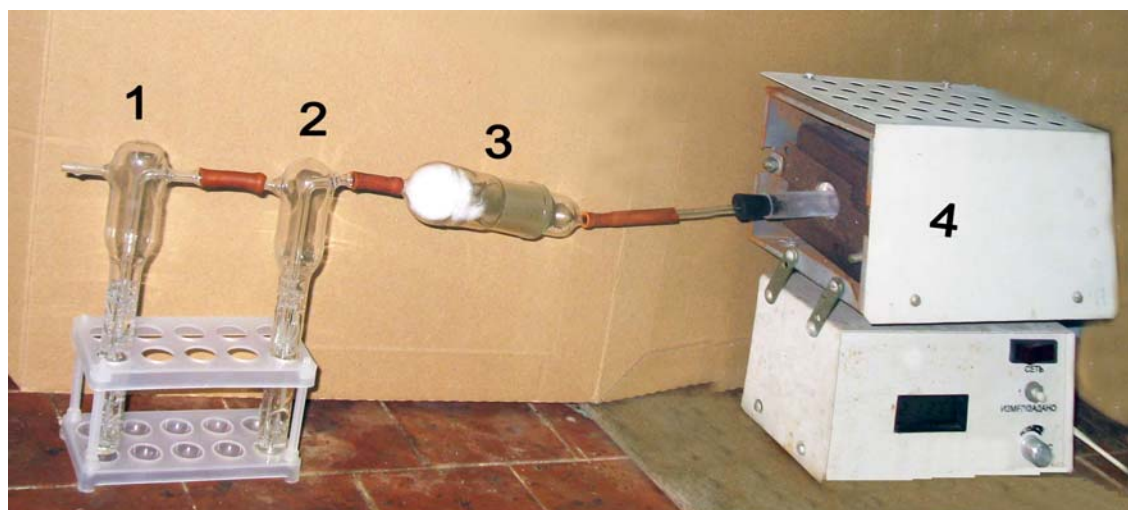


Рис. 2. Схема установки для сорбции металлов из пароаэрозольной фракции при горении полимерных материалов.

1. абсорбер с 10 % раствором щелочи
2. абсорбер с 10 % раствором азотной кислоты
3. фильтр для улавливания частиц сажи и дыма
4. печь для сгорания с регулируемой температурой, в которую помещается навеска ПМ массой 0,1-0,2 г и дозированно подается воздух (скорость 0,2 л/мин)

(хрома, никеля). В эксперименте использовалась навеска 60 г материала.

Как известно, однократное введение низкой дозы кадмия (1 мг/кг) вызывает индуктивный синтез металлотионеина [10]. Известно [11], что МТн кроме металлотранспортной функции играет активную роль в борьбе с окислительным стрессом. В нашем эксперименте содержание МТн, а также ферменты глутатион-АОС и один из основных продуктов ПОЛ – малоновый диальдегид, мы определяли в органах-мишенях для воздействия соединений ТМ – печени и почках.

Возможно, рост активности глутати-

онредуктазы и в почках и в печени при воздействии ТПГ после предварительного воздействия кадмия может объясняться ростом концентрации его субстрата - окисленного глутатиона, в результате окислительных процессов, происходящих с участием фосфолипидов клеточных мембран при воздействии ТПГ, в т.ч. металлов, на клетки.

Как известно, в эритроцитах, печени, почках, хрусталике глаза имеется глутатионпероксидаза (ГП), которая содержит селен и специфично окисляет восстановленный глутатион. Предварительное введение кадмия, вероятно, вызывает адаптивный синтез глутатиона, что косвенно подтверждается достоверным ростом активности ГП.

Биохимические показатели в тканях печени и почек при разных видах воздействия (n=5)

Эксперимент	ГР, нмоль НАДФН ₂ / мин мг белка	ГП, мкмоль/ мг белка мин	МДА, нмоль/мг белка	Содержание МТн, нмоль/г
Печень				
Контроль	0,20±0,04	0,51±0,07	0,26±0,03	2,9±0,4
Cd	0,10±0,03	1,63±0,32	0,24±0,02	7,3±0,9
Продукты горения ПВХ	0,13±0,03	0,74±0,09	0,25±0,02	4,9±0,4
Cd+продукты горения ПВХ	0,29±0,05	1,54±0,35	0,33±0,03	10,3±1,1
Почки				
Контроль	1,75±0,38	0,50±0,04	0,33±0,03	3,6±0,3
Cd	1,40±0,26	1,16±0,0	0,23±0,02	8,2±0,6
Продукты горения ПВХ	1,14±0,19	0,22±0,03	0,29±0,03	4,3±0,5
Cd+продукты горения ПВХ	2,61±0,41	1,08±0,22	0,26±0,03	9,1±0,8

Таблица 1

Такой рост (320% по отношению к контролю в группе, которой вводили кадмий в дозе 1 мг/кг (примерно 1/20 LD₅₀) и 302 % по отношению к контролю в группе, кото-

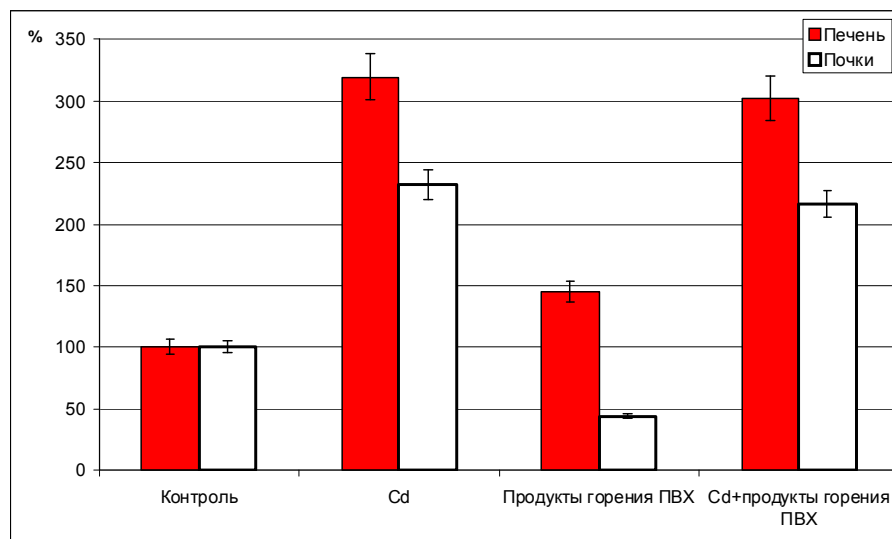


Рис. 3. Относительная активность глутатионпероксидазы (по отношению к контролю).

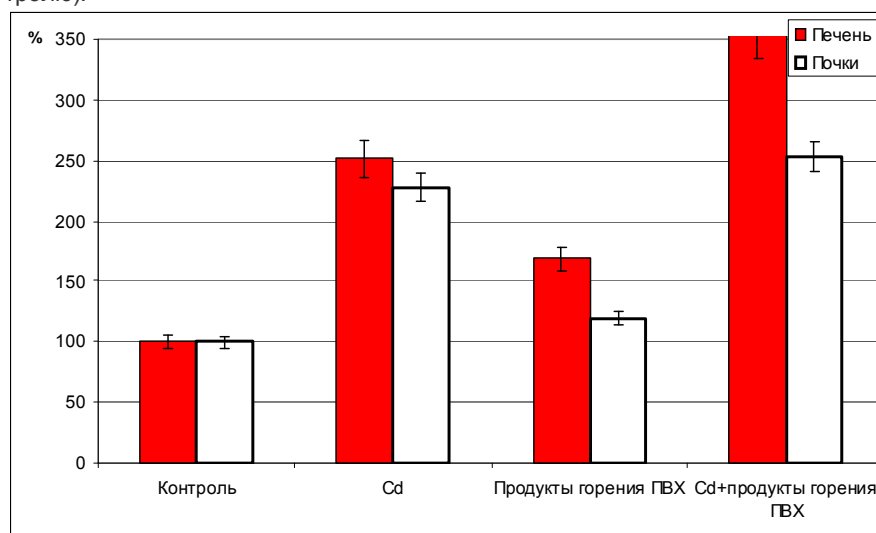


Рис. 4. Относительное содержание МТн в печени и почках (% по отношению к контролю).

рой вводили кадмий в дозе 1/10 LD и подвергали комплексному ингаляционному воздействию токсичных продуктов горения ПВХ) и наблюдался в нашем эксперименте (табл. 1). Интересно, что в почках наблюдается менее сильный рост, чем в печени. Если инициирование синтеза МТн и глутатиона предварительно не проводилась, то при воздействии токсичных продуктов горения происходит падение активности ГП в почках. Поскольку глутатион наиболее активно синтезируется в печени и затем транспортируется в почки, возможно, такие результаты связаны с кинетическими особенностями индуктивного синтеза и рас-

пределения глутатиона.

Однако в целом во всех трех экспериментах АОО справляется с оксидативным стрессом. Об этом свидетельствует практически не отличающиеся от контроля (в пределах ошибки метода) значения концентрации в печени и почках продукта ПОЛ – малонового диальдегида.

В то же время имеет место достоверный рост содержания МТн в тканях печени и почек (рис. 4) после воздействия кадмия и ТПГ, а также их комбинированного воздействия.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, ингаляционное воздействие ТПГ вызывает рост по сравнению с контролем концентрации Zn (на 40,7% в почках и 145% в пече-

ни), Cd (в 14 раз в почках) и Cu (на 57% почках и 175% в печени).

Предварительная затравка кадмием изменяет концентрацию металлов в тканях. А именно снижается по сравнению с контролем концентрация Zn в почках (в 3,6 раза) и значительно (на 88%) растет его содержание в печени. Это может частично объясняться тем, что животные выводились из эксперимента через сутки после ингаляционной затравки ТПГ, и мы видим суммарный результат двух процессов – снижение количества цинка из-за вытеснения его кадмием из МТн (за счет предварительного введения кадмия) и рост концентрации

Средние концентрации некоторых ТМ в тканях печени и почек белых крыс после различных видов воздействия

Эксперимент	Содержание металлов, мг/кг			
	Zn	Cd	Pb	Cu
Почки				
Контроль	0,616	0,0005	0,4811	0,0460
Затравка Cd	0,415	0,0659	0,5602	0,0412
Продукты горения ПВХ	0,867	0,0073	0,4561	0,0723
Затравка Cd + продукты горения ПВХ	0,170	0,1747	0,4769	0,0114
Печень				
Контроль	0,921	0,0041	0,4154	0,0764
Затравка Cd	0,329	0,2443	0,6126	0,0245
Продукты горения ПВХ	2,257	0,0043	0,4227	0,2104
Затравка Cd + продукты горения ПВХ	1,733	0,3348	0,526	0,1175

Таблица 3

Коэффициенты корреляции между концентрациями пар металлов в печени и почках белых крыс

	Zn-Cd	Zn-Pb	Zn-Cu	Cd-Pb	Pb-Cu	Cd-Cu
Почки	-0,90	-0,38	0,98	0,11	-0,21	-0,89
Печень	-0,22	-0,58	0,97	0,82	-0,65	-0,41

цинка из-за повышенного поступления его с ТПГ. Аналогичная картина наблюдается с концентрацией меди.

Несмотря на большую разницу в абсолютных значениях концентраций ТМ, существуют определенные закономерности их изменения. О справедливости подобных предположений косвенно свидетельствуют данные таблицы 3, в которой представлены корреляционные зависимости между концентрациями пар металлов в печени и почках.

Как видно, коэффициенты корреляции очень высоки для пар металлов, объединенных общими транспортными системами (металлотионеин, транспортер двухвалентных ионов – для Zn, Cd и Cu, и, вероятно глутатитон и альбумин для пары Cd-Pb в печени).

Таким образом, можно сделать следующие **выводы**:

1. При термодеструкции и горении материалов из поливинилхлорида при 350 °С наряду с летучими органическими и неорганическими соединениями (хлороводород, оксиды углерода) выделя-

ется большое количество соединений тяжелых металлов в токсикологически значимых концентрациях.

2. Введение кадмия в дозе 1/10 ЛД₅₀ вызывает индуктивный синтез металлотионеина в органах-мишенях (печени и почках), а также изменение активности основных ферментов глутатион-АОС.

3. Не только введение кад-

мия, но также и воздействие ТПГ ПВХ вызывает изменение в распределении металлов внутри организма. Наиболее значительно происходит снижение концентрации цинка в почках и значительный рост концентрации в печени при комплексном воздействии кадмия и ТПГ. При этом наблюдаются высокие положительные корреляции в парах Zn-Cu в печени и почках, Cd-Pb в печени (0,82), и высокие отрицательные корреляции в парах Cd-Cu (-0,89) и Zn-Cd (-0,90) в почках.

4. Механизмы комплексного действия ТПГ ПМ и тяжелых металлов нуждаются в дальнейшем изучении.

Литература

1. Казимирко В.К., Мальцев В.И. Антиоксидантная система и ее функционирование в организме человека // Медицинская газета «Здоровье Украины». – 2004. – №98.
2. McAleer M.F., Tuan R.S. //Metallothionein protects against severe oxidative stress-induced apoptosis of human trophoblastic cells./In Vitro. Mol. Toxicol. – V. 14(3) – P. 219-231 – 2001.

3. Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. //Metallothionein – P. the multipurpose protein. – Cell. Mol. Life Sci. – №59(4) – P.627-647 – 2002.
4. Zhou Z., Sun X., James K.// Metallothionein Protection against Alcoholic Liver Injury through Inhibition of Oxidative Stress./Exp Biol Med (Maywood) – V.227(3) – P. 214-22 – 2002.
5. Ding H.Q., Zhou B.J., Liu L., Cheng S.// Oxidative stress and metallothionein expression in the liver of rats with severe thermal injury – Burns. – V. 28(3) – P.215-21 – 2002.
6. Wenke Feng, Frederick W. Benz, Jian Cai, William M. Pierce, Y. James Kang // Metallothionein Disulfides Are Present in Metallothionein-overexpressing Transgenic Mouse Heart and Increase under Conditions of Oxidative Stress – J. Biol. Chem. – V. 281, Issue 2 – P.681-687. – 2006.
7. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А.Даниловой. — СПб.: Питер, 2003. — 736 с.
8. Патент України на корисну модель № 60439 А UA, МПК А61В5/145, А61В10/00, Спосіб визначення металотіонеїну в біологічних об'єктах / Шафран Л.М., Тимофеева С.В., Шерер В.В., Пыхтеева О.Г., Большой Д.В., Одеський державний медичний університет - № 2002065242; Заявлений 25.06.2002; Опубл. 15.10.2003 Бюл. № 10
9. Большой Д.В., Пыхтеева Е.Г. Вклад тяжёлых металлов в токсичность продуктов горения. // Актуальные проблемы транспортной медицины. № 1 (7), 2007. С. 100-103.
10. Пыхтеева Е.Г. Металлотионеин: биологические функции. Роль металлотионеина в транспорте металлов в организме // Актуальные проблемы транспортной медицины. № 4 (18), 2009. С. 44-58.
11. Пыхтеева Е.Г. Металлотионеин: биологические функции. Роль металлотионеина в защите от оксидативного стресса// Актуальные проблемы транспорт-

ной медицины. № 1 (19), 2010. С. 114-120.

Резюме

ВПЛИВ ПОПЕРЕДНЬОЇ ІНДУКЦІЇ МЕТАЛЛОТІОНЕЇНА НА СТІЙКІСТЬ АОС ОРГАНІЗМУ БІЛИХ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ТОКСИЧНИХ ПРОДУКТІВ ГОРІННЯ ПВХ

Пыхтеева О.Г., Большой Д.В., Самохина Н.А., Стужук О.С., Третьяков О.М.

Експериментально показано, що попередня індукція металлотионеїна змінює показники антиоксидантної системи білих щурів при дії токсичних продуктів горіння ПВХ. Показано, що не тільки введення кадмію, але також і дія токсичних продуктів горіння ПВХ викликає зміни в розподілі металів усередині організму. Механізми комплексної дії токсичних продуктів горіння ПВХ і важких металів потребують подальшого вивчення.

Ключові слова: металотіонеїн, ПВХ, горіння полімерів, оксидативний стрес

Summary

INFLUENCE OF THE PRELIMINARY INDUCTION OF METALLOTHIONEIN ON STABILITY AOC OF THE ORGANISM OF WHITE RATS AT INFLUENCE OF TOXIC PRODUCTS OF BURNING OF PVC

Pyhteeva E.G., Bolshoy D.V., Samokhina N.A., Stuzhuk E.S., Tretjakov A.M.

It is experimentally shown, that the preliminary induction of metallothionein changes indicators of antioxidative system of white rats at toxic products of PVC burning influence. It is shown, that not only cadmium introduction, but also influence of toxic products of PVC burning causes change in distribution of metals in an organism. Mechanisms of complex action of toxic products of burning of PVC and heavy metals require the further studying.

Keywords: metallothionein, PVC, burning of polymers, oxidative stress

Впервые поступила в редакцию 06.06.2010 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования