

УДК 611-018.7:546.48,546.49

## ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАК МИШЕНЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ МАЛЫХ ДОЗ КАДМИЯ И РТУТИ

Шафран Л.М., Большой Д.В., Потапов Е.А., Третьякова Е.В.

Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса

Впервые поступила в редакцию 15.05.2007 г. Рекомендована к печати на заседании ученого совета НИИ медицины транспорта (протокол № 3 от 29.05.2007 г.).

**Актуальность темы.** Эпителиальные клетки, образующие покровный эпителий кожи, дыхательного, пищеварительного, мочеполового тракта, большинства желез, характеризуются рядом общих морфологических, функциональных и метаболических особенностей [1]. В то же время имеют место определенные отличия в количестве и соотношении клеточных органелл, наборе синтезируемых ферментов, условиях протекания некробиотических процессов в нормальных и патологических условиях [2-4]. Такая специфика проявляется эпителиальными клетками, в частности, при металлотоксикозах, в патогенезе которых взаимодействию токсического агента с определенными видами клеток придается важное значение [5]. Это может быть проиллюстрировано на примере нефротоксического синдрома при взаимодействии кадмия, свинца и ртути с эпителиальными клетками проксимальных канальцев почек, массивный некроз которых признается ведущим компонентом данного симптомокомплекса. Поскольку некробиотические процессы в клетках и тканях представляют сложный многозвеньевой и полифазный процесс, ряд его составляющих, несмотря на большое число публикаций, остается не выясненными, что существенно снижает эффективность лечебных и профилактических мероприятий, особенно при экспозиции малыми дозами тяжелых металлов (ТМ). Поэтому задачей настоящего исследования было в известной мере восполнить имеющийся пробел.

**Материалы и методы.** Поскольку отдельные компоненты нефрона, в частности, эпителий проксимальных канальцев достаточно труднодоступен для токсикологических исследований, авторами для изучения особенностей реализации клеточных механизмов токсического действия малых доз ртути и других тяжелых металлов было предложено в качестве модели для опытов *in vitro* использование переживающих отрезков тонкой кишки белых крыс в питательной среде Хенкса. Эта модель используется и в других лабораториях [6].

Опыты проводили на отрезках свежеснятых сегментов тонкой кишки белых крыс, самцов, массой 180-200 г (при соблюдении требований биоэтики [7]), в просвет которых вводили раствор с различными концентрациями (0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 5,0 мг/л и 50,0 мг/л) двух форм ртути неорганической (сулема) и органической (тимеросал). Экспозиция составляла 15, 30, 45 и 120 мин. Сравнительные исследования проведены при введении в тех же условиях раствора хлорида кадмия (0,5 мг/л). По окончании экспозиции определяли и во внутреннем, внешнем растворах и в ткани кишки содержание Cd атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре ААС-3 (фирмы «Carl Zeiss» JENA) с модифицированной приставкой «Графит-7» [8], а содержание Hg - методом холодного пара на анализаторе ртути «Юлия-2» [9]. Кроме того, определяли уровень свободных SH-групп [10], ПОЛ по реакции с тиобарбитуровой кислотой

[11], активность кислой (КФ) и щелочной (ЩФ) фосфатаз [12], антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза – СОД, глутатионпероксидаза – ГП, глутатионредуктаза – ГР) [12], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [12], также число апоптозных клеток [13] и лейкоцитов, жизнеспособность клеток эпителия [14] в просвете кишки. Результаты исследований обрабатывали методами вариационного и корреляционного анализа с помощью пакета программ в Microsoft Excel [15].

**Результаты и обсуждение.** Исследования показали, что большая часть введенной в раствор ртути поглощается из заполняющего кишку раствора тканями ее стенки (табл. 1). Подобные соотноше-

рые освобождаются из стенки кишки во внутренний раствор. При этом мы исходили из современной концепции гибели клеток, согласно которой процесс апоптоза рассматривается как физиологичное и переходное явление с возможностью элиминации клеток, повреждённых или закончивших свой жизненный путь, без развития основных патологических симптомов комплексов (таких, как, например, воспаление). Последние же являются показателями включения патофизиологических механизмов, ведущих обычно к некротизации клеток и соответствующей ткани [16].

Проведенные исследования позволили обосновать оптимальное время эк-

Таблица 1

Распределение ртути между элементами среды и тканью сегмента тонкой кишки (HgCl<sub>2</sub>, экспозиция 30 мин)

Концентрация Hg во внутреннем растворе, мг/л		Концентрация Hg во внешнем растворе, мг/л		Содержание Hg в стенке кишки, мкг/г
До экспоз.	После экспоз.	До экспоз.	После экспоз.	
Физраствор	0,0002 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0001	0,0013 ± 0,0001	0,018 ± 0,002
0,1	0,0211 ± 0,0007			0,81 ± 0,04
0,5	0,086 ± 0,003			4,2 ± 0,1
5,0	0,95 ± 0,02			40,5 ± 0,8
50,0	11,4 ± 0,8			386,0 ± 7,4

Таблица 2

Определение оптимального времени экспозиции при введении HgCl<sub>2</sub> в просвет кишки в различных концентрациях

Время экспозиции, мин	Количество апоптозных клеток в растворе в просвете отрезка кишки			
	C <sub>Hg</sub> = 0,1 мг/л	C <sub>Hg</sub> = 0,5 мг/л	C <sub>Hg</sub> = 5,0 мг/л	C <sub>Hg</sub> = 50,0 мг/л
15	—	—	6 ± 2	93 ± 7
30	3 ± 1	9 ± 2	24 ± 4	112 ± 9
45	5 ± 2	21 ± 4	66 ± 5	—
120	7 ± 2	41 ± 6	145 ± 15	—

ния имели место и при введении Cd в просвет кишки. Во внешнем растворе Хенкса заметного роста концентрации ТМ не зафиксировано.

Среди показателей, которые использовали как биомаркеры металлотоксикоза, за основной было принято число апоптозных эпителиальных клеток, кото-

этапа и развития апоптозного процесса при экспозиции отрезка тонкой кишки ТМ.

Поскольку определение количественных параметров процесса апоптоза в последние годы стало вполне доступной методической процедурой, мы использовали этот биомаркер не только для установления факта повреждения слизистой оболочки тонкой кишки Hg, но и для срав-

на сегменте тонкой кишки (табл. 2). Как видно из представленных в таблице данных, при концентрации ртути 0,1 мг/л и коротком времени экспозиции апоптозные эпителиальные клетки в растворе отсутствовали. Долгосрочная экспозиция с C<sub>Hg</sub> = 50,0 мг/л вызывала выраженный некроз клеток эпителия. Сопоставление полученных данных позволило аргументировать 30-минутную экспозицию как оптимальную для изучения начального

нительного анализа с наблюдаемыми метаболическими сдвигами в тканях стенки тонкой кишки при действии различных соединений ТМ (табл. 3).

Приведенные в табл. 3. результаты исследований иллюстрируют и подтверждают тот факт, что во всем диапазоне экспериментально проверенных концентраций наблюдается монотонная зависимость активности СОД, ГП, ГР, содержания МДА, числа лейкоцитов и апоптозных клеток от концентрации агента, введенного в сегмент кишки. При этом, напротив,

активность КФ и ЩФ имеет экстремум, как можно видеть на рис. 1.

Речь может идти о проявлении правила, согласно которому большие дозы токсиканта способствуют неспецифическому цитотоксичному действию с угнетением лизосомальных ферментов, тогда как при низких дозах отмечается специфическое действие ртути, проявляющееся в преимущественно транзитной активации ферментов. Наличие такого этапа токсичного действия малых доз ртути, наряду с индивидуальными различиями в

Таблица 3

Исследование влияния сулемы, тимеросала и хлорида кадмия в разных концентрациях на эпителий слизистой оболочки тонкой кишки, в % к контролю

Конц. токсического агента, мг/л	Биомаркер	Контроль	Сулема	Тимеросал	Хлорид кадмия
0,1	Количество апоптозных клеток, кл./мм <sup>3</sup>	0	3	0	0
	Количество лейкоцитов, кл./мм <sup>3</sup>	20	135	121	112
	Активность КФ, отн. ед.	100,00	204,28	164,69	160,26
	Активность ЩФ, отн. ед.	100,00	119,82	105,60	97,03
	Активность ГР, отн. ед.	100,00	96,54	108,29	91,57
	Активность ГП, отн. ед.	100,00	110,19	90,92	84,79
	Активность ГбФДГ, отн. ед.	100,00	108,75	132,50	149,05
	Активность СОД, отн. ед.	100,00	128,53	105,38	96,55
	Содержание МДА (ферм), отн. ед.	100,00	116,42	98,35	129,50
	Содержание МДА (неферм), отн. ед.	100,00	121,43	105,64	134,76
Содержание свободных SH-групп, отн. ед.	100,00	88,31	135,95	95,40	
0,5	Количество апоптозных клеток, кл./мм <sup>3</sup>	0	9	4	4
	Количество лейкоцитов, кл./мм <sup>3</sup>	19	206	189	185
	Активность КФ, отн. ед.	100,00	54,37	62,59	71,62
	Активность ЩФ, отн. ед.	100,00	267,02	215,02	216,86
	Активность ГР, отн. ед.	100,00	68,61	87,42	75,90
	Активность ГП, отн. ед.	100,00	62,64	85,84	60,11
	Активность ГбФДГ, отн. ед.	100,00	84,75	112,55	90,15
	Активность СОД, отн. ед.	100,00	68,35	85,94	65,85
	Содержание МДА (ферм), отн. ед.	100,00	162,27	118,50	129,50
	Содержание МДА (неферм), отн. ед.	100,00	132,74	109,53	145,64
Содержание свободных SH-групп, отн. ед.	100,00	61,99	185,84	74,12	
5,0	Количество апоптозных клеток, кл./мм <sup>3</sup>	2	24	48	49
	Количество лейкоцитов, кл./мм <sup>3</sup>	21	300	242	201
	Активность КФ, отн. ед.	100,00	36,11	43,13	47,39
	Активность ЩФ, отн. ед.	100,00	75,33	81,13	82,93
	Активность ГР, отн. ед.	100,00	62,48	81,75	75,86
	Активность ГП, отн. ед.	100,00	46,46	78,04	56,76
	Активность ГбФДГ, отн. ед.	100,00	74,35	82,15	76,25
	Активность СОД, отн. ед.	100,00	63,45	65,41	58,83
	Содержание МДА (ферм), отн. ед.	100,00	162,27	126,50	149,85
	Содержание МДА (неферм), отн. ед.	100,00	256,74	132,63	223,25
Содержание свободных SH-групп, отн. ед.	100,00	33,31	211,70	42,55	
50,0	Количество апоптозных клеток, кл./мм <sup>3</sup>	0	112	104	99
	Количество лейкоцитов, кл./мм <sup>3</sup>	19	558	516	462
	Активность КФ, отн. ед.	100,00	14,95	18,07	17,76
	Активность ЩФ, отн. ед.	100,00	6,28	7,95	7,98
	Активность ГР, отн. ед.	100,00	38,29	47,77	48,45
	Активность ГП, отн. ед.	100,00	7,98	8,94	9,44
	Активность ГбФДГ, отн. ед.	100,00	54,37	72,25	66,45
	Активность СОД, отн. ед.	100,00	40,56	65,41	58,83
	Содержание МДА (ферм), отн. ед.	100,00	132,85	165,47	128,52
	Содержание МДА (неферм), отн. ед.	100,00	196,69	174,06	212,76
Содержание свободных SH-групп, отн. ед.	100,00	8,59	192,02	11,65	

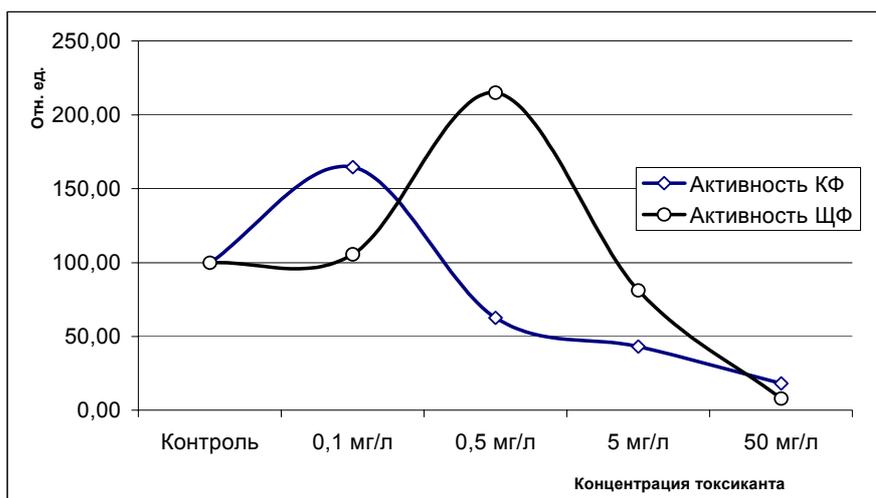


Рис. 1. Зависимость активности кислой и щелочной фосфатазы в тканях стенки тонкой кишки от концентрации токсического агента (на примере тимеросала, при экспозиции 30 минут)

чувствительности организма к химической агрессии, лежит в основе парадоксальной токсичности, а также раскрывает временный характер адаптации к ядам, явления гормезиса и парадоксальной токсичности [17, 18].

Из ряда биохимических показателей выпадает зависимость содержания свободных SH-групп от концентрации токсического агента (рис. 2).

При экспозиции хлоридами ртути и

зывают свободные SH-группы, а тимеросал сам содержит сульфидные связи и может служить источником SH-групп.

В целом, проведенные исследования раскрывают сложный и многозвеньевой характер воздействия ТМ на эпителий тонкой кишки, так как именно последний играет решающую роль в реакциях стенки кишечника на воздействие патологических агентов [2, 3]. Включение клеточных рецепторов в этот процесс может быть проиллюстрировано схемой на рис. 3.

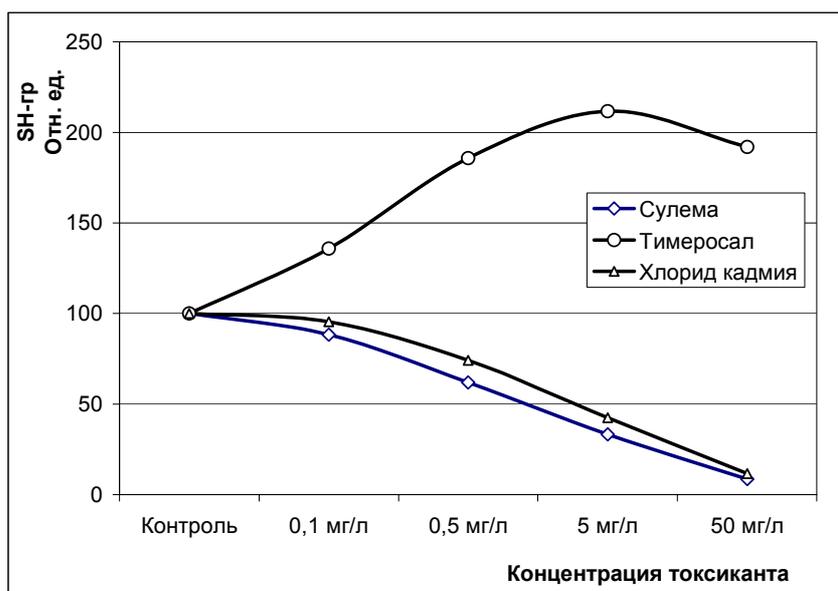


Рис. 2. Зависимость содержания свободных SH-групп в тканях стенки кишки от концентрации токсического агента (экспозиция 30 мин)

кадмия содержание свободных SH-групп в тканях стенки тонкой кишки с повышением концентрации токсиканта падает, в то время как тимеросал приводит к росту содержания свободных SH-групп. Такая динамика может объясняться тем фактом, что

ртушь и кадмий благодаря своим химическим свойствам активно связывают свободные SH-группы, а тимеросал сам содержит сульфидные связи и может служить источником SH-групп.

Из представленной на рис. 3 схемы видно, что развитие процесса гибели клеток в физиологических и патологических условиях осуществляется практически теми же механизмами. Однако при взаимодействии с токсическим агентом происходят не только количественные, но и существенные качественные изме-

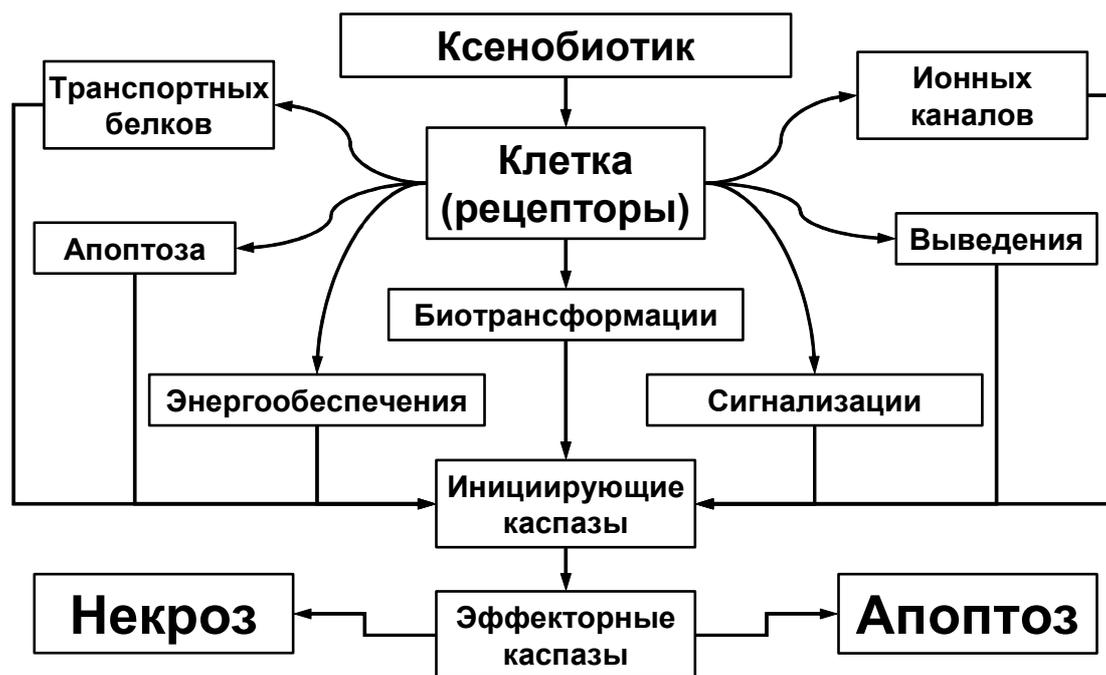


Рис. 3. Участие рецепторов эпителиальных клеток в реализации механизмов гибели клеток при действии малых доз кадмия и ртути

нения в реакциях, регулируемых не только на клеточном, но также тканевом и организменном уровнях [1, 4]. При этом индукция апоптоза играет роль пускового механизма, а его выраженность может быть индикатором патологизации пролиферативных процессов в эпителии кишечника, проксимальных канальцев почек и других органов-мишеней. Однако именно эпителиальные клетки, благодаря особенностям структуры и метаболизма первыми включаются в процесс накопления, элиминации ТМ и, по сути, являются рецепторами для данного класса ксенобиотиков.

#### Выводы

1. Эпителиальные клетки, как свидетельствуют данные литературы и результаты проведенных исследований, активно накапливают кадмий и ртуть, а затем элиминируют их путем направленного изменения метаболизма, индукции апоптоза, а затем (при высоких уровнях воздействия) и некроза эпителиальной ткани.
2. Неорганические соединения кадмия и ртути вызывают однотипные измене-

ния в эпителии тонкой кишки, тогда как показатели воздействия неорганической и органической форм ртути существенно различаются между собой.

3. Переживающие *in vitro* сегменты тонкой кишки белых крыс являются удобной моделью для изучения особенностей метаболических, структурных и функциональных изменений в эпителии под действием ксенобиотиков, а индукция апоптоза и показатели происходящих при этом биохимических сдвигов могут служить информативными биомаркерами для оценки выраженности происходящих изменений.

#### Литература

1. Давыдовский И.В. Общая патология человека. – М.: Медицина, 1969. – 612 с.
2. Шлыгин Г.К. Ферменты кишечника в норме и патологии. – Л.: Медицина, 1967. – 272 с.
3. Chandrasoma P. Gastrointestinal

- pathology. – Stamford: Appleton & Lange, 1999. – 498 p.
4. Brenner В.М. The Kidney. – Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2000. – 6<sup>th</sup> ed. – Vol. 1. – P. 3-276.
  5. Трахтенберг И.М., Шафран Л.М. Тиоловые яды. – В кн.: Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – С. 111-175.
  6. Луговський С.П. Апоптоз епітелію слизової оболонки тонкої кишки щурів при свинцевій інтоксикації // Ж. Сучасні проблеми токсикології, 2002. - № 3. – С. 50-54.
  7. Резников А.Г. Проблемы этики при проведении экспериментальных медицинских и биологических исследований на животных в Украине.- В кн.: Антологія біоетики / За ред. Ю.І. Кундієва. – Львів: Бак, 2003. – С. 395-399.
  8. Методические рекомендации по спектрохимическому определению тяжёлых металлов в объектах окружающей среды, полимерах и биологическом материале (№ 4096-86) / М.Т. Дмитриев, Э.И. Грановский, Л.М. Шафран и др. – Одесса, 1986. – 25 с.
  9. Визначення вмісту ртуті в об'єктах виробничого, навколишнього середовища і біологічних матеріалах – МВ 10.1-115-2005. – К.: 2005. – 48 с.
  10. Веревкина И.В., Точилкин А.И., Попова Н.А. Колориметрический метод определения SH-групп и SS-связей в белках при помощи 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной) кислоты. - Современ. методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 223-231.
  11. Стальная И.Д., Горишвили Т.Г. Метод определения МДА с помощью тиобарбитуровой кислоты. - Современ. методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
  12. Справочник по лабораторным методам исследований / Под ред. Л.А. Даниловой. – СПб.: Питер, 2003. – С. 211-214; 251-268.
  13. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis / Daugas E., Susin S.A., Zamzami N. e.a. // *FASEB J.*, 2000. – Vol. 14. – Iss. 8. – P. 729–739.
  14. Takadera T., Ishida A., Ohyashiki T. Ketamine-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons // *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006. – Vol. 210. – Iss. 1. – P. 100–107.
  15. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
  16. Шафран Л.М. Роль апоптоза в патогенезе токсических нефропатий // Ж. Актуальные проблемы транспортной медицины, 2006. - № 2 (4). – С. 15-25.
  17. Damelin LH, Vokes S, Whitcutt JM, Damelin SB, Alexander JJ. Hormesis: a stress response in cells exposed to low levels of heavy metals // *Hum. Exp. Toxicol.*, 2000. – Vol. 19. – Iss. 7. – P. 420-430.
  18. Шафран Л.М., Большой Д.В. Парадоксальная токсичность – интенсивно развивающееся направление современной токсикологии // Тези доповідей II з'їзду Токсикологів України. 12-14 жовтня 2004 р. – К., 2004. - С. 17-18.

### Резюме

#### ЕПІТЕЛІАЛЬНІ КЛІТИНИ ЯК МИШЕНЬ ДІЇ МАЛИХ ДОЗ КАДМІЮ ТА РТУТІ

Шафран Л.М., Большой Д.В., Потапов Е.А., Третьякова О.В.

Авторами показано, що переживаючі *in vitro* сегменти тонкої кишки білих щурів є зручною моделлю для вивчення особливостей метаболічних, структурних та функціональних змін в епітелії під дією ксенобіотиків, а індукція апоптозу та показники біохімічних порушень, що відбуваються при цьому, можуть служити інформативними біомаркерами для оцінки ступеня змін, що відбуваються.

**Summary**

EPITHELIAL CELLS AS TARGET OF  
CADMIUM AND MERCURY SMALL DOSES  
IMPACT

*Shafran L.M., Bolshoy D.V., Potapov E.A.,  
Tretiakova E.V.*

It was shown that outlived *in vitro* segments of small intestine of white rats are

handly model for study of metabolic, structure and functional features of changes in epithelium under the influence of xenobiotics. induction of apoptosis and biochemical changes are might be informative biomarkers for evaluation of abnormality range in epithelial cells.

УДЦК 599.323.4.591.461

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК КРЫС С СУЛЕМОВОЙ НЕФРОПАТИЕЙ, СОДЕРЖАВШИХСЯ ТЕЧЕНИЕ ШЕСТИДЕСЯТИ СУТОК НА ГИПЕРНАТРИЕВОЙ ДИЕТЕ**

**Шпак В.С., Гоженко А.И.**

*ГП УкрНИИ медицины транспорта МЗ Украины, г.Одесса*

*Впервые поступила в редакцию 23.03.2007 г. Рекомендована к печати на заседании ученого совета НИИ медицины транспорта (протокол № 3 от 29.05.2007 г.).*

Проблема особенностей токсического эффекта дихлорида ртути на различные отделы канальца нефрона в условиях уменьшения количества действующей почечной паренхимы является актуальной, поскольку данная экспериментальная модель позволяет приблизиться к пониманию особенностей патогенеза токсической почечной недостаточности у лиц пожилого возраста и при сочетанном токсическом поражении органа [7]. Многочисленные данные литературы показывают, что прямое токсическое влияние ртути на канальцевый эпителий нефрона (главным образом его проксимальный сегмент) является одним из центральных событий, определяющим выраженность клинических проявлений и ход дальнейшего течения ртуть-индуцированной почечной недостаточности [8]. Наряду с этим, в литературе имеются отдельные сообщения, подтверждающие, что даже допустимые уровни ее поступления в организм человека могут сопровождаться отчетливыми изменениями функциональной активности дистального отдела нефрона [1, 6]. Целью настоящего исследования явилось изучить функциональное состояние почек крыс на 60 сутки после воздействия дихлорида ртути на фоне гипернатриевой

нагрузки.

Материал и методы исследования.

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах с массой тела 100-290 грамм. 124 животным был введен подкожно раствор  $HgCl_2$ , приготовленный на изотоническом растворе  $NaCl$ , в дозе 0,4 мг\100 г массы тела, 120 животных служили контролем. Опытную группу животных путем произвольного отбора подразделили на две подгруппы. Первую подгруппу, (66 крыс), содержали на стандартном рационе. Вторую подгруппу, (58 крыс), содержали на гипернатриевом рационе. Контрольную группу животных подразделили по аналогичному принципу, они образовали третью и четвертую подгруппы. III подгруппа содержала 59 крыс (стандартный рацион), а IV подгруппа состояла из 61 крысы (гипернатриевая диета). Эксперимент продолжался в течение 60 дней.

Функциональное состояние почек изучали в условиях индуцированного водного диуреза, согласно общепринятой методике [2].

В полученных образцах мочи и плазмы крови определяли концентрацию креатинина фотометрическим методом в