

УДК 577.1:574.2:615.9

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

Калінін І.В., Цудзевич Б.О., Петрук Н.А.

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна
e-mail: ikalin@rambler.ru

Надійшла до редакції 11.03.2010

Досліджено спектральні властивості металотіонеїнів печінки щурів при інтоксикації міді сульфатом і кадмію сульфатом. Встановлено чотири ізоформи металотіонеїнів та їх міжгрупові відмінності, а також обчислено співвідношення показників світлопоглинання між різними ізоформами.

Ключові слова: металотіонеїни, УФ-спектри, міді сульфат, кадмію сульфат.

ВСТУП

Металотіонеїни – це група низькомолекулярних цитоплазматичних білків, що пов'язані з розвитком адаптаційних відповідей до несприятливих факторів середовища, як природного, так і техногенного походження та їх дія направлена переважно на молекулярні механізми, що відповідають за збереження гомеостазу. Металотіонеїни різних класів, різноманітної тканинної і таксономічної належності дещо відрізняється співвідношенням амінокислотних залишків, але їх хімічні і біологічні властивості, що визначаються молекулярною масою, макроструктурою є ідентичними [1].

Металотіонеїни виконують в організмі різноманітні та важливі біохімічні і фізіологічні функції не тільки гомеостатичного, але й регуляторного характеру, приймають участь в процесах проліферації і диференціації клітин, в ембріональному і постнатальному рості та розвитку, в захисті ембріону і дорослого організму від токсичної дії важких металів, активних форм кисню та інших різноманітних ксенобіотиків [2, 3].

Організм може реагувати на забруднення зміною не лише вмісту металотіонеїнів, але і їх якісного складу шляхом експресії різних ізоформ та співвідношення вмісту есенціальних та токсичних металів у їх складі [4, 5]. Дослідження характеристик металотіонеїнів є трудомістким процесом та потребує певного обладнання. Актуальним є дослідження спектральних характеристик металотіонеїнів, особливостей їх тканинного та внутрішньоклітинного розподілу, а також участь у механізмах детоксикації.

Метою наших досліджень було вивчення спектральних властивостей ізоформ металотіонеїнів печінки щурів та встановлення їх ролі у детоксикаційних процесах важких металів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях, одного віку, масою 180-200 г., впродовж 14 діб. Щури було поділено на три групи тварин: перша – інтактні (контроль), друга – тваринам перорально вводили розчин міді сульфату в дозі 1/10 від ЛД₅₀, третя – тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1/30 від ЛД₅₀. Після закінчення експерименту щурів декапітували під ефірним наркозом та відбирали тканини печінки для подальших досліджень. Вся робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Металотіонеїни з тканин печінки виділяли шляхом гель-фільтрації, а ізоформи металотіонеїнів – шляхом іонообмінної хроматографії [6, 7]. Розчин металотіонеїнів одержували з 10 %-го гомогенату тканини в 10 мМ трис-НСl буфері, рН 8,0 з додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу ("Sigma") для запобігання окиснення SH-груп та інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (0,1 мМ, "Sigma"). Гомогенат отримували з об'єднаних рівних наважок тканини з восьми тварин дослідної групи та центрифугували протягом 45 хв. при 14 000 g. Отриманий надосад інкубували 5 хв при 85 °С і знову центрифугували в тих самих умовах. Надосад, що містить розчинні термостабільні сполуки, піддавали гель-розподільчій хроматографії на сефадексі G-50 та іоно-обмінній хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Розподільчу хроматографію здійснювали 0,01 М трис-НСl буфером, рН 8,0 на колонці, заповненій сефадексом G-50 («Pharmacia»), з охолоджуючим кожухом розміром 50×1,5 см із швидкістю 0,33 мл/хв. Для запобігання втрат металів, зв'язаних з білками, в елюент не додавали ЕДТА. Вимірювали

світлопоглинання проб при довжині хвилі 280 і 254 нм (D_{280} і D_{254}). Вибрані довжини хвиль зумовлені відсутністю у складі металотіонеїнів ароматичних залишків і високим рівнем світлопоглинання для метал-тіолатних кластерів. Калібровку колонки здійснювали за допомогою білків з відомою молекулярною масою – хімотрипсину (25,8 кДа), міоглобіну (17,0 кДа), цитохрому с (12,3 кДа) та убіквітину (8,6 кДа), (всі маркери фірми “Sigma”, США). Металотіонеїни ідентифікували як низькомолекулярні термостабільні білки із високим показником співвідношення світлопоглинання D_{254}/D_{280} , що характерно для молекул білків. В об’єднаних фракціях піку (10 мл) реєстрували УФ спектри та проводили визначення в них вмісту металів.

Частину розчину термостабільних сполук наносили на іонообмінну хроматографічну колонку розміром 50×1,5 см з охолоджуючим кожухом, заповнену ДЕАЕ-целюлозою (“Pharmacia”). Для видалення незв’язаних білків колонку промивали 100 мл 10 мМ трис-НСІ буферу рН 8,0. Після цього білки елюювали розчином NaCl з лінійним градієнтом концентрації 0 – 1 М в трис-НСІ буфері з додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу та 0,1 мМ феніл метил-сульфонілфториду в загальному об’ємі 400 мл. Об’єм проб становив 5 мл, швидкість елюції – 0,5 мл/хв. Оптичну густину елюату реєстрували при 254 і 280 нм. Після об’єднання проб кожної фракції (15 мл) реєстрували їх УФ спектри та проводили визначення в них вмісту металів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Металотіонеїнівмісні фракції, виділені шляхом гель-фільтрації, на етапі іонообмінної хроматографії показують чотири ізоформи (рис.1), ідентифіковані як MT-1, MT-1a, MT-2 та MT-2a згідно порядку виходу, що є типовою ознакою металотіонеїнів тварин [8] та відповідають профілю елюції стандартного MT кролика. MT-1 елюється при 0,24–0,25 М NaCl, а MT-2 при 0,39–0,40 М NaCl. В більшості випадків спостерігається поява додаткових фракцій MT-1a та MT-2a, що є типовим проявом мікрогетерогенності ізоформ тваринних металотіонеїнів. Цікавим є той факт, що тільки в 3 дослідній групі щурів присутня молекулярна форма MT-1a та відсутня – MT-2a.

Порівняння диференційних спектрів металотіонеїнів тканин печінки щурів більш наочно демонструє міжгрупові відмінності між ними та свідчить про зміни складу фракцій, пов’язані, з отруєнням різними видами солей важких металів.

Обчислення характерних для металотіонеїнових співвідношень показників світлопоглинання [9] свідчить (табл. 1), що для металотіонеїнів печінки щурів контролю і всіх дослідних груп властивий вищий показник D_{245}/D_{295} в MT-1, відносно MT-2, а також відзначено зменшення показника D_{260}/D_{230} в MT-2 в усіх ізоформах металотіонеїнів дослідних груп.

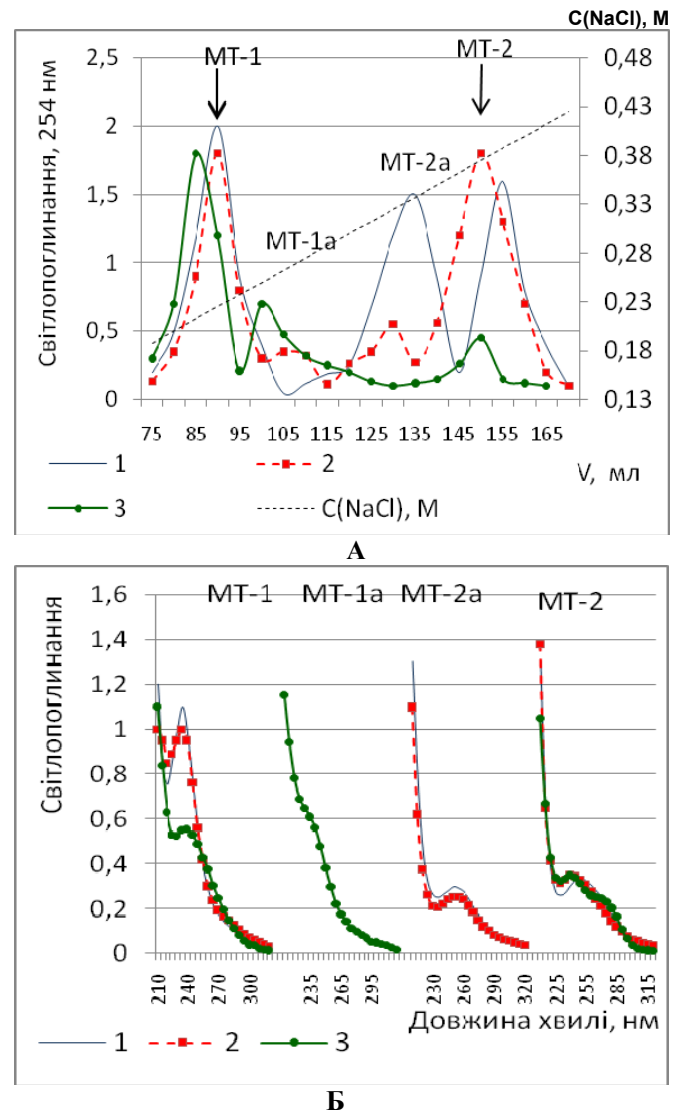


Рис. 1. Типові профілі елюції (А) та УФ-спектри (Б) металотіонеїнів тканин печінки щурів, одержаних при іонообмінній хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі в лінійному градієнті NaCl в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН 8,0.

Таблиця 1
Співвідношення показників світлопоглинання металотіонеїнів печінки щурів

Показник співвідношення довжини хвилі	MT-1	MT-1a	MT-2	MT-2a
Контроль				
215/230	0,80	–	2,50	3,00
260/230	0,26	–	1,17	1,05
255/280	3,16	–	1,85	2,14
245/295	11,69	–	4,01	3,91
Щурі отруєні міді сульфатом				
215/230	1,00	–	2,06	2,95
260/230	0,28	–	0,87	1,15
255/280	2,78	–	2,10	2,10
245/295	8,83	–	4,60	3,42
Щурі отруєні кадмію сульфатом				
215/230	1,60	1,44	2,06	–
260/230	0,72	0,34	0,80	–
255/280	2,81	3,00	1,39	–
245/295	7,16	8,57	5,02	–

Металотіонеїни при збільшенні важких металів у організмі, можуть реагувати на його інтоксикацію збільшенням вмісту білка [10]. Однак, є ряд робіт, в яких наводиться інформація щодо зменшення вмісту металотіонеїнів у забруднених місцевостях, зважаючи на те, що на етапі незворотних змін у клітині індукція синтезу металотіонеїнів після досягнення піку у адаптивному діапазоні може повертатися до базального рівня, або навіть зменшуватися [11]. Це ускладнює інтерпретацію відповіді організму до високих рівнів забруднення.

ВИСНОВКИ

Підсумовуючи одержані результати слід відзначити, що дані показники доцільно використовувати при вивченні токсичних ефектів важких металів, а дана проблема має не тільки практичне значення, але й фундаментальне – оскільки вона пов'язана із дослідженням механізмів адаптації та стійкості по відношенню до важких металів та інших численних ксенобіотиків.

Література

1. *Барабой В.А., Петрина Л.Г.* Металлотионеины: структура и механизмы действия // Укр. біохім. журнал, 2003. – Т. 75, № 4. – С. 28-36.
2. *Valls M., Bofill R., Gonzales-Duarte R. et al.* A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. N 35. P. 32835 – 32843.
3. *Astrid S., Helmut S., Roland K O.* Metallothioneins and Related Chelators (Metal Ions in Life Sciences). – Copyright: 2009. – 514 p.
4. *Столяр О., Курант В., Грубінко В., Горбовий П.* УФ-спектроскопія та високоефективна рідинна хроматографія в аналізі металотіонеїнів гепатопанкреасу коропа при дії йонів важких металів // Фізичний збірник НТШ. – 2001. – Т. 4. – С. 423–429.
5. *Banni M., Dondero F., Jebali J. et al.* Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein *mt10* and *mt20* expression: a validation along the Tunisian coast // Biomarkers. – 2007. – Vol. 12, N 4. – P. 369–383.
6. *Suzuki, K.T.* Purification of vertebrate metallothioneins, Methods in Enzymology Metallobiochemistry, Part B: Metallothionein and Related Molecules, Academic Press, San Diego, 205 (1991), 252–263.
7. *Falfushynska H.I.* Function of metallothioneins in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine / H.I. Falfushynska, O.B. Stoliar // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2009. Vol. 72. P. 1425-1432.
8. Metallothioneins in rats exposed to barium chloride. *Florianczyk Boleslaw, Staroslawska Elzbieta.* Bull. Vet. Inst. Pulawy. 2003. 47, № 1. – p. 153–156.
9. *Kagi J. H. R., Schaffer A.* Biochemistry of metallothionein // Biochemistry. – 1988. – Vol. 27, N 23. – P. 8509–8515.
10. *Vergani L., Grattarola M., Grasselli E. et al.* Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from *Mytilus galloprovincialis* // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2007. – Vol. 465, N 1. – P. 247–253.
11. *Dallinger R., Wang Y., Berger B. et al.* Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail, *Helix pomatia* // European Journal of Biochemistry. – 2001. – Vol. 268, №15. – P. 4126–4133.

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ ПЕЧЕНИ КРЫС

Калинин И.В., Цудзевич Б.А., Петрук Н.А.

Исследовали спектральные свойства металлотионеинов печени крыс при интоксикации меди сульфатом и кадмия сульфатом. Установлено четыре изоформы металлотионеинов и их межгрупповые отличия, а также высчитано соотношение показателей светопоглощения между разными изоформами.

Ключевые слова: металлотионеины, УФ-спектры, меди сульфат, кадмия сульфат.

INFLUENCE OF HEAVY METALS ON THE SPECTRAL CHARACTERISTICS OF RAT LIVER METALLOTHIONEINS

Kalinin I.V., Tsudzevich B.A., Petruk N.A.

The spectral properties of metallothioneins in rat liver toxicity of copper sulfate and cadmium sulfate. There are four isoforms of metallothioneins and their groups differences, and calculated the ratio of light absorption performance between different isoforms.

Key words: metallothioneins, UV-spectra, copper sulfate, cadmium sulfate.