

УДК: 577.12:577.112:577.24

Особенности цитотоксичности длительного введения ультрамалых доз ионов кадмия на фибробласты кожи, легкого, почек и роговицы крыс У Си, И.С.Пырина, Ю.Г.Кот, Е.В.Кот, Е.Э.Перский

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
kot_jurij@inbox.ru

В работе исследованы особенности цитотоксического действия ионов кадмия на фибробласты кожи, легкого, почек и роговицы, выделенных в культуру из органов животных, которые ежедневно в течение 36 суток получали с питьевой водой субмалые дозы Cd^{2+} (0,1 и 1 мкг/кг/сутки). Цитотоксичность оценивали по адгезионной и миграционной способности клеток, их распределению по ранней и поздней стадиям апоптоза, а также метаболической активности – соотношению АДФ/АТФ, содержанию коллагена, гликозаминогликанов и TGFbeta1 в монослое. Наибольшую устойчивость к действию ионов Cd^{2+} , в изученных концентрациях и сроках введения, демонстрировали фибробласты кожи и роговицы, при введении в обеих исследуемых дозах. Наиболее сильную цитотоксичность, уже на 15 сутки введения дозы 0,1 мкг/кг/сутки, проявили ионы Cd^{2+} в отношении фибробластов легкого. Введение дозы Cd^{2+} 1 мкг/кг/сутки приводило к увеличению цитотоксического эффекта на фибробласты легкого, но при этом еще и происходило значительное снижение метаболической активности клеток. Цитотоксический эффект дозы Cd^{2+} 1 мкг/кг/сутки на фибробласты почек был качественно подобен эффекту этой дозы на фибробласты легкого. При этом у фибробластов почек выявлена устойчивость к длительному воздействию Cd^{2+} в дозе 0,1 мкг/кг/сутки.

Ключевые слова: фибробласты кожи, легкого, почек и роговицы, ионы кадмия, цитотоксичность, адгезионная и миграционная способность клеток, апоптоз, отношение АДФ/АТФ, коллаген, гликозаминогликаны, TGFbeta1.

Особенности цитотоксичности тривалого введения ультрамалых доз ионов кадмия на фибробласты шкури, легенів, нирок і рогівки щурів У Сі, І.С.Піріна, Ю.Г.Кот, К.В.Кот, Є.Е.Перський

У роботі досліджені особливості цитотоксичної дії іонів кадмію на фібробласти шкури, легенів, нирок і рогівки, виділених в культуру з органів тварин, які щодня протягом 36 діб отримували з питною водою субмалі дози Cd^{2+} (0,1 і 1 мкг/кг/добу). Цитотоксичність оцінювали за адгезійною і міграційною здатністю клітин, їх розподілу за ранньою та пізньою стадіями апоптозу, а також за метаболічною активністю – співвідношенням АДФ/АТФ, вмістом колагену, глікозаминогліканів і TGFbeta1 у моношарі. Найбільшу стійкість до дії іонів Cd^{2+} , у вивчених концентраціях і термінах введення, демонстрували фібробласти шкури і рогівки, при введенні в обох досліджуваних дозах. Найбільш сильну цитотоксичність, вже на 15 добу введення дози 0,1 мкг/кг/добу, проявили іони Cd^{2+} щодо фібробластів легенів. Введення дози Cd^{2+} 1 мкг/кг/добу призводило до збільшення цитотоксичного ефекту на фібробласти легенів, але при цьому ще й відбувалося значне зниження метаболічної активності клітин. Цитотоксичний ефект дози Cd^{2+} 1 мкг/кг/добу на фібробласти нирок був якісно подібний до ефекту цієї дози на фібробласти легенів. При цьому у фібробластів нирок виявлена стійкість до тривалого впливу Cd^{2+} у дозі 0,1 мкг/кг/добу.

Ключові слова: фібробласти шкури, легенів, нирок і рогівки, іони кадмію, цитотоксичність, адгезійна і міграційна здатність клітин, апоптоз, відношення АДФ/АТФ, колаген, глікозаминоглікани, TGFbeta1.

The features of cytotoxicity of cadmium ions ultra-low doses prolonged administration on rats skin, lungs, kidneys and cornea fibroblasts U Si, I.S.Pyrina, Yu.G.Kot, Ye.V.Kot, Ye.E.Persky

There have been studied the features of the cytotoxic effect of cadmium ions on the skin, lungs, kidneys and cornea fibroblasts, which were isolated into the culture from the organs of animals which received the sub low doses of Cd^{2+} with drinking water during 36 days, daily. Cytotoxicity was assessed by the ability of cells for adhesion and migration, their distribution according to early and late stages of apoptosis, as well as metabolic activity – by the ratio ADP/ATP; by the content of collagen, glycosaminoglycans and TGFβ1. There has been shown the greatest sustainability of the cornea and skin fibroblasts to the action of Cd^{2+} ions in the concentrations and terms of administration which were investigated. Cd^{2+} ions in relation to lung fibroblasts demonstrated the

strongest cytotoxicity, already on the 15th day the administration of a dose Cd^{2+} 0.1 $\mu g/kg/day$. Administering of a dose Cd^{2+} 1 $\mu g/kg/day$ resulted in increased cytotoxic effect on fibroblasts of the lung, but also a significant decrease in metabolic activity of cells. The cytotoxic effect of a dose Cd^{2+} 1 $\mu g/kg/day$ on kidney fibroblasts was qualitatively similar to the effect of this dose on lung fibroblasts. Thus, kidney fibroblasts revealed the resistance to prolonged action of Cd^{2+} at a dose of 0.1 $\mu g/kg/day$.

Key words: *skin, lungs, kidneys and cornea fibroblasts, cytotoxicity, ability of cells for adhesion and migration, apoptosis, ratio ADP/ATP, collagen, glycosaminoglycans, TGF β 1.*

Введение

Известно, что фибробласты различных анатомических областей характеризуются морфофункциональной гетерогенностью и топографической дифференцировкой (Ryan et al., 2015). Эта гетерогенность формируется в эмбриогенезе, сохраняется в постнатальном периоде жизни, а также при выделении фибробластов из тканей в культуру (Sriram et al., 2015). Эти устойчивые органоспецифические особенности клеток должны определять характер их ответа на действие экзо- и эндогенных факторов, в частности – влияние ионов тяжелых металлов.

Кадмий, в жизнедеятельности человека и влиянии на его здоровье, занял прочное место, что связано с растущим его техническим применением (Toxicological profile ..., 2012; Verordnung ..., 2014). При этом острая интоксикация кадмием крайне редка, в течение жизни организм человека подвержен длительному влиянию малых и субмалых доз ионов кадмия (Cadmium ..., 2011).

Основной спектр работ по изучению продолжительного воздействия малых доз ионов тяжелых металлов, в том числе и кадмия, на метаболизм млекопитающих представлен исследованием эффектов на уровне печени, мочевого выделительной (Radosavljević, Mladenović, 2012; Johri et al., 2010) и половой систем (Siddiqui, 2010; Mason et al., 2005; El-Shahat et al., 2009), в меньшей степени – кроветворных органов (Berlin et al., 1962). Исследования на клетках *in vitro* ограничиваются в основном клетками нервной и иммунной систем (Gerspacher et al., 2009; Wang, Du, 2013; Marth, Jelovcan, 2011). Между тем практически нет работ, в которых бы исследовались клетки соединительной ткани, всеобъемлющее значение которой в функциональности организма млекопитающих в целом, и человека в частности, трудно переоценить.

Целью данной работы было исследовать особенности цитотоксического действия ионов кадмия на фибробласты кожи, легкого, почек и роговицы, выделенных в культуру из органов животных, которые ежедневно в течение 36 суток получали с питьевой водой субмалые дозы Cd^{2+} . Цитотоксичность оценивали по адгезионной и миграционной способности клеток, их распределению по ранней и поздней стадиям апоптоза, а также метаболической активности – соотношению АДФ/АТФ, содержанию коллагена, гликозаминогликанов и TGF β 1 в монослое (Apoptosis ..., 2008).

Материалы и методы исследования.

Экспериментальные животные. В работе использовались беспородные белые крысы-самцы возрастом 3 месяца, которые содержались в стандартных условиях вивария Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. За две недели до эксперимента выборка животных переводилась на питьевую воду, тестируемую на отсутствие ионов кадмия. Пищевой рацион не изменялся.

Животные получали *per oral* воду, содержащую ионы кадмия, через стальной зонд ($l=15$ см, $D_{\text{внешн.}}=1$ мм) на протяжении 15 и 36 суток. Через каждые сутки перед введением все животные взвешивались натошак, и производился индивидуальный расчет количества вводимой жидкости так, чтобы концентрация ионов кадмия на единицу массы тела животного каждые сутки была одинаковой. Для приготовления раствора, содержащего ионы кадмия, использовали $CdCl_2 \times 2,5 H_2O$.

Известно, что для кадмия доза PTMI (provisional tolerable monthly intake; доза без риска возникновения побочных эффектов при однократном введении 1 раз в 30 суток) составляет 25 мкг $Cd^{2+}/кг$ (Cadmium ..., 2011). Учитывая модель ежедневного введения кадмия, длительные сроки запланированного эксперимента, известный кумулятивный эффект кадмия на ткани и органы организма и процент сорбции ионов кадмия из ЖКТ (до 10%), в качестве возможных доз минимального видимого цитотоксического эффекта при долгосрочном введении в течение 36 суток были выбраны дозы 0,1 и 1 мкг $Cd^{2+}/кг/сутки$.

Экспериментальные животные были разделены на следующие группы:

1. Животные, получавшие воду (Экония, 2015), не содержащую ионы кадмия (вода «Малютко», производство «Экония») на протяжении 15 и 36 суток.
2. Животные, получавшие 0,1 мкг Cd²⁺/кг/сутки, на протяжении 15 суток и 36 суток.
3. Животные, получавшие 1 мкг Cd²⁺/кг/сутки, на протяжении 15 суток и 36 суток.

На 15 и 36 сутки животных выводили из эксперимента. В экспериментах соблюдали рекомендации проведения медико-биологических исследований Украины и ЕС (Европейская конвенция..., 1998; Закон України..., 2006).

Выделение и исследование клеток in vitro. Первичные клетки фибробластов получали из биоптатов лимбальной области роговицы, кожи спины, правого легкого и почки, которые выделяли в асептических условиях. Выделение клеток из тканей проводили с использованием стандартных протоколов (Rittié, Fisher, 2005; Bueno, 2000; Bagloli et al., 2005; Gheisari, Soleimani, 2009). Количество и жизнеспособность выделенных из тканей клеток определяли, используя трипановый синий (Cadena-Herreraa, Esparza-De Lara, 2015), на автоматическом счетчике клеток Invitrogen Countess. Жизнеспособность клеток, используемых для исследований in vitro, составляла в среднем 86%.

Учитывая гетерогенность популяции клеток исследуемых органов, было проведена иммуномагнитная сепарация клеток с использованием магнитных штативов Invitrogen DynaMagnet и гранул Anti-Fibroblast MicroBeads для позитивной сепарации клеток (Positive cell isolation, 2015).

Выделенные фибробласты были разделены на группы для исследования:

1. Исследование адгезионной способности клеток. Клетки высевали на планшеты «Invitrogen Collagen Coated Plate» (Anti-fibroblast microbeads, 2015) с адгезивным покрытием из коллагена 1 типа и проводили подсчет прикрепившихся клеток через 24 часа после посева.

2. Исследование миграционной способности клеток. Миграционную способность клеток оценивали с помощью transwell-планшетов CytoSelect™ 24-Well Cell Migration Assay (Invitrogen collagen coated plate ...) по способности фибробластов мигрировать через мембрану с диаметром пор 8 μm. Количество мигрировавших клеток, через 48 часов после посева на мембрану, определяли колориметрически на микропланшетном ридере Bio-Тек FL600 (OD=560 нм).

3. Исследование способности Cd²⁺ индуцировать апоптоз. После выделения из тканей, методом проточной цитофлуорометрии определяли процент здоровых клеток, клеток, находящихся на ранней и поздней стадиях апоптоза. Использовали цитофлуорометер Guava PCA, программное обеспечение Guava Millipore Software 6.0.2 и наборы Guava Millipore Nexin (Guava millipore nexin protocol ...).

4. Исследование соотношения АДФ/АТФ в клетках. Непосредственно после выделения из тканей в клетках оценивали соотношение АДФ/АТФ с помощью тест-набора ADP/ATP Ratio Assay Kit (Abcam) люминесцентным методом (ADP/ATP ratio ..., 2015) на люминометре Berthold Sirius.

5. Исследование метаболической активности клеток. Клетки высевали на культуральные матрасы Corning 25 см³ и культивировали 15 суток со сменой среды каждые 72 часа, после чего в монослое клеток определяли содержание коллагена (Утевская, Перский, 1982) и общих гликозаминогликанов (Huang et al., 2007; Malmström et al., 2012).

6. Также проводили определение содержания TGFbeta1 с использованием Abcam TGF beta 1 Rat ELISA Kit (TGF beta 1..., 2015).

Анализ полученных результатов проводили в пакете программ Origin 7.5pro.

Результаты исследования

Проведенные исследования показали, что эффекты длительного введения субмалых доз Cd²⁺ in vivo на адгезивные и миграционные свойства фибробластов кожи, легкого, почек и роговицы крыс зависят от дозы и длительности введения Cd²⁺ (табл. 1–2).

Так, ежесуточное введение Cd²⁺ в дозе 0,1 мкг/кг/сутки не оказывало влияния на адгезивную и миграционную активность фибробластов роговицы. Однако при введении Cd²⁺ в дозе 1 мкг/кг/сутки на 15 и 36 сутки введения наблюдалось снижение как количества прикрепившихся к адгезивному матриксу клеток, так и клеток, способных к миграции.

Эффекты длительного введения ионов кадмия в обеих концентрациях на адгезивную и миграционную способность фибробластов кожи, легкого и почек зависели от дозы и исследуемого органа. В коже и легких количество клеток, способных к адгезии и миграции, существенно снижается, причем это снижение становится больше с увеличением как длительности введения, так и количества

вводимого Cd²⁺. При этом фибробласты легкого оказались более восприимчивыми к действию ионов кадмия, чем фибробласты кожи.

Ежесуточное введение Cd²⁺ в дозе 0,1 мкг/кг/сутки привело к увеличению адгезивной способности фибробластов почек в обоих сроках наблюдения в среднем на 18% и снижению их миграционной активности на 37%. Эффект введения Cd²⁺ в дозе 1 мкг/кг/сутки на фибробласты почек был качественно подобен эффектам, наблюдаемым для клеток легкого и кожи – на 15 и 36 сутки введения наблюдалось значительное снижение способности клеток к адгезии и миграции.

Таблица 1.

Влияние длительного введения субмалых доз Cd²⁺ in vivo на адгезивные свойства фибробластов кожи, легкого, почек и роговицы крыс

Влияние	Длительность введения, сутки	Количество прикрепившихся фибробластов через 24 часа после посева, %			
		роговица	кожа	легкое	почки
Без влияния Cd ²⁺	15	82±4	79±2	93±5	74±3
	36	84±2	82±2	90±5	72±4
0,1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки	15	84±4	77±5	63±3#	92±6#
	36	80±5	72±2	45±4#	94±5#
1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки	15	72±3#	67±4#	60±2#	46±4#
	36	65±3#	59±2#	35±2#	31±3#

Примечание: # – изменения достоверны (p<0,05) по сравнению с животными без введения Cd²⁺.

Таблица 2.

Влияние длительного введения субмалых доз Cd²⁺ in vivo на миграционную активность фибробластов кожи, легкого, почек и роговицы крыс

Влияние	Длительность введения, сутки	Количество мигрировавших фибробластов в течение 48 часов после посева, % от общего количества высеянных клеток			
		роговица	кожа	легкое	почки
Без влияния Cd ²⁺	15	75±2	70±4	81±5	88±5
	36	73±3	72±4	83±3	85±2
0,1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки	15	72±4	68±2	56±3#	46±4#
	36	74±5	62±3	58±1#	52±4#
1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки	15	60±3#	53±2#	52±5#	39±6#
	36	58±3#	47±3#	41±4#	21±3#

Примечание: # – изменения достоверны (p<0,05) по сравнению с животными без введения Cd²⁺.

Цитофлуорометрические исследования (табл. 3) показали, что зависимость характера изменения содержания живых, не апоптотических клеток в исследуемых органах от дозы и длительности введения Cd²⁺, в принципе, качественно подобна характеру изменений количества прикрепившихся клеток (табл. 1). Интерес представляет исследование изменения количества апоптотических клеток, выделенных в культуру, и их распределение по стадиям апоптоза.

Жизнеспособность фибробластов из роговицы и кожи животных, получавших ионы кадмия в дозе 0,1 мкг Cd²⁺/кг/сутки на протяжении 36 суток, оставалась практически без изменений в обоих сроках наблюдения. В почках жизнеспособность фибробластов оставалась также довольно высокой, доля клеток с поздним апоптозом не изменялась, однако увеличивалась доля клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза. Жизнеспособность фибробластов легкого оказалась наиболее восприимчивой к этой дозе кадмия – уже на 15 сутки наблюдалось снижение количества здоровых клеток на 15% и увеличение доли ранне- и позднеапоптотических клеток на 7 и 8% соответственно.

Потребление животными ионов кадмия в дозе 1 мкг Cd²⁺/кг/сутки на протяжении 15 и 36 суток приводило к снижению количества жизнеспособных фибробластов из всех исследуемых органов. При этом наименее восприимчивыми оказались фибробласты кожи и роговицы, наиболее – легких и почек. В коже эффект снижения доли здоровых клеток наблюдался только на 36 сутки наблюдения. Эффект длительного введения ионов кадмия в дозе 1 мкг/кг/сутки приводил к резкому увеличению количества клеток в поздней стадии апоптоза в почках на 15 (+15%) и 36 (+19%) сутки введения. При этом в обоих сроках наблюдения доля фибробластов, находящихся на поздней стадии апоптоза, была существенно выше доли клеток, находящихся на его ранних стадиях. Учитывая ведущую роль почек в аккумуляции кадмия (Cadmium ..., 2011), по-видимому, за 15 суток накопления кадмия были достигнуты пороговые значения концентраций этого металла, приводящие к резкой гибели клеток в этом органе.

Таблица 3.

Влияние длительного введения субмалых доз Cd²⁺ in vivo на соотношение здоровых и апоптотических фибробластов кожи, легкого, почек и роговицы крыс, % от общего количества анализируемых клеток



здоровые клетки



ранние стадии апоптоза



поздние стадии апоптоза

Влияние	Сутки	Источник фибробластов											
		роговица			кожа			легкое			почки		
Без влияния Cd ²⁺	15	89	10	1	83	10	7	89	9	2	90	7	3
	36	90	9	1	84	8	8	92	5	3	88	8	4
0,1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки	15	87	11	2	82	12	6	74#	16#	10#	85	11	4
	36	85	14	1	80	11	9	72#	18#	10#	87	10	3
1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки	15	79	15	6	81	11	8	74#	14#	12#	73#	10	17#
	36	77#	17#	6	72#	16#	12#	72#	11	17#	65#	14#	21#

Примечание: # – изменения достоверны (p<0,05) по сравнению с животными без введения Cd²⁺. Погрешность измерений во всех группах не превышает 2%. За 100% принято общее количество анализируемых клеток.

Известно, что апоптоз на ранних стадиях, в принципе, является нормальным физиологическим актом (Elmore, 2007), играющим важную роль в обеспечении гомеостаза тканей. На этой стадии целостность клеточной мембраны и ДНК сохраняется, и при определенных условиях возможен как эффект восстановления клетки, так и ее переключение на необратимую стадию позднего апоптоза. Известно, что маркером тенденции такого переключения является степень энергетической обеспеченности клетки, вступившей в фазу раннего апоптоза (Angosto, 2003).

В табл. 4 приведены данные о соотношении АДФ/АТФ в культуре клеток, выделенных из органов крыс, получавших per oral ионы кадмия.

В принципе, направленность изменений соотношения АДФ/АТФ и количества апоптотических клеток одинакова, но это соотношение позволяет более точно охарактеризовать глубину и вектор процесса раннего апоптоза в фибробластах.

Так, длительное введение кадмия в обеих дозах, по-видимому, не приводит к угнетению синтеза АТФ в митохондриях фибробластов роговицы и кожи. Фибробласты этих органов на момент наблюдения находятся на самой ранней стадии апоптоза (табл. 3), при которой уже произошло экспонирование фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточной мембраны, но протеолиз белков еще не запущен, и клетки сохраняют достаточность в энергетических ресурсах. Из данных литературы известно, что экспонирование фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточной мембраны клетки сопровождается потерей ею контактов с окружающими клетками и межклеточным матриксом (Bates, Buret, 1994). Этим можно объяснить наблюдаемое снижение способности фибробластов роговицы и кожи к адгезии и миграции in vitro (табл. 1). Однако на этой стадии процесс

апоптоза может быть обратим или заторможен, что в свою очередь может привести или к восстановлению пула здоровых клеток, или к развитию функциональной недостаточности ткани.

Таблица 4.
Влияние длительного введения субмалых доз Cd²⁺ in vivo на соотношение АДФ/АТФ в фибробластах кожи, легкого, почек и роговицы крыс

Влияние	Длительность введения, сутки	Источник фибробластов			
		роговица	кожа	легкое	почки
Без влияния Cd ²⁺	15	0,018	0,015	0,012	0,017
	36	0,021	0,017	0,015	0,014
0,1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки	15	0,016	0,018	0,018#	0,018
	36	0,019	0,015	0,030#	0,018
1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки	15	0,022	0,015	0,034#	0,054#
	36	0,024#	0,022#	0,052#	0,066#

Примечание: # – изменения достоверны (p<0,05) по сравнению с животными без введения Cd²⁺.

Подобным образом можно описать и состояние фибробластов легкого на 15 сутки при введении 0,1 мкг Cd²⁺/кг/сутки. На 36 сутки наблюдения уже, по-видимому, произошло существенное снижение синтеза АТФ в митохондриях, что привело к резкому увеличению отношения АДФ/АТФ в клетках. При введении 1 мкг Cd²⁺/кг/сутки в фибробластах легкого этот показатель еще более увеличивается с увеличением срока введения животным ионов кадмия. Такая дисфункция митохондрий обычно является следствием нарушения ионного транспорта в клетке, в частности кальция, и приводит к запуску каспаз 3 и 9, протеолизу белков и фрагментации ДНК (Wang, Youle, 2009). Эта стадия позднего апоптоза необратима и приводит к неминуемой гибели клеток, а также способна перейти в стадию деструкции и дисфункции их микроокружения (Roop et al., 2010).

При введении животным 1 мкг Cd²⁺/кг/сутки в фибробластах почек уже на 15 сутки наблюдается резкий срыв работы митохондрий, дисфункция которых еще больше усиливается с увеличением срока введения кадмия.

Интересно, что фибробласты из почек животных, которым вводился кадмий в дозе 0,1 мкг/кг/сутки на протяжении 15 и 36 суток, практически полностью сохранили свою жизнеспособность (табл. 4, 5). При этом их адгезионная способность к коллагену увеличилась на 20%, а миграционная способность снизилась в среднем на 35% (табл. 1). Возможно, что системы детоксикации, в частности система металлотионеинов, за 36 суток еще не исчерпала своих возможностей, концентрация кадмия не достигла порогового значения, и цитотоксический эффект возможен при более длительных сроках введения.

Однако отсутствие цитотоксичности при длительном введении такой сверхмалой дозы Cd²⁺ не исключает негативные эффекты для почек в долгосрочной перспективе. Существуют работы, показывающие способность кадмия в ультрамалых дозах стимулировать дифференцировку эмбриональных клеток цыплят, пролиферацию тимоцитов и лимфоцитов человека, и гладкомышечных клеток аорты кролика, и одновременно увеличивать экспрессию в этих клетках ряда онкогенов и цитокинов (von Zglinicki, Edwall, 1992). Известно также, что фибробласты коркового слоя нормальных почек взрослого организма характеризуются очень низкой дифференцировкой (Grupp, 1999), и уменьшение соотношения фибробласт/фиброцит в почках приводит к склерозированию ткани нефрона посредством гиперпродукции структурных белков матрикса. Центральное место в регулировании этого процесса принадлежит трансформирующим факторам роста, в частности TGFbeta1 (Postlethwaite et al., 2004).

В табл. 5 приведены данные о содержании TGFbeta1, коллагена и гликозаминогликанов в культуре фибробластов, выделенных из органов крыс, получавших per oral ионы кадмия.

Фибробласты почек животных, которым вводился кадмий в дозе 0,1 мкг/кг/сутки, более интенсивно продуцируют TGFbeta1, коллаген и гликозаминогликаны. Наряду с показанным резким увеличением их адгезивной способности при уменьшении миграционной активности и сохранением жизнеспособности, эти данные могут с определенной долей осторожности свидетельствовать о том,

что длительное введение кадмия в сверхмалой дозе может приводить к более высокой дифференцировке кортикальных фибробластов и запускать TGFbeta1-опосредованные сигнальные пути усиленной продукции структурных биополимеров, которые могут в отдаленной перспективе приводить к ряду патологий, в частности к фиброзу.

Таблица 5.

Влияние длительного введения субмалых доз Cd²⁺ in vivo на содержание TGFbeta1 (ng/10³ клеток), коллагена (пг/клетку) и ГАГ (пг/клетку) в культуре фибробластов кожи, легкого, почек и роговицы крыс

Источник клеток	Показатель	Доза и продолжительность исследования					
		Без введения Cd ²⁺		0,1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки		1 мкг Cd ²⁺ /кг/сутки	
		15 суток	36 суток	15 суток	36 суток	15 суток	36 суток
Роговица	TGFbeta1	4,3±0,2	4,7±0,2	4,5±0,3	4,2±0,2	3,1±0,4#	2,4±0,3#
	Коллаген	47,2±2,1	45,1±3,3	45,6±2,5	43,8±2,1	40,4±2,0	38,5±2,4
	ГАГ	112,4±12,3	129,2±8,2	115,5±11,5	108,4±7,4	96,3±6,5	92,0±10,2
Кожа	TGFbeta1	3,1±0,1	3,5±0,3	2,8±0,2	3,3±0,1	3,6±0,2	3,0±0,2
	Коллаген	65,8±2,4	68,4±3,1	62,7±2,2	66,4±2,0	61,7±1,8	52,2±2,5
	ГАГ	94,3±7,4	98,5±10,5	95,7±8,0	92,6±6,4	93,7±7,5	81,5±7,1
Легкое	TGFbeta1	2,2±0,4	2,8±0,2	2,0±0,3	1,6±0,2	1,5±0,1#	1,3±0,3#
	Коллаген	61,1±3,1	65,3±2,2	52,5±2,0	47,7±2,3	48,1±2,1#	45,2±3,2#
	ГАГ	108,4±7,0	111,7±5,2	93,2±6,3	91,0±5,5	67,2±7,1#	65,9±6,5#
Почки	TGFbeta1	5,1±0,6	4,6±0,2	8,4±0,2#	8,8±0,4#	2,2±0,3#	2,6±0,2#
	Коллаген	35,8±2,7	39,5±2,5	48,2±2,2#	53,6±2,0#	27,1±2,4#	22,4±2,2#
	ГАГ	56,3±4,5	58,1±4,2	103,5±5,1#	98,5±6,7#	42,7±5,8#	32,5±5,0#

Примечание: # – изменения достоверны (p<0,05) по сравнению с животными без введения Cd²⁺.

Заключение

Ионы Cd²⁺ при введении в обеих исследуемых дозах на 15 сутки исследования не оказывали эффекта на все изученные параметры в фибробластах роговицы и кожи. На 36 сутки наблюдалось снижение их адгезионной и миграционной способности, увеличение доли раннеапоптотических клеток на фоне отсутствия изменений в соотношении АДФ/АТФ, содержании коллагена, ГАГ, TGFbeta1 в монослое, доли клеток, находящихся на стадии позднего апоптоза. Это говорит о наибольшей устойчивости фибробластов кожи и роговицы к действию ионов Cd²⁺ в изученных концентрациях и сроках введения.

Наиболее сильную цитотоксичность проявили ионы Cd²⁺ в отношении фибробластов легкого. Уже на 15 сутки введения дозы Cd²⁺ 0,1 мкг/кг/сутки существенно снижалась способность фибробластов из этого органа к адгезии и миграции, увеличивалась доля клеток, находящихся на ранней и поздней стадиях апоптоза, повышался показатель АДФ/АТФ. На 36 сутки наблюдения такой эффект введения Cd²⁺ в дозе 0,1 мкг/кг/сутки еще более усиливался. При этом содержание коллагена, ГАГ, TGFbeta1 в монослое в обеих точках исследования оставалось без изменений. Введение дозы Cd²⁺ 1 мкг/кг/сутки приводило к увеличению цитотоксического эффекта на фибробласты легкого, но при этом еще и происходило значительное снижение метаболической активности клеток, о чем свидетельствует снижение концентрации коллагена, ГАГ и TGFbeta1 в монослое на всех сроках наблюдения.

Цитотоксический эффект дозы Cd²⁺ 1 мкг/кг/сутки на фибробласты почек был качественно подобен эффекту этой дозы на фибробласты легкого. При этом у фибробластов почек выявлена устойчивость к длительному воздействию Cd²⁺ в дозе 0,1 мкг/кг/сутки. На всех сроках наблюдения увеличивалась адгезионная способность клеток, увеличивалось содержание коллагена, ГАГ и TGFbeta1. При этом доля позднеапоптотических клеток оставалась без изменений. Такие изменения этих показателей могут косвенно свидетельствовать о том, что длительное введение животным кадмия в дозе 0,1 мкг/кг/сутки приводит к дифференцировке фибробластов в почках в фиброциты.

Таким образом, проведенные исследования показали, что цитотоксический эффект длительного введения субмалых доз Cd^{2+} на фибробласты кожи, легкого, почек и роговицы крыс имеет свои особенности и зависит от дозы и длительности введения Cd^{2+} .

Список литературы

- Европейская конвенция «Про защиту позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей». – Страсбург, 1998. /Yevropeyskaya konventsiya «Pro zashchitu pozvonochnykh zhyvotnykh, kotoryye ispol'zuyutsya dlya eksperimentov i drugikh nauchnykh tseley». – Strasburg, 1998. / (<http://www.echr-base.ru/CED170.jsp>)
- Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». – Київ, 2006. /Zakon Ukrainy «Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokogo povodzhennya». – Kyiv, 2006. / (<http://www.uapravo.net/data/base12/ukr12108.htm>)
- Экония, 2015. /Ekoniya, 2015/ (<http://www.econia.com.ua/ru/produkcija-malyatko/>)
- Утевская Л.А., Перский Е.Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн. Харьк. Ун-та. – 1982. – №226. – С. 18–20. /Utevskaia L.A., Perskiy Ye.E. Prostoy metod opredeleniya summarnogo i svobodnogo oksiprolina // Vestn. Khar'k. un-ta. – 1982. – №226. – S. 18–20. / ADP/ATP ratio assay kit (bioluminescent) protocol. Abcam, 2015. ([http://www.abcam.com/ps/products/65/ab65313/documents/ab65313%20ADP%20ATP%20Ratio%20Assay%20Kit%20Bioluminescent%20\(Website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/65/ab65313/documents/ab65313%20ADP%20ATP%20Ratio%20Assay%20Kit%20Bioluminescent%20(Website).pdf))
- Angosto M.C. Bases moleculares de la apoptosis // Anal. Real Acad. Nal. Farm. – 2003. – Vol.69. – P. 36–64.
- Anti-fibroblast microbeads. MiltenyiBiotec, 2015. (<http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/cell-separation-reagents/es-and-ips-cells/anti-fibroblast-microbeads-human.aspx>)
- Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation / Ed. H.J.Rode. 4th edition. – Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 2008.
- Bagloli C.J., Reddy S.Y., Pollock S.J. Isolation and phenotypic characterization of lung fibroblasts // Methods Mol. Med. – 2005. – Vol.117. – P. 115–127.
- Bates R.C., Buret A. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact // Tile Journal of Cell Biology. – 1994. – Vol.125. – P. 403–404.
- Berlin M., Fredriesson B., Linge G. Bone marrow changes in chronic cadmium poisoning in rabbits // Journal of Occupational Medicine. – 1962. – Vol.4, issue 1. – P.48.
- Bueno E. Isolation of corneal stromal fibroblasts with collagenase / Eds. A.Atala, R.Lanza. – Academic press, 2000. – P. 927–941.
- Cadena-Herrera D., Esparza-De Lara J.E. Validation of three viable-cell counting methods: manual, semi-automated, and automated // Biotechnology Reports. – 2015. – Vol.7. – P. 9–16.
- Cadmium in drinking-water. Background document for development of World Health Organization guidelines for drinking-water quality. – 2011. (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cadmium.pdf)
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // Toxicol Pathol. – 2007. – Vol.35 (4). – P. 495–516.
- El-Shahat A.E., Gabr A., Meki A.R., Mehana E.S. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats // Int. J. Morphol. – 2009. – Vol.27 (3). – P. 757–764.
- Gerspacher C., Scheuber U., Schiera G. et al. The effect of cadmium on brain cells in culture // Int. J. Mol. Med. – 2009. – Vol.24 (3). – P. 311–318.
- Gheisari Y., Soleimani M. Isolation of stem cells from adult rat kidneys // Biocell. – 2009. – Vol.33 (1). – P. 33–38.
- Grupp C. Renal fibroblast culture // Exp. Nephrol. – 1999. – Vol.7. – P. 377–385.
- Guava millipore nexin protocol. (<http://www.merckmilliporechina.com/guava/protocols/3/Annexin-V.pdf>; <http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf>)
- Huang Wei-Chih, Chen Shu-Jen, Chen The-Liang Modeling the microbial production of hyaluronic acid // Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers. – 2007. – Vol.38 (3–4). – P. 355–359.
- Invitrogen collagen coated plate for adhesion cells. (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1142801>)
- Johri N., Jacquillet G., Unwin R.J. Heavy metal poisoning: The effects of cadmium on the kidney // Biology of Metals. – 2010. – Vol.23 (5). – P. 783–792.
- Malmström A., Bartolini B., Thelin M.A. et al. Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate: biosynthesis and biological function // J. Histochem. Cytochem. – 2012. – Vol.60 (12). – P. 916–925.

- Marth E., Jelovcan S. Effect of heavy metals on the immune system at low concentrations // International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health. – 2001. – Vol.14, No 4. – P. 375–386.
- Mason K.E., Brown J.A., Young J.O., Nesbit R.R. Cadmium-induced injury of the rat testis // The Anatomical Record. – 2005. – Vol.149, issue 1. – P. 135–147.
- Poon I.K., Hulett M.D., Parish P.C. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance // Cell Death and Differentiation. – 2010. – Vol.17. – P. 381–397.
- Positive cell isolation. ThermoFisher, 2015. (<http://www.thermofisher.com/ua/en/home/life-science/cell-analysis/cell-isolation-and-expansion/cell-isolation.html#Positive>)
- Postlethwaite A.E., Shigemitsu H., Kanangat S. Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis // Curr Opin Rheumatol. – 2004. – Vol.16 (6). – P. 733–738.
- Radosavljević T., Mladenović D. Oxidative stress in rat liver during acute cadmium and ethanol intoxication // J. Serb. Chem. Soc. – 2012. – Vol.77 (2). – P. 159–176.
- Rittié L., Fisher G.J. Isolation and culture of skin fibroblasts // Methods in Molecular Medicine. – 2005. – Vol.117. – P. 83–98.
- Ryan R., Driskell F., Watt M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin // Trends in Cell Biology. – 2015. – Vol.25, issue 2. – P. 92–99.
- Siddiqui M.F. Cadmium induced renal toxicity in male rats, Rattus rattus // Eastern Journal of Medicine. – 2010. – Vol.15 (3). – P. 93–96.
- Sriram G., Bigliardi P.L., Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro // European Journal of Cell Biology. – 2015. – Vol.94, issue 11. – P. 483–512.
- TGF beta 1 Rat ELISA Kit Abcam, 2015. ([http://www.abcam.com/ps/products/119/ab119558/documents/ab119558%20TGF%20beta%201%20Rat%20ELISA%20Kit%20v3%20\(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/119/ab119558/documents/ab119558%20TGF%20beta%201%20Rat%20ELISA%20Kit%20v3%20(website).pdf))
- Toxicological profile for cadmium. – U.S. Department of Health and Human Services, 2012. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>)
- Verordnung (EU) Nr. 488/2014 der Kommission vom 12. Mai 2014 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 bezüglich der Höchstgehalte für Cadmium in Lebensmitteln. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit. (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0488&from=DE>)
- von Zglinicki T., Edwall C. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth // Journal of Cell Science. – 1992. – Vol.103. – P. 1073–1081.
- Wang Bo, Du Yanli Cadmium and its neurotoxic effects // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2013. – Vol.4 (5). (DOI: 10.1155/2013/898034)
- Wang Chunxin, Youle R.J. The role of mitochondria in apoptosis // Annual Review of Genetics. – 2009. – Vol.43. – P. 95–118.

Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 01.10.2015