

MICHAŁ KWAST

## WPŁYW POZIOMU BIAŁKA W PASZY NA ZAWARTOŚĆ METALOTIONEINY W WĄTROBIE SZCZURÓW \*

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku  
Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie  
Kierownik: prof. dr M. Nikonorow

*Zbadano wpływ obniżenia poziomu białka w paszy szczurów z 24% do 4% na kumulację kadmu i cynku w wątrobie oraz zdolność tego narządu do syntezy metalotioneiny po jednorazowym dootrzewnym podaniu 3 mg Cd/kg masy ciała. Oznaczono zawartość metalotioneiny, kadmu i cynku w wątrobie szczurów, spożywających przez 3—28 dni pasze, zawierające 0%, 4%, 20% i 40% białka i taką ilość kadmu, która zapewniała jednakowe jego pobranie, wynoszące 10 mg/dzień/kg masy ciała, przez zwierzęta ze wszystkich grup.*

Coraz szersze wykorzystanie kadmu w wielu gałęziach przemysłu i związane z tym zwiększenie zanieczyszczenia środowiska powodują wzrost zainteresowania toksykologów tym metalem. Oprócz oznaczania zawartości kadmu w środowisku oraz jego toksycznego działania na zwierzęta i człowieka, jednym z kierunków badań było wyjaśnienie, w jakiej postaci występuje on w tkankach i narządach ustroju.

W 1957 roku *Margoshes i Vallee* wykazali, że w nerce konia kadm związany jest ze specyficznym białkiem w ilości 20—25 mg Cd/g oczyszczonego preparatu. Białko to zawierało 14% azotu i nie pochłaniało światła przy 280 nm. W dalszych pracach autorzy ci podali sposób oczyszczania, skład i właściwości tego białka, nazwanego metalotioneiną. Ma ono ciężar cząsteczkowy ok. 10000 (nowsze dane podają ok. 6000), dużą zawartość grup sulfhydrylowych (26 na gramocząsteczkę) oraz kadmu (ok. 6%). Posiada również charakterystyczną zdolność absorpcji światła przy 250 nm (specyficzną dla wiązania kadm-cysteina) oraz jej brak przy 280 nm (brak aminokwasów aromatycznych). Ostatnio określono sekwencję aminokwasów w cząsteczce metalotioneiny, wyizolowanej z wątroby niektórych zwierząt.

Ponieważ w piśmiennictwie nie spotkano danych, dotyczących wpływu poziomu białka w paszy na zawartość metalotioneiny w narządach zwierząt, celem niniejszych badań było stwierdzenie, czy obniżenie poziomu białka w paszy wpływa na zdolność wątroby do syntezy metalotioneiny po podaniu jednorazowej dawki kadmu oraz jak wpływa obniżenie i podwyższenie poziomu białka w paszy, zawierającej kadm, na zawartość metalotioneiny w wątrobie szczurów.

C-2805

\*) Wyciąg z pracy doktorskiej. Praca wykonana w ramach problemu MR-12

Dla stwierdzenia, czy w warunkach niedoboru białkowego istnieje zależność między stężeniem kadmu i cynku oraz poziomem metalotioneiny w wątrobie, wykonano również oznaczenie zawartości obu metali w tym narządzie.

### MATERIAŁ I METODY

Badania (dwa doświadczenia) wykonano na szczurach-samcach rasy Wistar, 4–5-tygodniowych o początkowej masie ciała 50–60 g umieszczonych w klatkach po 5 szt. w każdej.

W doświadczeniu pierwszym zwierzęta podzielono na 10 grup po 5 szt. w każdej. 5 grup otrzymywało przez 10 tygodni półsyntetyczną paszę kontrolną, zawierającą 24% białka, a pozostałe 5 grup — paszę o obniżonym do 4% poziomie białka (pasza niedoborowa). Po 10 tygodniach karmienia szczurom podano dootrzewnowo jednorazową dawkę chlorku kadmowego w ilości 3mg Cd/kg masy ciała. Po 1 i 4 godzinach oraz 1 i 7 dniach od podania zwierzęta zabijano i wycinano wątrobę, w której oznaczano zawartość kadmu, cynku i metalotioneiny.

Cynk i kadm oznaczano metodą atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej, stosując przyrząd firmy Pye Unicam SP 90 Series 2. 1 g wątroby spalano na mokro w kolbach Kieldahla w mieszaninie kwasów siarkowego, nadchlorowego i azotowego w stosunku 1:2:10. Uzyskany mineralizat rozcieńczano wodą redetylowaną, a zawartość metali oznaczano przy następujących parametrach aparatu, zalecanych przez producenta:

|                            | Kadm  | Cynk  |
|----------------------------|-------|-------|
| Długość fali (nm)          | 228,8 | 213,9 |
| Szerokość szczeliny (mm)   | 0,1   | 0,1   |
| Przepływ acetylenu (l/min) | 0,9   | 0,9   |
| Przepływ powietrza (l/min) | 5,0   | 5,0   |

Dla oznaczania zawartości metalotioneiny zastosowano metodę, polegającą na sączeniu wyciągu tkankowego na żelu Sephadex G 75 i obliczeniu zawartości tego białka na podstawie molarnego stężenia kadmu i cynku we frakcjach, odpowiadających metalotioneinie.

1,5 g tkanki homogenizowano w 5 cm<sup>3</sup> 0,001 M buforu Tris-HCl o pH 8,0, zawierającego 2,92 g NaCl/dm<sup>3</sup> i 250 mg NaN<sub>3</sub>/dm<sup>3</sup> i wirowano przy 20000g przez 30 min. Do supernatantu dodawano 0,5 cm<sup>3</sup> stężonego roztworu sacharozy a następnie 2/3 preparatu, odpowiadające 1 g narządu, наносono na kolumnę o wymiarach 52 cm × 2,2 cm, wypełnioną żelą Sephadex G 75. Metalotioneinę eluowano tym samym roztworem z szybkością 20 cm<sup>3</sup>/godzinę. Zbierano frakcje po 5,4 cm<sup>3</sup>, w których oznaczano absorbancję przy długości fali 280 nm oraz zawartość kadmu i cynku metodą atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej bez mineralizacji.

We frakcjach, otrzymanych w wyniku sączenia badanego materiału na kolumnie z żelą Sephadex G 75 obserwowano jedno maksimum zawartości kadmu, przypadające na 102 cm<sup>3</sup> eluatu, co odpowiadało stosunkowi objętości eluacyjnej do objętości swobodnej stosowanej kolumny równemu ok. 2. Przyjęto więc, że maksimum to odpowiada metalotioneinie.

Z danych piśmiennictwa wynika, że stosunek molarny sumy metali, zawartych w cząsteczce metalotioneiny do jej ciężaru cząsteczkowego wynosi od 6 gramoatomów/mol, równy 6600, do 8,9 gramoatomów/mol, równy 10500. W pracy przyjęto stosunek 8,9 gramoatomów metali/mol równy 10000. Ponieważ zawartość miedzi w metalotioneinie wątrobowej jest nieznaczną w porównaniu z zawartością kadmu i cynku (ok. 5% ogólnej zawartości metali), założono, że jedna gramocząsteczka metalotioneiny, równa 10000, zawiera 7,7 gramoatomów kadmu i cynku. Po oznaczeniu sumy zawartości Zn i Cd we frakcjach, odpowiadających metalotioneinie, wyrażonych w µg/g tkanki, przeliczano ich stężenie na stężenie molowe i na podstawie przyjętego stosunku molarnego sumy kadmu i cynku do metalotioneiny oraz ciężaru cząsteczkowego tego białka obliczano zawartość metalotioneiny w mg/g tkanki.

Doświadczenie drugie wykonano na 55 szczurach, podzielonych na 4 grupy, otrzymujące pasze, zawierające: 0% (pasza bezbiałkowa), 4% (pasza niskobiałkowa), 20% (pasza kontrolna) i 40% (pasza wysokobiałkowa) białka. W oparciu o pomiary spożycia paszy, do pasz o różnym poziomie białka dodawano kadm w takiej ilości, aby w ciągu całego doświadczenia zwierzęta ze wszystkich grup pobrały jednakowe jego ilości 10 mg/kg masy ciała/dzień. Pasza kontrolna zawierała więc 100 mg Cd/kg,

a pasza bezbiałkowa, niskobiałkowa i wysokobiałkowa odpowiednio 65, 70 i 110 mg Cd/kg. W czasie doświadczenia spożycie paszy było kontrolowane. Po upływie 3 dni oraz 2 i 4 tygodni karmienia zwierzęta zabijano i wycinano wątrobę, w której oznaczano zawartość kadmu, cynku i metalotioneiny opisanymi wyżej metodami.

### WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki, uzyskane w obu wykonanych doświadczeniach, przedstawiono w tabelach I i II.

Jak wynika z tabeli I, obniżenie poziomu białka w paszy z 24% do 4% nie wpłynęło na zawartość metalotioneiny w wątrobie szczurów.

Również poziom obu badanych metali w tym narzędzie do 7 dnia doświadczenia był jednakowy. Na tej podstawie można przypuszczać, że niedobory białkowe nie wpływają na zdolność wątroby do syntezy metalotioneiny po jednorazowym podaniu kadmu.

Tabela I. Wpływ obniżenia poziomu białka w paszy na zawartość kadmu, cynku i metalotioneiny w wątrobie szczurów

| Czas trwania<br>doświadczenia | Badany składnik |                |                  |                |                        |        |
|-------------------------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|------------------------|--------|
|                               | kadm<br>μg/g    |                | cynk<br>μg/g     |                | metalotioneina<br>mg/g |        |
|                               |                 |                | % białka w paszy |                |                        |        |
|                               | 24              | 4              | 24               | 4              | 24                     | 4      |
| 0                             | 0,0             | 0,0            | 22,8*<br>± 3,3   | 18,1*<br>± 2,2 | 0,05**                 | 0,05** |
| 1 godzina                     | 8,5*<br>± 0,9   | 11,2*<br>± 1,3 | 21,9<br>± 3,6    | 16,2<br>± 1,4  | 0,05                   | 0,05   |
| 4 godziny                     | 13,3<br>± 1,1   | 14,4<br>± 1,1  | 21,6<br>± 2,8    | 19,9<br>± 3,8  | 0,10                   | 0,10   |
| 1 dzień                       | 18,1<br>± 2,8   | 21,1<br>± 2,0  | 44,1<br>± 5,1    | 45,1<br>± 3,6  | 0,20                   | 0,25   |
| 7 dni                         | 22,2<br>± 3,3   | 14,9<br>± 2,1  | 49,9<br>± 6,3    | 49,7<br>± 4,9  | 0,45                   | 0,50   |

\* średnia arytmetyczna z 5 pomiarów ± odchylenie standardowe

\*\* średnia arytmetyczna z 2–3 pomiarów

Badając wpływ niedoborów białkowych na syntezę białek w wątrobie, Goto i wsp. stwierdzili minimalne obniżenie włączania C<sup>14</sup>-fenyloalaniny do białek mikrosomalnych wątroby szczurów, karmionych przez 10 dni paszą bezbiałkową. Wskazywałoby to na brak wpływu niedoborów białkowych na syntezę białek we frakcji mikrosomalnej.

Jednak jak wykazali Anthony i Edozien, obniżenie zawartości białka w paszy powoduje obniżenie poziomu DNA, RNA i białka w wątrobie oraz zmniejszenie ilości polisomów i zwiększenie frakcji wolnych rybosomów w hepatocytach, skorelowane ze zmniejszeniem zdolności tego narządu do syntezy białka. Przy tym zdolność hepatocytów zwierząt, karmionych paszą niedoborową, do wbudowywania znakowanych aminokwasów (argininy i leucyny) w cząsteczki białka była zwiększona. Ten pozorny paradoks można wyjaśnić tym, że niedobory białkowe z jednej strony powodują obniżenie aktywności enzymów cyklu powstawania mocznika, a z

drugiej zwiększają aktywność enzymów, aktywujących wolne aminokwasy. W tej sytuacji aminokwasy te są z większym prawdopodobieństwem wbudowywane w cząsteczki białka, niż metabolizowane do mocznika.

Obserwowane przez *Anthony'ego* i *Edozięna* zmniejszenie syntezy białka pod wpływem niedoborów białkowych było wyraźne dopiero przy drastycznym obniżeniu poziomu białka w paszy do 0,8 i 0,4%, gdy tymczasem w pracy własnej poziom białka obniżono do 4%. Ponadto *Waterlow* i *Stephen* wskazują na dużą zdolność adaptacyjną organizmu do paszy niskobiałkowej poprzez zmianę procesów przemiany białkowej. Może to tłumaczyć brak wpływu stosowanych niedoborów białkowych na zdolność wątroby do syntezy metalotioneiny.

Z tabeli II wynika, że u szczurów spożywających pasze o zawartości białka równej 20% i 40% wzrasta poziom kadmu i cynku w wątrobie, co szczególnie wyraźnie widać po 4 tygodniach karmienia. Również zawartość metalotioneiny u zwierząt z obu tych grup była dwukrotnie wyższa niż u zwierząt, spożywających 4% białka w paszy.

Tabela II. Wpływ poziomu białka w paszy, zawierającej kadm, na zawartość kadmu, cynku i metalotioneiny w wątrobie szczurów

| Grupa zwierząt | % białka w paszy | Czas trwania doświadczenia |                |            |               |                |            |               |                |            |
|----------------|------------------|----------------------------|----------------|------------|---------------|----------------|------------|---------------|----------------|------------|
|                |                  | 3 dni                      |                |            | 2 tygodnie    |                |            | 4 tygodnie    |                |            |
|                |                  | badany parametr            |                |            |               |                |            |               |                |            |
|                |                  | Cd<br>μg/g                 | Zn<br>μg/g     | M*<br>mg/g | Cd<br>μg/g    | Zn<br>μg/g     | M*<br>mg/g | Cd<br>μg/g    | Zn<br>μg/g     | M*<br>mg/g |
| I              | 0                | 2,9**<br>±0,5              | 25,2**<br>±3,6 | 0,15***    | 4,7**<br>±0,5 | 21,2**<br>±3,6 | 0,15***    | —             | —              | —          |
| II             | 4                | 1,9<br>±0,2                | 25,7<br>±3,8   | 0,15       | 2,9<br>±0,6   | 18,2<br>±2,2   | 0,12       | 7,7**<br>±0,8 | 26,8**<br>±4,2 | 0,26***    |
| III            | 20               | 3,7<br>±0,5                | 21,2<br>±4,2   | 0,14       | 8,4<br>±0,8   | 30,4<br>±4,1   | 0,24       | 15,6<br>±1,4  | 66,5<br>±7,1   | 0,49       |
| IV             | 40               | 3,2<br>±0,2                | 23,8<br>±2,8   | 0,15       | 10,0<br>±0,6  | 30,7<br>±3,8   | 0,26       | 16,5<br>±1,8  | 65,6<br>±8,8   | 0,50       |

\* metalotioneina

\*\* średnia arytmetyczna z 5 pomiarów ± odchylenie standardowe

\*\*\* średnia arytmetyczna z 2—3 pomiarów

Na uwagę zasługuje również fakt, że spożywanie paszy bezbiałkowej (podobnie jak wysokobiałkowej) powodowało również lekkie zwiększenie kumulacji kadmu w wątrobie.

Otrzymane wyniki różnią się od wyników, uzyskanych przez *Żechałko*, która w 10-tygodniowym doświadczeniu na szczurach stwierdziła, że obniżenie poziomu kazeiny w paszy, zawierającej 100 mg Cd/kg, z 27% do 9% spowodowało prawie dwukrotne zwiększenie zawartości kadmu w wątrobie. Jednak gdy kadm podawano w wodzie do picia w stężeniu 50 mg/dm<sup>3</sup>, żadnych zmian w jego kumulacji w tym narządzie nie obserwowano.

Wydaje się, że rozbieżności te mogą być częściowo spowodowane różnicą w ilości i sposobie podania kadmu (50 lub 100 mg/kg, w paszy lub w wodzie do picia). Należy również podkreślić, że w pracy własnej za-

пewniono jednakowe pobranie tego metalu przez zwierzęta ze wszystkich grup. Wraz z obniżeniem poziomu białka w paszy wzrasta jej spożycie przez zwierzęta, w przypadku więc stałego poziomu kadmu w obu porównywanych dietach wzrasta także spożycie tego metalu, czego konsekwencją może być zwiększona jego kumulacja w wątrobie i nerkach.

Podobną jak w pracy własnej zależność między poziomem białka w paszy i kumulacją metalu w narządach stwierdzili *Milev* i wsp. oraz *Barltrop* i wsp. w przypadku ołowiu. Przypuszcza się, że niski poziom białka w paszy może uszkadzać procesy metaboliczne w wątrobie (a być może i w jelicie cienkim) co powoduje zwiększenie wchłaniania i kumulacji ołowiu. Z kolei *Stephens* i *Waldron* podają, że wysokobiałkowa dieta może zwiększać wchłanianie ołowiu na skutek tworzenia rozpuszczalnych kompleksów z aminokwasami. Porównując te dane z wynikami własnymi można przypuszczać, że zbliżone procesy mogą mieć miejsce także w przypadku wchłaniania i kumulacji kadmu, przy czym optymalną z punktu widzenia pobrania kadmu i cynku byłaby ilość białka w paszy, zawarta w granicach 4—20%.

Dwukrotne obniżenie poziomu metalotioneiny w wątrobie u szczurów, spożywających paszę zawierającą 4% białka w porównaniu ze zwierzętami, otrzymującymi 20% i 40% białka, prawdopodobnie nie jest bezpośrednio spowodowane niedoborem białka w pożywieniu, a raczej obniżeniem kumulacji kadmu i cynku, których poziom w wątrobie jest również najniższy u tych zwierząt. Ponieważ kadm i cynk mają zdolność stymulowania syntezy metalotioneiny, jest prawdopodobne, że zmniejszenie zawartości tych metali w wątrobie (być może na skutek zmniejszenia ich wchłaniania) u szczurów otrzymujących paszę o 4%-owym poziomie białka, może zmniejszyć ilość syntetyzowanej metalotioneiny bez obniżenia zdolności wątroby do jej syntezy. Częściowo potwierdzają to wyniki, uzyskane w pierwszym doświadczeniu.

#### WNIOSKI

1. Obniżenie poziomu białka w paszy z 24% do 4% nie wpływa na zdolność wątroby do syntezy metalotioneiny po jednorazowym dootrzewnym podaniu kadmu.

2. Spośród zwierząt, otrzymujących w paszy 10 mg Cd/kg masy ciała/dzień i 0—40% białka, najniższy poziom kadmu, cynku i metalotioneiny stwierdzono w przypadku paszy o 4% poziomie białka.

М. Кваст

#### ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ БЕЛКА В КОРМЕ НА СОДЕРЖАНИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА В ПЕЧЕНИ КРЫС

#### Резюме

Целью работы было установление влияния понижения уровня белка в корме крыс с 24% до 4% на способность печени синтезировать металлотioneин после однократной внутрибрюшинной инъекции кадмия в количестве 3 мг/кг веса тела а также оценка изменения содержания металлотioneина, кадмия и цинка в печени крыс, получающих корм содержащий 0%, 4%, 20% и 40% белка и такое количество кадмия, которое обеспечивает одинаковый его приём, равен 10 мг/кг веса тела/день животными из всех исследуемых групп.

Не установлено влияния понижения уровня белка в корме на содержание кадмия, цинка и металлотioneина в печени через 1 и 4 часа а также 1 и 7 дней после однократной инъекции кадмия.

В печени животных, потребляющих в течение 2 и 4 недель корм с добавлением кадмия с пониженным до 4% содержанием белка установлены самые низкие концентрации кадмия, цинка и металлотионеина по сравнению с животными, получающими корм лишенный белка (2 недели) а также контрольный корм и корм с увеличенным содержанием белка (2 и 4 недели).

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния недостатка белка на способность печени синтезировать металлотионеин а также указывают на зависимость между уровнем белка в корме и накоплением кадмия и цинка в печени.

M. Kwast

## EFFECT OF PROTEIN LEVEL IN THE FOOD ON METALOTHIONEIN IN RAT LIVER

### Summary

It was the purpose of this work to establish whether protein level reduction in the food of rats from 24% to 4% affects the ability of the liver to synthesise metallothionein after one single dose of cadmium 3 mg/kg of body weight administered intraperitoneally, and to trace the changes in metallothionein, cadmium and zinc levels in the liver of the animals kept on diets containing 0%, 4%, 20% and 40% of protein and the amounts of cadmium ensuring that the animals in all groups received identical doses of this element — 10 mg/kg of body weight daily.

Reduction of protein level in the food had no effect on the concentrations of cadmium, zinc and metallothioneine after 1 and 4 hours and after 1 and 7 days from the administration of one cadmium dose.

In the livers of the animals receiving during 2 or 4 weeks food with added cadmium and with protein level reduced to 4% the concentrations of cadmium, zinc and metallothionein were lower than in the animals kept on protein-free diet (2 weeks), control diet and high-protein diet (2 and 4 weeks).

These results indicate that protein deficiency has no effect on the ability of the liver to synthesise metallothionein, but they point out a relationship between the protein level in the food and cadmium and zinc accumulation in the liver.

### PIŚMIENNICTWO

Pełny wykaz piśmiennictwa znajduje się w pracy doktorskiej pt. „Wpływ składników paszy, zawierającej kadm, na wybrane parametry biochemiczne oraz kumulację kadmu i cynku w narządach szczurów”, dostępnej w Bibliotece PZH. Trzy dodatkowe pozycje piśmiennictwa — u autora.

Dn. 28.VI.1980 r.

00-791 Warszawa, Chocimska 24